

# Synthese der Polyketide Flaviolin und Oxytetracyclin in permeabilisierten Zellen von genetisch modifizierten *Escherichia coli*

---

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

**Steffen Krauser**

Saarbrücken, den 28. April 2015

Tag des Kolloquiums: 24.04.2015

Dekan: Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre

Berichterstatter: Prof. Dr.-Ing Elmar Heinzle

Prof. Dr. Manfred J. Schmitt

Vorsitz: Prof. Dr. Gert Kohring

Akad. Mitarbeiter: Dr. Klaus Hollemeyer

Vorliegende Dissertation Entstand aus Arbeiten im Rahmen des Förderprojekts MECAT (FKZ 031P7238) finanziert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen der Initiative Biotechnologie 2020+: Basistechnologien für eine nächste Generation biotechnologischer Verfahren.



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

## Vorwort:

In meiner Dissertation möchte ich dem interessierten Leser die Hintergründe und Erkenntnisse meiner Forschungen auf dem Gebiet der Biokatalyse erläutern. Während meiner Arbeiten als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Biochemie der Universität des Saarlandes von April 2011 bis Oktober 2014 war ich mit den bestmöglichen Bedingungen für wissenschaftliches Arbeiten ausgestattet. Die kreative Atmosphäre der Universität schaffte die Grundlage für den Willen zur Promotion im Anschluss an mein Diplomstudium in Chemie. Der interdisziplinäre Charakter der Arbeiten erforderte zusätzlich zur chemischen Ausbildung die Aneignung molekularbiologischer und mikrobiologischer Fertigkeiten. Die sympathischen und hilfsbereiten Kolleginnen und Kollegen waren mir dabei eine bedeutende Unterstützung. Aus dem ideenreichen Umfeld entstanden neue Denkansätze die in der Praxis an zahlreichen Reaktionen getestet und in Methoden umgesetzt wurden.

Zur Realisierung dieser Dissertation haben viele Personen ihren Anteil beigesteuert. Allen sei an dieser Stelle herzlichst gedankt. Im Besonderen möchte ich einige Personen hervorheben:

Zuerst möchte ich **Prof. Elmar Heinzle** nennen. Durch die Anstellung als wissenschaftlichen Mitarbeiter bot er mir die Möglichkeit an seinem Institut für Technische Biochemie zu promovieren. Dass eine Promotion so unproblematisch, freundschaftlich und inspirierend verläuft versteht sich nicht von selbst. Dafür herzlichen Dank. Die wissenschaftliche Freiheit und die kompromisslose Unterstützung auch in schwierigen Momenten war die Grundlage für das Erreichen meines Ziels.

Des Weiteren bedanke ich mich besonders bei meinen Kollegen **Dr. Patrick Kiefer**, **Dr. Thomas Hoffmann**, **Christian Weyler** und meiner Kollegin **Lisa Blaß** für die Zusammenarbeit bei Publikationen.

Besonders anerkennen möchte ich ebenfalls die ausgezeichnete Kooperation über Landesgrenzen hinweg mit **Prof. Yasuo Ohnishi** (Tokyo University), **Prof. Huimin Zhao** (University of Illinois), **Prof Christopher Boddy** (University of Ottawa) und **Prof. Anthony Garza** (Syracuse University) und danke für die Erlaubnis zur Verwendung ihrer Materialien.

Auch die Unterstützung und der Rückhalt durch meine Familie und Freunde verdient Lob und Anerkennung. Ganz besonders meiner Großmutter **Theresia Krauser**, der ich diese Arbeit widmen möchte, ist unermesslicher Dank auszusprechen.

## Zusammenfassung

In vorliegender Dissertation werden Grundlagen für die *in situ* Synthese von Polyketid-Sekundärmetaboliten erarbeitet. Die Verwendung permeabilisierter *Escherichia coli* Zellen ist ein neuartiger, vielversprechender Ansatz zur Synthese von komplexen Sekundärmetaboliten. Eine Behandlung von Zellen mit geringen Konzentrationen geeigneter Detergenzien führt dazu, dass niedermolekulare Verbindungen die Zellmembran ungehindert passieren können, während größere Biopolymere, wie z.B. Enzyme, in der Zelle verbleiben und für Synthesen genutzt werden können. Analyse und Manipulation des metabolischen Netzwerks ermöglichen darüber hinaus das Design maßgeschneiderter Biokatalysatoren. Durch Substratlimitierung können die permeabilisierten Zellen dazu genutzt werden, möglichst selektiv einzelne Biosyntheserouten zu bevorzugen. Zunächst wurde geprüft, ob es grundsätzlich möglich ist, den zellfremden Polyketid-Sekundärmetaboliten Flaviolin in permeabilisierten *E. coli* Zellen zu synthetisieren. Bedingungen für die Permeabilisierung der Zellmembran von *E. coli* BL21 wurden hierzu ermittelt und optimiert. Anhand der Anforderungen zur selektiven Synthese von Flaviolin wurde eine geeignete Syntheseroute ausgewählt. Die Syntheseroute wurde durch gezielte Überexpression von Schlüsselenzymen (Acetyl-CoA-Synthase (Acs) und Polyketid-Synthase (RppA)), sowie Deletion von Enzymen, welche unerwünschte Nebenreaktionen katalysieren (Acetat-Kinase (AckA) und Phospho-Transacetylase (Pta)), weiter optimiert. Darauf aufbauend konnte die Synthese von Oxytetracyclin (OTC) in permeabilisierten *E. coli* Zellen realisiert werden. Zur erfolgreichen Umsetzung der Synthese kamen modulare Versorgungssysteme für die benötigten Cofaktoren ATP, NADPH und SAM zum Einsatz, welche speziell für die Anforderungen einer Synthese mit permeabilisierten Zellen adaptiert wurden. Die Produktivität von einem Gramm des entwickelten Katalysatorgemischs, bestehend aus fünf *E. coli* Stämmen, beträgt  $3,6 \cdot 10^{-3}$  nmol Oxytetracyclin pro Stunde und erreicht eine Endkonzentration von  $1,88 \cdot 10^{-3}$  mmol/L. Für Synthesen komplexer Polyketide konnte in dieser Machbarkeitsstudie eine völlig neue Methode erschlossen werden. Eine Umsetzung in industrielle Produktionen bedarf noch weiterer Optimierung der Biokatalysatoren.

## Summary

The foundations for *in situ* Synthesis of natural compounds, especially polyketide secondary metabolites, are subject of this thesis. Using permeabilised cells for the synthesis of complex structures is a new, promising technique. Treatment of cells with low concentrations of surfactants enables low molecular weight compounds to diffuse through the membrane, while large biopolymers, i.e. enzymes, are trapped inside the cell and can be used for syntheses. Analysis and manipulation of the metabolic network allows for the design of tailored biocatalysts. Permeabilized cells can be used to selectively address distinct biosynthetic routes by limiting the substrates. First, the synthesis of the heterologous polyketide secondary metabolite flaviolin in permeabilized cells of *E. coli* was tested. Conditions for successful permeabilization of the cellular membrane were determined and optimized. Synthesis routes for flaviolin were developed depending on the demand of a selective synthesis. The synthesis was further optimized by overexpression of key enzymes (acetyl-CoA synthase (Acs) and polyketide synthase (RppA)) and deletion of enzymes catalyzing undesired side reactions (acetate-kinase (AckA) and phospho-transacetylase (Pta)). Based on the results, the synthesis of oxytetracycline (OTC) could be realized in permeabilized cells of *E. coli*. Modular supply modules supporting the reaction were developed for the essential cofactors ATP; NADPH and SAM regarding the demands of *in situ* synthesis. The productivity of one gram of the biocatalyst mixture, containing of five strains of *E. coli*, could be determined as  $3,6 \cdot 10^{-3}$  nmol oxytetracycline per hour, reaching a final concentration of  $1,88 \cdot 10^{-3}$  mmol/L. For the synthesis of complex polyketide secondary metabolites, this proof of principle study reveals a completely new method. Implications in industrial processes, however, require further optimizations of the biocatalysts.

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	9
1.1	Hinführung zum Thema .....	9
1.2	Das synthetische Potential der Natur .....	9
1.3	Ziel und Aufbau der Arbeit .....	10
2.	Forschungsstand .....	11
2.1	Gerichtete Mehrschritt-Biokatalyse mit permeabilisierten Zellen .....	11
	Hintergrund .....	11
	Permeabilisierung .....	16
	Enzymatische Synthese komplexer Moleküle .....	20
	Netzwerkanalyse .....	26
	Anwendungen .....	32
	Abschließende Bemerkungen .....	34
2.2	Polyketid-Sekundärmetabolite .....	35
2.3	Problemstellung .....	37
3.	Ergebnisse und Diskussion .....	38
3.1	Permeabilisierung .....	38
	Permeabilisierung von <i>Escherichia coli</i> BL 21 DE3 .....	38
	Permeabilisierung weiterer Mikroorganismen .....	41
3.2	Synthese von Flaviolin mit permeabilisierten <i>E. coli</i> Zellen .....	43
	Hintergrund .....	43
	Ergebnisse und Diskussion .....	43
3.3	Synthese von Coenzym A-Thioestern .....	47
	Hintergrund .....	47
	Ergebnisse und Diskussion .....	48
3.4	Versorgung mit ATP, NADPH und SAM in mehrstufigen Biokatalysen mit permeabilisierten <i>E. coli</i> Zellen .....	50
	Hintergrund .....	50
	Ergebnisse und Diskussion .....	52
3.5	Synthese von Oxytetracyclin in permeabilisierten <i>E. coli</i> Zellen .....	57
	Hintergrund .....	57
	Ergebnisse und Diskussion .....	58
4.	Abschließende Anmerkungen und Ausblick .....	63
5.	Material und Methoden .....	66
5.1	Geräte und Chemikalien .....	66
5.2	Mikroorganismen und Plasmidkonstrukte .....	67
5.3	Pufferlösungen .....	68
5.4	Nährmedien .....	69
5.5	Konstruktion von Vektorplasmiden .....	69
5.6	Synthese von Flaviolin mit permeabilisierten <i>E. coli</i> Zellen .....	74
5.7	Versorgung mit ATP, NADPH und SAM in mehrstufigen Biokatalysen mit permeabilisierten <i>E. coli</i> Zellen .....	75
5.8	Synthese von Oxytetracyclin in permeabilisierten <i>E. coli</i> Zellen .....	76
5.9	Molekularbiologische Standardmethoden .....	77

5.10	Elektronenmikroskopie.....	79
5.11	Analysemethoden .....	79
6.	Referenzen.....	83
7.	Anhang .....	98
7.1	Hochauflösende Massenanalyse zur Identifizierung von Dihydro-Oxytetracyclin .....	98
7.2	Erstellung der Kalibrierkurve zur Quantifizierung von Oxytetracyclin .....	100
7.3	Unterstützende Informationen zur Versorgung mit ATP und NADPH.....	101
7.4	Agarosegel-Elektrophorese der Plasmidkonstrukte .....	103
7.5	Vektorkarten .....	104

# 1. Einleitung

## 1.1 Hinführung zum Thema

Eine der Aufgaben, welcher sich die synthetische Chemie annimmt, besteht in der Herstellung von Feinchemikalien. Dabei sind die komplexen Strukturen von Naturstoffen von besonderer Relevanz. Durch evolutionäre Optimierung sind hochpotente Wirkstoffen entstanden, welche gezielte Funktionen bei Verteidigung und Signalübertragung übernehmen. In der Entwicklung neuer Arzneistoffe spielen Naturstoffe daher eine essentielle Rolle. Sie dienen als Leitstrukturen zur Synthese therapeutisch aktiver Substanzen. Die Synthese interessanter Moleküle in industriellem Maßstab ist daher von enormer Bedeutung für eine breite Anwendung. Die organische Synthese hält eine Vielzahl von Reaktionen bereit um die Zielmoleküle effizient herzustellen. Dennoch stoßen die Verfahren aufgrund der Komplexität von Naturstoffen und deren komplizierten Strukturen schnell an ihre Grenzen. Effektiver können dabei biotechnologische Methoden sein, mit welchen die gewünschten Produkte aus Kulturen genetisch optimierter Mikroorganismen gewonnen werden. In die Lücke zwischen diesen Verfahren tritt die Biokatalyse mit permeabilisierten Zellen. Grundlagen aus der Biotechnologie werden dabei genutzt um organisch-chemische Probleme aufzugreifen. Über die letzten Jahrzehnte hinweg wurden enorme Fortschritte auf dem Gebiet der Biokatalyse erzielt, welche die Effizienz biokatalytischer Prozesse verbessern und diesen Ansatz zu einer Alternative in der Naturstoffsynthese heranreifen ließen. Man spricht derzeit von der dritten Welle der Biokatalyse (Moore und Bornscheuer, 2014), welche aufbauend auf den Erkenntnissen der Genom- und Enzymforschung zusammen mit verlässlichen Methoden zur Modifikation der katalytisch-aktiven Komponenten vielversprechende Möglichkeiten bietet um sich einem Syntheseproblem zu nähern.

## 1.2 Das synthetische Potential der Natur

Vom Mikroorganismus bis hin zum komplexen Wirbeltier ist jede Zelle ein hochkomplexes System aus biochemischen Prozessen, welches darauf abzielt Ressourcen aus der Umgebung aufzunehmen und umzuwandeln. Als Schranke zwischen Zelle und Umwelt dient die Zellmembran, eine Phospholipid-Doppelschicht, welche das Zytoplasma an der Diffusion in die Umgebung hindert. Die äußere Hülle ermöglicht es der Zelle biochemische Prozesse im Inneren zu steuern und die Vitalität durch einen fein abgestimmten Stoffwechsel aufrecht zu erhalten. Der Metabolismus versorgt die Zelle mit Energie und Molekülbausteinen um hochkomplexe Strukturen für die Proliferation aufzubauen. Es sind lediglich zwölf essentielle Precursormoleküle sowie Kohlendioxid, Stickstoffverbindungen, Phosphate und Sulfate nötig,

um Biopolymere zu synthetisieren. Vom Bakterium bis zum Mensch bildet dieses Netzwerk die Grundlage für Leben.

Biochemische Reaktionen werden meist von Enzymen katalysiert und erreichen eine überragende Effizienz. Enzymatisch katalysierte Reaktionen ermöglichen es, chemische Reaktionen in einer physiologischen Umgebung zu realisieren. Enzyme stabilisieren den Übergangszustand chemischer Umwandlungen durch Koordinierung der Substrate im katalytisch aktiven Zentrum, wodurch die Aktivierungsenergie herabgesetzt wird. Milde Reaktionsbedingungen, hohe Substratspezifität und stereochemisch wohldefinierte Produkte sind ein enormer Vorteil enzymatisch katalysierter Reaktionen. Die Zelle steuert die Aktivität der Enzyme dabei auf mehreren Ebenen um bei Bedarf Stoffflüsse umzuleiten. Zum einen sind die Enzyme selbst meist durch Feedbackinhibierungen reguliert und reagieren auf Konzentrationsunterschiede ihrer Substrate und Produkte. Zum anderen kann auch durch Beeinflussung der Transkription die Enzymmenge kontrolliert werden, wobei auch die Gene selbst einer Regulation unterliegen. So ist es der Zelle möglich auf Umwelteinflüsse zu reagieren, mit dem Ziel, unter möglichst geringem Aufwand den maximalen Nutzen zu generieren.

### 1.3 Ziel und Aufbau der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist die Aufklärung der Grundprinzipien zur Synthese komplexer Naturstoffe mit permeabilisierten Zellen am Beispiel von Polyketid-Sekundärmetaboliten. Dabei sollen Möglichkeiten zur Synthese von Flaviolin und Oxytetracyclin in permeabilisierten *Escherichia coli* Zellen entwickelt werden. Hierzu werden die benötigten Stoffwechselwege mit Expressionsvektoren in eine genetisch optimierte Zelle eingeschleust. Anhand des metabolischen Netzwerks von *E. coli* werden mögliche Syntheserouten entwickelt und durch gezielte Gendeletionen störende Enzyme ausgeschaltet, bzw. durch Überexpression von Genen die Aktivität von Schlüssel-Enzymen verbessert. Regenerationsverfahren für relevante Cofaktoren werden entsprechend den Anforderungen einer Synthese in permeabilisierten Zellen adaptiert, so dass die Zielmoleküle Flaviolin und Oxytetracyclin schließlich aus kostengünstigen Vorläufern gebildet werden sollen.

Zunächst werden die Hintergründe aus Wissenschaft und Forschung ausgeführt um die Methodik bei der Erarbeitung der gewonnenen Erkenntnisse zu verstehen. Die Ergebnisse werden daraufhin präsentiert und diskutiert, wobei ausführlich auf Faktoren eingegangen wird, welche zu diesen geführt haben. Kapitel 5 enthält die Methoden und Arbeitstechniken, welche bei den praktischen Arbeiten eingesetzt wurden.

## 2. Forschungsstand

Das folgende Kapitel entspricht in weiten Teilen dem Inhalt des Review-Artikels „Directed Multistep Biocatalysis Using Tailored Permeabilized Cells“ der Serie „Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology – Fundamentals and Application of New Bioproduction Systems“ erschienen im Springer Verlag (Krauser et al., 2013).

### 2.1 Gerichtete Mehrschritt-Biokatalyse mit permeabilisierten Zellen

#### Hintergrund

In unzähligen evolutionären Schritten entwickelte die Natur ein beeindruckendes Repertoire an Strategien zur Synthese organischer Moleküle und Strukturen. Nahezu jedes kohlenstoff-, stickstoff-, sauerstoff- oder schwefelhaltige Grundgerüst, samt funktionalen Gruppen, kann prinzipiell durch biochemische Umwandlung hergestellt werden. Eine große Zahl unterschiedlicher, enzymatisch katalysierter Reaktionen unterstützen das Wachstum und Überleben der Zelle (Lopez-Gallego und Schmidt-Dannert, 2010). Nicht nur die Substrat- und Reaktionsspezifität, sondern auch die Effizienz enzymatischer Reaktionen ist in der Regel den vom Menschen entwickelten chemischen Prozessen überlegen. Die neuesten Entwicklungen in biochemischer Forschung ermöglichen einen detaillierten Einblick in die mechanistischen Abläufe und Zusammenhänge zwischen Struktur und Reaktivität. Zusätzlich erlauben neue Techniken die Modifikation von Enzymen zur Optimierung für gezielte Anwendungen. Sogar Enzyme mit gänzlich neuartiger Funktion können mit modernen Methoden vorhergesagt und umgesetzt werden (Siegel et al., 2010). Die Biokatalyse wird zu einem immer wichtigeren Aspekt technologischer Entwicklungen und industrieller Prozesse (Bornscheuer et al., 2012; Moore und Bornscheuer, 2014). Die Unterstützung der Forschung im Labor durch Informatik und datengestützte Netzwerkmodelle eröffnen neue Möglichkeiten für *in vivo* und *in vitro* Anwendungen von mehrstufigen biokatalytischen Synthesen.

Derzeit nutzen etwas mehr als 100 kommerzielle Anwendungen Enzyme im industriellen Maßstab (Liese et al., 2000). Aufgrund der für gewöhnlich hohen Preise für die Entwicklung potenter Industrieenzyme und der im Vergleich zur organischen Synthese langen Entwicklungszeit werden biokatalytische Prozesse nur selten in Betracht gezogen. Hinzu kommt eine geistige Schranke im Kopf vieler Synthesechemiker sich der enzymatischen Umwandlungen zu bedienen (Wohlgemuth, 2011). Nichts desto trotz geht der Trend in Richtung biotechnologischer Prozesse. Der ökologische Fußabdruck industrieller Verfahren, der sogenannte E-Faktor, erlangt eine immer größere Bedeutung, da er auch mit der Wirtschaftlichkeit der Produktion zusammenhängt (Aehle, 2004; Drauz und Waldmann, 2012; Heinzle et al., 2006; Wohlgemuth, 2010). Biokatalytische Prozesse haben im Vergleich zur organischen Synthese in der Regel

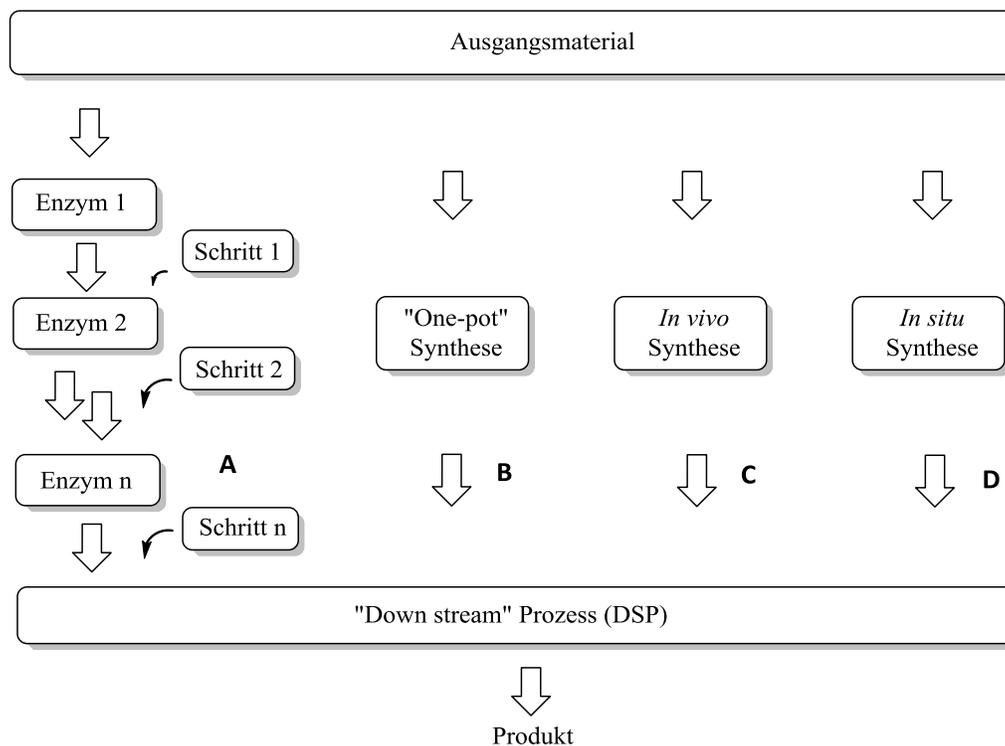
geringere ökologische Auswirkungen, wie zum Beispiel bei der selektiven Oxidation von Zuckern (Schneider et al., 2012). In anderen Fällen sind die chemischen Alternativen im Vorteil (Kuhn et al., 2010). Manche biochemischen Routen zur Synthese sind mit organisch-chemischen Methoden überhaupt nicht realisierbar, z.B. bei der Herstellung hochkomplexer pharmazeutischer Wirkstoffe.

Die *in vivo* Synthese zur Herstellung komplexer Moleküle kann durch gezielte Manipulation des Stoffwechsels von Mikroorganismen relativ günstig realisiert werden. Eine Limitierung der Prozesse durch den Anspruch der eingesetzten Zellen auf Vitalität, Transportbarrieren für Substrate, limitierende Reaktionsschritte im Metabolismus, sowie toxische Effekte der Produkte und ein hoher Aufwand zur Aufreinigung der Zielmoleküls schränken die Anwendungsmöglichkeiten ganzer Zellen ein (Abbildung 1 C).

Eine Produktion mit einzelnen Enzymen *in vitro* ist andererseits eine gebräuchliche Alternative zur klassischen Katalysechemie (Abbildung 1 A,B). Bezüglich Aktivität, Stabilität und Substratspektrum optimierte Enzyme verfügen über höchste Umsatzraten, während gleichzeitig eine überragende Selektivität der Reaktionen erreicht wird (Bornscheuer et al., 2012). In komplexen Synthesen ist die Verwendung von enzymatischen Schritten durch die Anforderungen des jeweiligen Enzyms an Temperatur, pH-Wert und Puffermedium eingeschränkt. Hinzu kommt der Bedarf an Cofaktoren mancher Enzyme, welche in stöchiometrischen Mengen umgesetzt werden. Eine Regeneration der kostspieligen Cofaktoren aus günstigen Substraten über enzymatische Kaskaden ist bereits weit verbreitet, schränkt die Anwendungsmöglichkeiten aber weiter ein. Mehrstufige enzymatische Synthesen in einer one-pot Reaktion, ohne Aufarbeitung der Intermediate, erfordern meist intensive Optimierungen der beteiligten Enzyme um die bestmöglichen Reaktionsbedingungen zu erreichen. Auch Zellysate komplexer Zusammensetzung kommen dabei zum Einsatz (You und Zhang, 2013). Des Weiteren kommen auch synthetische Gemische von Enzymen zum Einsatz, etwa in Emulsionen (Broadwater et al., 2005), durch Immobilisierung an Oberflächen oder gar durch gezielte Anordnung entlang von Trägermaterialien (Moses et al., 2013).

Eine weitere Methode, die *in situ* Synthese, ist die Nutzung permeabilisierter Zellen (Abbildung 1 D). Die permeabilisierte Zellmembran ermöglicht die Diffusion niedermolekularer Substanzen zwischen dem Zytoplasma und dem umgebenden Reaktionspuffer, während große Biopolymere wie Proteine und DNA in der Zelle zurückgehalten werden. Im Gegensatz zu Zellysaten verbleiben Enzyme bei der *in situ* Synthese in einer nativen Mikroumgebung und behalten im idealen Fall ihre natürliche Struktur. So lassen sich makromolekulare Effekte wie die Ausbildung von Aggregaten und Enzymclustern erhalten und die daraus resultierenden Eigenschaften für die Aktivität der Enzyme, wie z.B. Substratchanneling und allosterische Aktivierung/Inhibition, werden bewahrt (Minton, 2006; Monti et al., 2009). Während der Herstellung permeabilisierter Zellen werden üblicher Weise alle niedermolekularen Komponenten aus der Zelle ausgewaschen, während die mikroskopische Struktur erhalten bleibt (Kaur et al., 2009; Sestak und

Farkas, 2001; Tryfona und Bustard, 2008). Dies entspricht einem Reset des metabolischen Netzwerks und erlaubt es durch gezieltes Design von Reaktionskomponenten einzelne Biosynthesewege zu adressieren. Generell lässt sich diese Methode auch mit den molekularbiologischen Veränderungen kombinieren und ermöglicht so eine Verbesserung der Selektivität. Änderungen des metabolischen Netzwerks umfassen Gendeletionen, die Erhöhung der Enzymmenge durch Überexpression oder das Einführen heterologer Gene. Zusätzlich lassen sich durch den Einsatz von selektiven Enzyminhibitoren unerwünschte Nebenreaktionen unterdrücken, welche nicht durch eine Deletion erreicht werden können (Krauser et al., 2012). Eine Interessante Alternative zur Permeabilisierung ist die Verwendung von Enzymen aus thermophilen Organismen, bei der durch Erhitzen alle temperaturempfindlichen Komponenten inaktiviert werden (Ye et al., 2012).



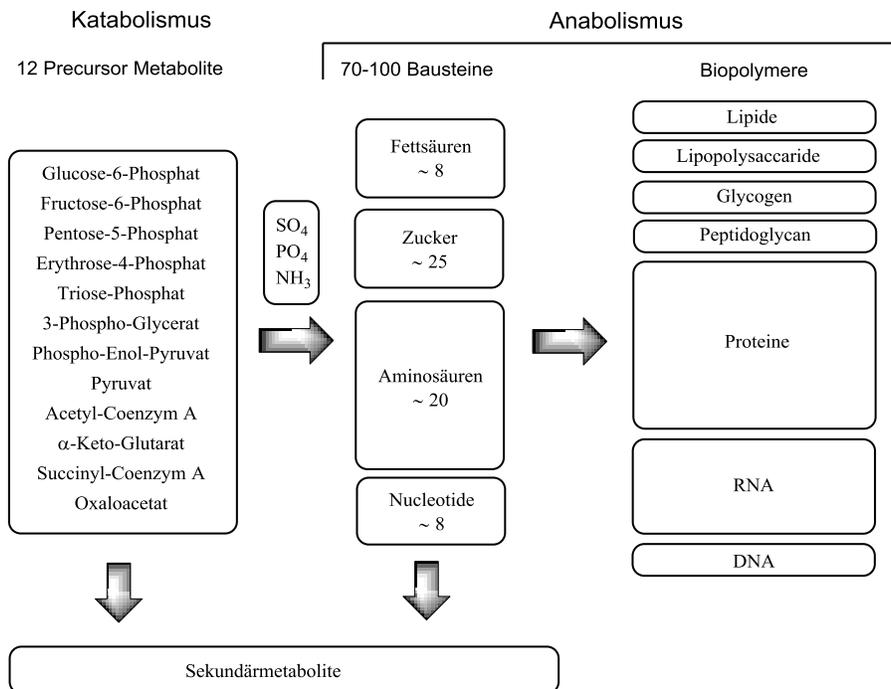
**Abbildung 1:** Typen von mehrstufigen Biosyntheseverfahren. **A** Synthese mit Enzymen und Intermediataufreinigung, **B** Synthese mit mehreren Enzymen in einem Reaktionsansatz, **C** *In vivo* Synthese mit lebenden Organismen in Fermentationsmedien, **D** *In situ* Synthese mit permeabilisierten Zellen.

Die aus der Verwendung permeabilisierter Zellen als Biokatalysator resultierenden Möglichkeiten zur Herstellung von Feinchemikalien und Wirkstoffen werden im Folgenden hervorgehoben.

Der Begriff der „*in situ* Synthese“ wurde Anfang der 1960er Jahre eingeführt und deutet darauf hin, dass Enzyme in ihrem natürlichen, makromolekularen Umfeld verbleiben. Diese ist nicht mit dem chemischen Begriff der *in situ* Umwandlung von Substanzen zu verwechseln, wobei man eine Reaktionskomponente,

meist aufgrund ihrer Instabilität, während der Reaktion aus Vorläuferverbindungen herstellt. Prokaryotische sowie eukaryotische Zellen lassen sich permeabilisieren, wobei aufgrund der Membranbeschaffenheit die jeweils optimalen Bedingungen gefunden werden müssen (Niklas et al., 2011; Yuan und Heinzle, 2009). Frühe Studien mit permeabilisierten Zellen lieferten bereits vielversprechende Ergebnisse. Permeabilisierte Zellen können schnell und einfach hergestellt und sogar mehrfach verwendet werden (Felix, 1982). Die Ergebnisse dieser Arbeiten erhielten aufgrund der fehlenden genetischen und metabolischen Veränderungsmöglichkeiten zur damaligen Zeit nicht die nötige Aufmerksamkeit wodurch die Methode bei der biotechnologischen Forschung vernachlässigt wurde. Seit dem haben sich die Möglichkeiten zur gezielten Veränderung von Organismen durch die Etablierung neuer genetischer Methoden und den Einsatz computergestützter Modelle enorm gesteigert. Es ist anzunehmen, dass permeabilisierte Zellen eine brauchbare Alternative zu den bestehenden Methoden der Biokatalyse darstellen und die Lücke zwischen *in vivo* und *in vitro* Biosynthesen zu schließen.

Die enorme Leistungssteigerung in der DNA-Sequenzierung hat dazu geführt, dass riesige Mengen an Genomen und metabolischer Netzwerke analysiert werden und durch entsprechende Datenbanken die Informationen verfügbar gemacht werden. Nicht nur einzelne Organismen werden untersucht, sondern ganze Habitate werden in Metagenomen zusammengefasst und auf ihren Informationsgehalt hin untersucht. Gleichzeitig werden die informatischen Methoden zur Analyse der Datenmengen immer besser und liefern Informationen über Zusammenhänge, während experimentelle Charakterisierungen der Enzymeigenschaften nur mühsam erstellt werden. Dennoch liefern die entstandenen Datenbanken enorme Mengen an Information, welche für die Synthese mit permeabilisierten Zellen sehr nützlich sind. Genomweite metabolische Netzwerke sind in immer größerer Zahl verfügbar, einige davon bereits sorgfältig geprüft. Für einige Mikroorganismen, wie z.B. *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* sind die metabolischen und regulatorischen Netzwerke sehr gut untersucht. Dennoch ist die Erstellung verlässlicher Modelle zur Vorhersage der Reaktionen von metabolischen Netzwerken schwierig. Die Übertragung der Netzwerkmodelle zwischen den Spezies ist ebenfalls schwierig, obwohl große Teile des Zentralmetabolismus übereinstimmen. So sind es zwölf kleine Precursormoleküle, welche als Ausgangsmaterial für alle Bausteine und Polymere dienen (Abbildung 2) (Ma und Zeng, 2003). Während Biopolymere den größten Massenanteil der Zelle ausmachen, sind es die Sekundärmetabolite, welche für die Anwendung als Wirkstoffe und Leitstrukturen zur Entwicklung neuer Pharmazeutika von besonderem Interesse sind (Clardy und Walsh, 2004).



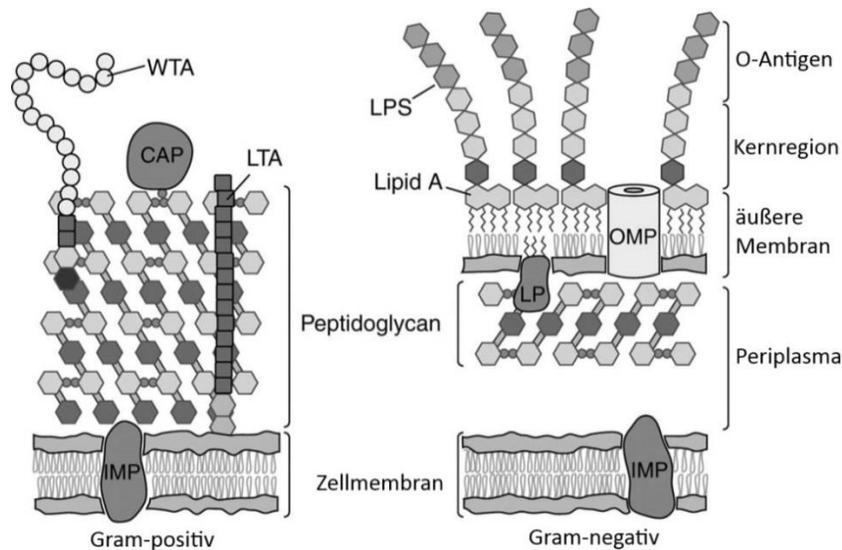
**Abbildung 2:** Aufbau des Metabolismus

Mit dem heutigen Wissenstand, molekularbiologischen und informationstechnologischen Methoden, sowie der Entwicklung neuer Methoden zur Veränderung von Enzymeigenschaften und metabolischer Synthesewege entsteht ein breites Feld für neue Methoden und Anwendungen der Biokatalyse. Ist der Biokatalysator einmal entwickelt, lässt er sich theoretisch unbegrenzt vervielfältigen. Ein Vorteil permeabilisierter Zellen gegenüber chemischen Synthesen und sequenziellen multienzymatischen Synthesen ist der reduzierte Ressourceneinsatz und damit ein geringeres Abfallaufkommen. Die one-pot Strategie bei Reaktionsansätzen mit permeabilisierten Zellen ermöglicht es auf die Isolierung von Intermediaten zu verzichten und führt zur drastischen Reduzierung des nötigen Aufreinigungsaufwands. Bis zur Etablierung der Strategie in praktischen Anwendungen sind noch wichtige Hürden zu nehmen. Die Atomökonomie spielt dabei neben der Erhöhung der erreichbaren Endkonzentrationen eine essentielle Rolle. Auch die Selektivität der metabolischen Netzwerke zur Bevorzugung bestimmter Stoffwechselwege kann enorm verbessert werden. Biosynthesewege, deren Mechanismus und Regulierung, müssen hierzu detailliert aufgeklärt werden. Edukte müssen möglichst effizient zur Verfügung gestellt und Cofaktoren optimal durch Regenerationen genutzt werden. Wichtig ist ganz besonders die Versorgung mit Cofaktoren, wie etwa Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und  $\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotiden (NAD(P)H). Weiter ist von großer Bedeutung zu verstehen, wie die Permeabilisierung auf molekularer Ebene entsteht, da dieser Prozess bislang noch nicht ausführlich aufgeklärt ist.

## Permeabilisierung

### Lipide und Membranstrukturen

Zellen sind umschlossen von Hüllen, die das Zellinnere von der Umgebung trennen. Obwohl es eine große Vielfalt beim Aufbau der Zellhüllen gibt, weisen sie gemeinsame Komponenten auf. Lipide, Peptidoglycan und Membranproteine bilden die Hauptbestandteile, welche oft mit funktionellen Kohlenhydrat- und Proteinstrukturen dekoriert sind (Abbildung 3) (Silhavy et al., 2010).



**Abbildung 3:** Aufbau der Zellwand von Gram-positiven (links) und Gram-negativen (rechts) Bakterien (Silhavy et al., 2010). Kovalent verknüpfte Proteine (CAP), membranintegrierte Proteine (IMP), Lipoproteine (LP), äußere Membranproteine (OMP), Lipopolysaccharide (LPS), Teichonsäuren (WTA/LTA), Peptidoglycan und Phospholipide sind die Hauptbestandteile der Zellwand.

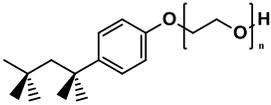
Mikroorganismen werden aufgrund der Beschaffenheit ihrer Zellwand in zwei Klassen unterteilt. Grampositive Organismen entwickeln eine dicke Schicht aus Peptidoglycan als Hauptbestandteil der äußeren Zellwand. Gram negative Organismen besitzen zusätzlich eine äußere Doppellipidschicht als Schutz vor dem Eindringen unpolarer Substanzen (Vaara, 1992). Hefen haben ebenfalls eine robuste Zellwand, welche aus stark verzweigtem Glycan aufgebaut ist. Durch die Festigkeit der äußeren Strukturen zeigen Bakterien und Hefen eine hohe mechanische Stabilität, welche nach Permeabilisierung der Membranen größtenteils aufrechterhalten bleibt (Abraham und Bhat, 2008; Cánovas et al., 2005; Yuan und Heinzle, 2009). Dies erleichtert die Verarbeitung permeabilisierter Zellen. Die meisten Permeabilisierungsmethoden zerstören die Zellmembran ganz oder teilweise, während die verbleibenden Bestandteile der Zellwand weitestgehend intakt bleiben (Abraham und Bhat, 2008; Ding et al., 2008; Malik et al., 2012; Zhang et al., 2006). Die mikroskopische Struktur der Zellen nach der Permeabilisierung weitgehend erhalten.

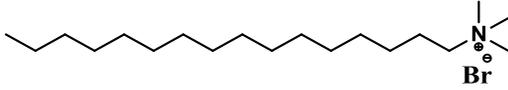
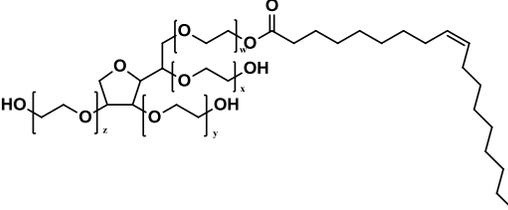
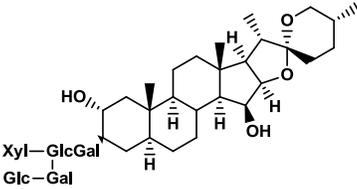
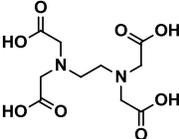
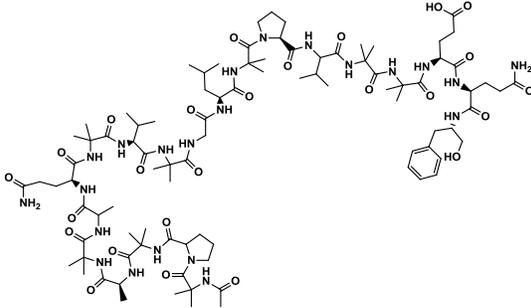
Säugerzellen besitzen keine Zellwand und sind daher anfälliger für mechanischen Stress und eine Permeabilisierung führt zu einer strukturellen Instabilität (Niklas et al., 2011). Im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen setzen permeabilisierte Säugerzellen aufgrund der fehlenden Zellwand viele Proteine frei (Cook et al., 1983). Der Verlust der Makromoleküle kann durch eine vorhergehende Vernetzung der Membranbausteine durch beispielsweise Glutaraldehyd eingeschränkt werden (Aragon et al., 1980).

### **Permeabilisierungsmethoden und Reagenzien**

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Strukturen von Zellmembranen und Zellwand gibt es keine allgemein einsetzbare Methode zur erfolgreichen Permeabilisierung. Es muss für jeden Organismus empirisch ermittelt werden, welche Methode die jeweils optimale ist. Es ist auch nicht zwangsläufig davon auszugehen, dass sich die Methoden zwischen ähnlichen Spezies übertragen lassen. Sogar verschiedene Stämme des selben Organismus können sich im Aufbau der Zellwand derart unterscheiden, dass die Permeabilisierungsmethoden stark variieren (Cánovas et al., 2005; Krauser et al., 2012; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2009). Die Kenntnisse über Prozesse während der Permeabilisierung der Zellwand nehmen weiter zu. Künftig wird es eventuell möglich sein, durch entsprechende Modelle, Anforderungen an die Wahl des Permeabilisierungsreagenz und die optimalen Bedingungen vorherzusagen (Owen et al., 2012). Tabelle 1 listet einige Reagenzien zur Permeabilisierung auf und beschreibt deren Wirkung.

**Tabelle 1:** Reagenzien zur Permeabilisierung von Zellen

Stoffname	Struktur / Beispiele	Permeabilisierungseigenschaften
Organische Lösemittel	Toluol, Ethanol, Chloroform	zerstören die Zellmembranstruktur oftmals zusammen mit divalenten Kationen eingesetzt (Cánovas et al., 2005; De Groeve et al., 2009; Flores et al., 1994; Jackson und Demoss, 1965; Martin et al., 2011; Rundback et al., 2012; Thedei et al., 2008; Tokuda und Matsuyama, 2004; Upadhya et al., 2000; Zhang et al., 2009)
Triton X-100		n=8-9 nicht ionisches Detergenz, löst die Membran teilweise auf, unspezifisch (Bernal et al., 2007; Cánovas et al., 2005; Jamur und Oliver, 2010; Krauser et al., 2012; Martin et al., 2011; Miozzari et al., 1978; Niklas et al., 2011; Yuan und Heinzle, 2009)

Stoffname	Struktur / Beispiele	Permeabilisierungseigenschaften
CTAB		Kationisches Detergenz löst die Membran teilweise auf, unspezifisch (Cheng et al., 2006; Foulstone und Reading, 1982; Kaur et al., 2009; Silhavy et al., 2010; Upadhyya et al., 2000)
Tween 80		nicht ionisches Detergenz, löst die Membran teilweise auf, unspezifisch (Aidemark et al., 2009; Bernal et al., 2007; Bogman et al., 2003; Cánovas et al., 2005; Elling, 1996; Powers und Hancock, 2003; Shen et al., 2002; Tokuda und Matsuyama, 2004)
Digitonin		Steroidglykosid, Permeabilisiert selektiv Membranen mit hohem Cholesterinanteil (Aragon et al., 1980; Cook et al., 1983; Fiskum et al., 1980; Niklas et al., 2011)
EDTA		Komplexbildner, komplexiert divalente Kationen, verhindert den Ladungsausgleich von Phospholipiden, unspezifisch (Malik et al., 2012; McCord und Day, 1978; Rundback et al., 2012; Rutter und Denton, 1992; Ryan und Parulekar, 1991; Upadhyya et al., 2000; Vaara, 1992; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2009)
Alamethicin		Porenbildner, ermöglicht Diffusion geladener Ionen und Moleküle durch die Zellmembran (Aidemark et al., 2009; Bonnafous et al., 1982; Johansson et al., 2004)

## Organische Lösemittel

Toluol ist das am häufigsten verwendete Lösemittel zur Permeabilisierung. Bereits 1965 wurden entsprechende Studien veröffentlicht, bei welchen *E. coli* Zellen nach Kontakt mit Toluol permeabilisiert vorlagen (Daines et al., 2004; Silhavy et al., 2010). Während neuere Studien davon ausgehen, dass eine Permeabilisierung der Zellwand mit organischen Lösemitteln unvorteilhaft im Vergleich zur Verwendung

von Detergenzien ist, wurden mit geringen Konzentrationen in Anwesenheit von Komplexbildnern wie EDTA gute Ergebnisse erzielt (Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2006). Auch Hefezellen konnten durch Kontakt mit Gemischen aus Chloroform, Ethanol und Toluol permeabilisiert werden (Jamur und Oliver, 2010).

### **Detergenzien**

Die Behandlung mit Detergenzien ist die am weitesten verbreitete Methode um Zellen zu permeabilisieren. Es werden drei grundsätzliche Prinzipien unterschieden, auf welchen die Interaktion von Detergenzien mit der Membran beruht. Kationische Detergenzien wechselwirken mit der negativ geladenen, äußeren Seite der Membran. Der apolare Teil des Detergenz kann sich zwischen die hydrophoben Molekülketten innerhalb der Membran einlagern und die transversale Struktur stören (Kaur et al., 2009). Beide Effekte können auch gleichzeitig auftreten, wie es auch bei den meisten gebräuchlichen Detergenzien der Fall ist (Abraham und Bhat, 2008; Jamur und Oliver, 2010; Zaragoza et al., 2009). Oberhalb einer Konzentration, welche Micellenbildung ermöglicht, werden Assoziationskolloide geformt, welche aus dem Detergenz und Membranbausteinen bestehen. Da die meisten Proteine ebenfalls aus polaren und apolaren Teilen bestehen, können diese von dem Detergenz ebenfalls beeinflusst werden. Damit verbundene Konformationsänderungen und Denaturierung gehen oft mit einem Aktivitätsverlust einher (Tandon und Horowitz, 1987; Weber und Kuter, 1971; Womack et al., 1983). Die Permeabilisierung mit Triton X-100 ist eine sehr milde Variante, bei welcher schon geringe Konzentrationen ausreichen um die Membranstruktur zu stören und eine Permeabilisierung zu erreichen (Galabova et al., 1996). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass bestimmte Detergenzien selektiv nur bestimmte Typen von Membranen permeabilisieren. So lässt sich mit Digitonin selektiv die äußere Zellmembran von Säugerzellen zerstören, während die mitochondriale Struktur weitestgehend unbeeinflusst bleibt (Fiskum et al., 1980; Niklas et al., 2011). Digitonin stört dabei die cholesterolphaltigen Strukturen selektiv (Colbeau et al., 1971; Sperry und Webb, 1950). Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) ist das am meisten verbreitete kationische Detergenz. Durch die starke Bindung an Lipide und Phospholipide induziert CTAB die Bildung von Poren in der Membran (Cheng et al., 2006). Es wurde auch festgestellt, dass das Verhältnis der Menge des Detergenz zur Membranoberfläche der Zellen das Ausmaß der Permeabilisierung beeinflusst (Gowda et al., 1991).

### **Komplexbildner**

Die strukturelle Stabilität der Zellmembran basiert auf elektrostatischen und atomaren Wechselwirkungen. Divalente Kationen wie  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  gleichen die Ladung der Phosphatgruppen von Phospholipiden aus, sodass diese in räumlicher Nähe gepackt werden können. Auch Lipopolysaccharide sind über Kationen der Membran mit der Zelloberfläche verknüpft. Komplexbildner wie EDTA weisen eine hohe Affinität zu diesen Kationen auf und binden diese (McCord und Day, 1978).

## Peptide und Proteine

Eukaryonten synthetisieren eine Vielzahl an Peptiden und kleinen Proteinen, welche aufgrund ihrer permeabilisierenden Eigenschaft antibiotisch wirken (Hill et al., 1991; Lehrer et al., 1989). Aufgrund ihrer Ladung und Struktur lagern sich solche Defensine genannte Moleküle in die Membran ein und bilden Poren (Lichtenstein, 1991; van Kan et al., 2002; White et al., 1995). Unterschiedliche Mechanismen der Interaktion wurden untersucht und es wurden Versuche unternommen Wechselwirkungsbeziehungen zwischen Struktur und Aktivität zu beleuchten (Aidemark et al., 2009; Ferrer et al., 1996; Kearsley et al., 2005; Michalek et al., 2009; Powers und Hancock, 2003).

## Physikalische Methoden

Elektroporation ist eine gängige Methode zur zeitweisen Störung der Membranstruktur, um z.B. DNA von außen in die Zelle zu schleusen. Dabei wird entlang der Membran ein elektrisches Feld erzeugt welches aufgrund der geringen Leitfähigkeit der Doppellipidschicht zu einer vorübergehenden Porenbildung führt. Ein genereller Vorteil der Elektroporation ist der Verzicht auf zusätzliche Reagenzien (Becker und Guarente, 1991; Dower et al., 1988; Escoffre et al., 2007; Fromm et al., 1987; Pliquett et al., 2007; Tryfona und Bustard, 2006). Durch einen osmotischen Schock wird die Membran ebenfalls permeabel (Bernal et al., 2007; Crotti et al., 2001; Miozzari et al., 1978). Diese Methode wird vorrangig in der Molekularbiologie zum Einschleusen von Genmaterial verwendet. Anwendungen in Biokatalysen wurden bislang noch nicht berichtet.

## Enzymatische Synthese komplexer Moleküle

Enzymatische Synthesen haben einen hohen Standard erreicht und werden genutzt um Bulkchemikalien, aber auch hochkomplexe Produkte herzustellen (Bornscheuer et al., 2012; Liese et al., 2000). Dennoch dominieren *in vivo* Anwendungen bei der Produktion komplexer Endprodukte, wie z.B. Fermentationen in riesigen Bioreaktoren. Während sich *in vitro* Anwendungen hauptsächlich auf die Enzymcharakteristiken fokussieren, wird bei *in vivo* Verfahren das gesamte Spektrum metabolischer Manipulationsmöglichkeiten auf die genutzten Organismen angewandt. Die üblichen Methoden zur Optimierung der Effizienz von Mikroorganismen in industriellen Prozessen zielen auf die Verbesserung des Substratflusses in Richtung des gewünschten Endprodukts ab. Stöchiometrische Methoden wie die Flußanalyse liefern aussagekräftige Daten, an welchen Stellen im Metabolismus angesetzt werden sollte um die Produktivität zu steigern (Becker et al., 2011; Curran et al., 2012; Kroemer et al., 2006; Neuner und Heinzle, 2011). Für die Optimierung von Reaktionen mit Zellextrakten oder permeabilisierten Zellen können diese Verfahren ebenfalls genutzt werden. Quellen für die nötigen Netzwerkdaten sind öffentliche Datenbanken (siehe Datenbanken, Seite 27). Thermodynamische Eigenschaften von Biosynthesewegen geben weitere Anhaltspunkte über die Abläufe in Biosynthesen und werden zunehmend verfügbar (Bujara und Panke, 2012; Soh et al., 2012). Ein vollständiges Netzwerkmodell müsste zusätzlich zu Stöchiometrie und

Thermodynamik auch kinetische Daten enthalten, welche allerdings wesentlich schwerer vorherzusagen sind, da auch regulatorische Effekte einfließen.

### **Enzymatische Reaktionen**

Lebende Zellen basieren auf metabolischen Netzwerken mit überragend effizienten Synthesewegen zur Erzeugung von essentiellen Zwischenstufen und Molekülbausteinen (Yuryev und Liese, 2010). Enzyme, welche dieselbe Reaktion katalysieren, aber unterschiedlicher Herkunft sind, sind oft in ihren Struktur-Funktions-Eigenschaften stark konserviert, während die Primärstruktur der Proteine stärker variieren kann (Weinig et al., 2003). Tausende bereits charakterisierte Sekundärmetabolite und die unzähligen noch zu entdeckenden Strukturen geben einen Eindruck über das synthetische Potential, auf welches die Natur zurückgreifen kann.

Enzyme verwenden zur Katalyse biochemischer Umwandlungen häufig Cofaktoren und Coenzyme um den Bedarf an Energie, Redoxequivalenten und Monomerbausteinen zu decken. Enzyme können dadurch sogar thermodynamisch rückwärts gerichtete Reaktionen katalysieren (Wessjohann et al., 2012). Bezüglich permeabilisierter Zellen ist dabei zu unterscheiden, ob diese gelöst, oder als prosthetische Gruppe in das Enzym integriert sind. Zytosolische Cofaktoren können in permeabilisiertem Zustand aus der Zelle ausgewaschen werden und sind daher entscheidende Variablen im Designprozess von Synthesekaskaden in permeabilisierten Zellen. In Tabelle 2 sind wichtige Cofaktoren aufgelistet.

**Tabelle 2:** Cofaktoren und prosthetische Gruppen

<b>Cofaktor / prosthetische Gruppe</b>	<b>Übertragene Gruppen</b>	<b>Vorkommen</b>
$\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid /phosphat (NAD/NADP)	Elektronen	Bakterien, Archaeen und Eukaryonten (Pollak et al., 2007)
3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfat	Sulfat	Bakterien, Archaeen und Eukaryonten (Negishi et al., 2001)
Adenosine-5'-triphosphat (ATP)	Phosphat, Energie durch Hydrolyse	Bakterien, Archaeen und Eukaryonten
Ascorbinsäure	Elektronen	Bakterien, Archaeen und Eukaryonten (Linster und Van Schaftingen, 2007)
Biotin	CO <sub>2</sub>	Bakterien, Archaeen und Eukaryonten (Jitrapakdee und Wallace, 2003)
Cobalamin	Wasserstoff, Methylgruppen	Bakterien, Archaeen und Eukaryonten (Banerjee und Ragsdale, 2003)
Coenzym A	Acetyl- und andere acyl-Gruppen	Bakterien, Archaeen und Eukaryonten (Leonardi et al., 2005)
Coenzym B	Elektronen	Methanogene Organismen (Noll et al., 1986)
Coenzym F420	Elektronen	Methanogene Organismen und manche Bakterien (Mack und Grill, 2006)
Coenzyme M	Methylgruppen	Methanogene Organismen (Taylor und Wolfe, 1974)

<b>Cofaktor / prosthetische Gruppe</b>	<b>Übertragene Gruppen</b>	<b>Vorkommen</b>
Coenzyme Q	Elektronen	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Crane, 2001)
Cytidin-triphosphat	Diacylglycerol und Lipid-Endgruppen	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten
Flavin mononucleotid	Elektronen	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Joosten und van Berkel, 2007)
Flavin-adenin-dinucleotid (FAD)	Elektronen	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Joosten und van Berkel, 2007)
Glutathion	Elektronen	Manche Bakterien und die meisten Eukaryoten (Meister und Anderson, 1983)
Häm	Elektronen	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Wijayanti et al., 2004)
Lipoamide	Elektronen, acyl-Gruppe	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten
Menaquinon	Carbonyl-Gruppen und Elektronen	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Soballe und Poole, 1999)
Methanofuran	Formyl-Gruppe	Methanogene Organismen (Vorholt und Thauer, 1997)
Methylcobalamin	Acyl-Gruppe	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Banerjee und Ragsdale, 2003)
Molybdopterin	Atomarer Sauerstoff	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Mendel und Hansch, 2002)
Nucleotid-Zucker	Monosaccharide	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Ginsburg, 1978)
Pyridoxalphosphat	Amino- und carboxyl-Gruppen	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Eliot und Kirsch, 2004)
Pyrrroloquinolin-quinon	Elektronen	Bakterien (Salisbury et al., 1979)
S-Adenosylmethionin (SAM)	Methylgruppen	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Chiang et al., 1996)
Tetrahydrobiopterin	Atomarer Sauerstoff und Elektronen	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Thony et al., 2000)
Tetrahydrofolsäure	Methyl-, formyl-, methylen- und formimino-Gruppen	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Donnelly, 2001)
Tetrahydromethanopterin	Methylgruppen	Methanogene Organismen (Dimarco et al., 1990)
Thiamin-pyrophosphat	$\alpha$ -C-Verknüpfung	Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (Frank et al., 2007)

Wasser hat durch Entropieeffekte, Säure-Base-Katalyse und Auswirkungen auf die Tertiärstruktur eine besondere Funktion bei Enzymreaktionen. Es beeinflusst die Aktivität des Enzyms und die Bindung der Substrate (Branco et al., 2009). Organische Lösemittel beeinflussen nicht nur die Löslichkeit von Edukten und Produkten, sondern wirken sich auch stark auf die Struktur der Enzyme aus, was im schlimmsten Fall zum Aktivitätsverlust führt (Trodler und Pleiss, 2008). Die Verwendung organischer Lösemittel in multienzymatischen Synthesen ist daher schwierig.

Enzyme katalysieren die Umsetzung des bevorzugten Substrats meist sehr selektiv. Dennoch kommt es vor, dass ein breites Spektrum an Substraten gebunden werden kann. Dies erschwert zwar das Design komplexer Reaktionsnetzwerke, eröffnet aber auch Möglichkeiten zur Verwendung von Substratanaloga. Diese können genutzt werden um Derivate natürlicher Moleküle herzustellen, deren Eigenschaften sich von den primären Produkten unterscheiden (Struck et al., 2012).

### **Enzymkinetik**

Obwohl biosynthetische Netzwerke generell denselben Prinzipien wie isolierte Enzyme unterliegen, sind einige Besonderheiten zu beachten. Agglomerate führen zu Effekten wie Substrat-channeling, bei dem Zwischenprodukte nicht durch Diffusion über das Cytosol, sondern gezielt zwischen Enzymen oder Untereinheiten großer Enzymkomplexe wandern (Minton, 2006; Myung et al., 2013; You et al., 2012; You und Zhang, 2013; You und Zhang, 2013; You und Zhang, 2014; Zhang, 2011). Kinetische Modelle von biosynthetischen Netzwerken können auf unterschiedliche Weise erstellt werden. Das einfachste Modell bezieht sich auf die Untersuchung der Einzelschritte. Der limitierende Schritt einer Kaskade gibt daher die Reaktionsgeschwindigkeit vor (Wilson et al., 2013). Ein anderer Ansatz bildet die Untersuchung des Netzwerks als Ganzes, wobei oft power-law oder lin-log Kinetiken eingesetzt werden (Heinzle et al., 2007; Link et al., 2013; Wu et al., 2012). Im Fall permeabilisierter Zellen ist es möglich gewünschte Substrate zuzusetzen und auf unerwünschte zu verzichten. Dennoch bleiben alle Enzyme aktiv und katalysieren entsprechende Biotransformationen, wenn deren Substrate verfügbar sind. Bei komplexeren Reaktionskaskaden kann es daher vorkommen, dass Intermediate durch unerwünschte Nebenreaktionen verbraucht werden. Durch gezielte Deletion eines Gens und damit verknüpfter Entfernung des entsprechenden Enzyms aus dem metabolischen Netzwerk, lassen sich Nebenreaktionen unterdrücken, solange die Deletion nicht letal für den Wirtsorganismus ist (Krauser et al., 2012). Gleichgewichte zwischen Edukt und Produkt, welche bei Enzymreaktionen sehr häufig sind, lassen sich durch Zugabe der Substrate im Überschuss auf die Produktseite verschieben, wobei der Konzentrationsbereich für Aktivität der Enzyme beachtet werden muss (Broadwater et al., 2005). Das kann von enormem Vorteil für Reaktionen in permeabilisierten Zellen sein.

Durch die Isolierung von Enzymen büßen diese oft einen Teil ihrer natürlichen Aktivität ein, oder werden gänzlich zerstört. Die Stabilität von Enzymen hängt von der Umgebung ab, in welcher sie aufbewahrt werden. Mechanischer Stress und chemische Alterung können teilweise drastische Effekte auf die Aktivität haben (Treitz et al., 2001; Wohlgemuth, 2007). Durch die Verwendung von permeabilisierten Zellen wird dies umgangen. Enzyme und Megacluster lassen sich sogar mehrere Tage lagern ohne größeren Aktivitätsverlust (Felix, 1982; Yuan und Heinzle, 2009).

## **Sekundärmetabolite**

Sekundärmetabolite sind sehr nützliche Leitstrukturen für die Entwicklung neuartiger pharmazeutischer Wirkstoffe (Clardy und Walsh, 2004). Die Methoden zur Entdeckung und Strukturaufklärung von Naturstoffen werden immer effektiver (Hoffmann et al., 2014) und das Interesse an einer synthetischen Produktion steigt (Bode und Müller, 2005; Brachmann und Bode, 2013; Walsh et al., 2013; Wong und Khosla, 2012; Wu et al., 2012). Synthesen solcher Substanzen und ihrer Derivate in permeabilisierten Zellen würden diese Entwicklung zusätzlich unterstützen.

Besonders Syntheseenzyme für Sekundärmetabolite sind oft in Syntheseclustern zusammengeschlossen und werden meist über zusammenhängende Operons auf genetischer Ebene codiert (Kim et al., 1994; Pickens und Tang, 2009; Pulsawat et al., 2007; Schultz et al., 2008; Tang et al., 2004). Bislang ist es nur schwer möglich Synthesecluster in aktiver Form zu isolieren und eine Rekonstruktion *in vitro* konnte nur für kleinere Komplexe realisiert werden (Cryle und Schlichting, 2008; Schlichting und Cryle, 2009). Substratchanneling in Megaclustern ermöglicht eine effektive Umsetzung der Zwischenstufen und verhindert die Entstehung unerwünschter Nebenprodukte.

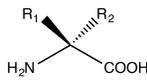
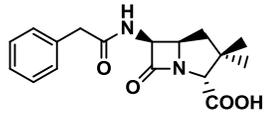
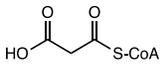
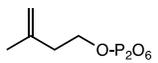
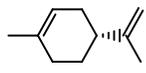
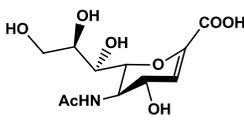
Toxische Wirkungen der meisten Sekundärmetabolite auf etablierte biotechnologische Produktionsstämme machen oft Resistenzen gegen die Produkte nötig und schränken die Ausbeute ein (Stevens et al., 2010). Durch den Einsatz permeabilisierter Zellen ließe sich eine Reihe toxischer Effekte umgehen, z.B. solche mit Auswirkungen auf die Membran oder die Replikation der Zellen. Meist werden die nativen Produzenten in großem Maßstab kultiviert und die Produkte unter hohem Aufwand isoliert. Die Verwendung permeabilisierter Zellen zeigt bei der Synthese von Naturstoffderivaten ihre Stärke. Die Nutzung von permeabilisierten Zellen zur Synthese macht es möglich, durch induzierte Expression von Enzymen heterologe Organismen zur Produktion zu nutzen, welchen Resistenzgene oder spezielle Transporter fehlen. Das Wachstum kann ohne Einschränkungen stattfinden und mögliche toxische Effekte durch die Anreicherung heterologer Produkte werden auf die Syntheseenzyme beschränkt. Hohe Expressionsraten ermöglichen zusätzlich eine Erhöhung der Enzymmenge, welche im Fall von Megasynteseclustern in der Regel auf wenige Kopien pro Zelle beschränkt ist. Die Raumzeitausbeute kann ebenfalls gesteigert werden, da die Zelldichte im Vergleich zu Fermentationen bei Ansätzen mit permeabilisierten Zellen über weite Bereiche frei wählbar ist (Krauser et al., 2012).

Megasyntesecluster gezielt zu nutzen ist ein neuartiger Ansatz mit diversen Vorteilen. Synthesekomplexe können durch die Verwendung in permeabilisierten Zellen direkt adressiert werden, so dass die Reaktionsbedingungen recht einfach kontrolliert werden können. Die Wirkung niedriger Konzentrationen von Detergenzien ist einigermaßen selektiv auf die Zellwand und Membran beschränkt. In wie weit Synthesecluster durch die Behandlung mit Permeabilisierungsreagenzien beeinflusst werden, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Das verwendete Detergenz kann aber einen Effekt auf die Struktur des Komplexes haben. Nur wenige Synthesecluster wurden bislang detailliert untersucht (Wilson et al., 2013).

Die Aufklärung von Reaktionsmechanismen und Zwischenstufen ausgehend von bekannten Startmonomeren ist sehr aufwändig. Forschungen auf diesen Gebieten werden nicht nur Erkenntnisse über die Evolution dieser biosynthetischen Werkzeuge liefern, sondern auch Ansatzpunkte liefern, wie man gezielt Änderung vornehmen kann um Enzymkomplexe den Ansprüchen praktischer Synthesen anzupassen. In Tabelle 3 sind die wichtigsten Sekundärmetabolitklassen mit dem entsprechenden Monomer aus dem Zentralmetabolismus aufgeführt.

In der Natur sind Kombinationen aus den Substanzklassen üblich, beispielsweise bei der Alkaloidsynthese in Pflanzen (Weissman und Mueller, 2008). Im letzten Jahrzehnt gab es bei der Erforschung von Syntheseclustern erstaunliche Fortschritte. Ausführliches Wissen über Genome erlaubt es zunehmend Gencluster zu identifizieren und zu aktivieren (Findrik und Vasic-Racki, 2009; Ochi, 2013). Die Verwendung von Streptomyceten und Myxokokken zur Sekundärmetabolitproduktion vermehrt zunehmend die Anwendungsmöglichkeiten für permeabilisierte Zellen (Boddy und Garza, 2010; Medema et al., 2011; Medema et al., 2011; Medema et al., 2011). Auch werden vermehrt Anstrengungen unternommen synthetische Anordnungen von Enzymen in Nanokontainern oder auf DNA-Strängen zu realisieren. (Akai et al., 2010; Caiazza et al., 2009; Fowler und Koffas, 2009; Santacoloma et al., 2011).

**Tabelle 3:** Sekundärmetabolitklassen, Monomerbausteine und bekannte Beispielmoleküle

Sekundärmetabolitklasse	Enzymkomplex	Monomer	Beispiel
Peptide	Nicht-ribosomale Peptid Synthasen	 Aminosäuren	 Penicillin G (Antibiotikum)
Polyketide	Polyketid Synthasen Typ I-III	 Malonyl-CoA	 Radicol (Antibiotikum)
Isoprenoide	Prenylierende Enzyme	 Isoprenyl-pyrophosphat	 S (-) Limonen (Aroma)
Kohlenhydrate	Kohlenhydrat Synthasen	$R-(C_nH_{2n-1}O_{n-1})$ aktivierte Zucker R = aktivierender Rest (z.B.: UDP)	 Neu5Ac2en (Antiviral)

## **Künstliche Enzyme**

Sehr interessant ist die Modifikation von Enzymen für spezielle Anwendungen. Besonders die Resistenz gegenüber organischen Lösemitteln und hohen Temperaturen, sowie die Stabilität und Immobilisierungsalternativen sind Ziele des Enzymengineering. Am Computermodell vorhergesagte Enzyme zur Katalyse bislang unbekannter Reaktionen sind ebenfalls Forschungsthemen (Richter et al., 2011). Enzym-Substrat-Wechselwirkungen auf der Ebene des Übergangszustands ermöglichen die Simulation von Reaktionen, welche Enzyme bislang noch nicht katalysieren können. Molekularbiologische Methoden und die Automatisierung des Screenings durch Roboter erleichtern high-throughput Analysen großer Enzymbibliotheken aus gerichteter Evolution. Rationales Design von katalytisch aktiven Zentren erlaubt darüber hinaus die Selektivität und den Reaktionsverlauf am Computer vorherzusagen und durch gezielte Mutationen umzusetzen. Auch ganze Biosynthesewege werden bereits auf diese Weise optimiert (Bar-Even und Tawfik, 2013; Nestl et al., 2011).

## **Netzwerkanalyse**

Für simple Synthesen mit kurzen Routen und wenigen Reaktionspartnern ist die Übersichtlichkeit noch gegeben und eine manuelle Optimierung mit einfachen Mitteln umzusetzen. Mit zunehmender Komplexität des Zielmoleküls und der daraus resultierenden Zunahme an Substraten und potentiellen Nebenreaktionen, wird es anspruchsvoller Netzwerke entsprechend anzupassen und eine verlässliche Vorhersage durch *in silico* Daten umso wichtiger. Unerwünschte Nebenreaktionen können drastisch zunehmen, wenn mehrere Intermediate unkontrolliert abreagieren können. Daher ist es sehr wichtig das Design komplexer Biosynthesen durch geeignete informatische Methoden zu unterstützen. Informationen hierzu sind in öffentlichen Datenbanken verfügbar und es sind bereits *in silico* Methoden entwickelt worden um Netzwerkmodelle von zellfreien Biokatalysesystemen zu erstellen (Bujara und Panke, 2012). Netzwerkmodelle können unvorteilhafte Routen vorhersagen und Verbesserungsvorschläge liefern, um das genomweite Netzwerk durch entsprechende Modifikationen anzupassen (Feist et al., 2007). Beispiele für diese Anwendungen sind bislang rar. Es ist davon auszugehen, dass die Forschung auf diesem Gebiet zunimmt. Netzwerkmodelle für lebende Organismen sind schon weit verbreitet und liefern bereits recht genaue Vorhersagen.

Die Planung und Entwicklung biosynthetischer Prozesse wird durch *in silico* Vorhersagen effektiv gestützt. Zunehmend finden Computermodelle auch Anwendung bei der Optimierung von Mikroorganismen in der industriellen Produktion (Kroemer et al., 2006; Neuner und Heinzle, 2011). Die Qualität der Vorhersagen hängt von der Verfügbarkeit und der Exaktheit entsprechender Daten in Datenbanken ab. Die meisten Netzwerkmodelle basieren auf der Stöchiometrie der Einzelreaktionen. Seltener werden auch kinetische Informationen und regulatorische Effekte einbezogen. Die Information

aus Datenbanken ermöglicht die Programmierung von Netzwerkrekonstruktionen, welche als Grundlage für die Entstehung weiterer bioinformatischer Verarbeitungsmethoden dienen. Solche Netzwerkrekonstruktionen können dazu genutzt werden Netzwerkpfade für biokatalytische Anwendungen zu analysieren und daraus Ansätze zur Optimierung der Syntheserouten abzuleiten.

### **Datenbanken**

Biologische Datenbanken können, abhängig von ihrem Inhalt in mehrere Kategorien unterteilt werden. Dazu zählen biochemische Datenbanken, genomische Datenbanken, Protein- und Enzymdatenbanken, Netzwerkdatenbanken und Modelldatenbanken (Tabelle 4).

#### **Biochemische Datenbanken**

Rhea ist eine manuell erstellte und von Experten gepflegte Reaktionsdatenbank mit Hauptaugenmerk auf enzymatisch katalysierte Reaktionen (Alcantara et al., 2012). Alle Reaktanden sind mit ChEBI verlinkt, wo physikalische Eigenschaften bereitgestellt werden (de Matos et al., 2012). Die Daten sind stöchiometrisch korrekt und Reaktionsrichtung und Ladungsausgleich, soweit bekannt, angegeben. SABIO-RK sammelt Daten zur Reaktionskinetik biochemischer Reaktionen (Wittig et al., 2012). Substrate und empirische Daten zu Reaktionsgeschwindigkeiten in experimentellen Setups werden dort aufgeführt. Die Transporter Classification Database enthält funktionelle und phylogenetische Informationen über membranständige Transportproteine, eingeteilt in ein Transporter Klassifikationssystem (TC) (Saier et al., 2009). Die Datenbank enthält geprüfte Angaben aus mehr als zehntausend Veröffentlichungen und über 5600 Proteinsequenzen von etwa 600 Transporterproteintypen. TransportDB ergänzt diese Angaben durch die Verknüpfung komplementärer Sequenzen aus den Genomen von mehr als 365 Organismen (Ren et al., 2007).

#### **Genomdatenbanken**

Genomdatenbanken enthalten Nukleotidsequenzen und Anmerkungen zur Funktion einzelner Gene. GenBank vom National Center for Biotechnology Information ist eine öffentlich zugängliche Datenbank mit bibliografisch annotierten genomischen Daten von über 260000 Organismen (Benson et al., 2013).

#### **Protein- und Enzymdatenbanken**

Auskunft über Funktion und Struktur von Proteinen und Enzymen kann in Protein und Enzymdatenbanken eingeholt werden. Die Braunschweig Enzyme Database (BRENDA) enthält manuell ausgewertete Daten aus Primärliteratur über Klassifikation, Nomenklatur, Reaktionen, Spezifität, Funktion, Struktur, Vorkommen, Gewinnung und Verwendung von Enzymen (Scheer et al., 2011). Die aufgeführten Enzyme sind verlinkt mit metabolischen Netzwerken, Proteinsequenzen und Gensequenzen der Organismen, in welchen sie vorkommen. Die Universal Protein Resource (UniProt) besteht aus UniProt Knowledge Base (UniProtKB), UniProt Reference Clusters (UniRef), UniProt Archive (UniParc) und UniProt Metagenomic and Environmental Sequences (UniMES). UniProtKB enthält alle zur Verfügung stehenden

Angaben über die Aminosäuresequenz, Proteinname und eine Beschreibung, taxonomische Angaben und Referenzen über Zitierungen. Zusätzlich werden Ontologie, Klassifikation, Querverweise und Aussagen über die Qualität der Angaben aufgeführt. UniProtKB ist aufgeteilt in zwei Sektionen bestehend aus UniProtKB/SwissProt mit begutachteten, manuell eingetragenen Daten und UniProtKB/TrEMBL mit automatisch generierten Einträgen ohne manuelle Bearbeitung (stand April 2013). UniRef enthält Gruppierungen von Varianten und Isoformen aus UniProtKB, sowie ausgewählte Einträge aus UniParc mit dem Ziel einen umfassenden Überblick über die Proteinsequenzen auf diversen Ebenen zu ermöglichen. In UniParc sind alle öffentlich zugänglichen Proteinsequenzen hinterlegt.

### **Netzwerkdatenbanken**

Netzwerkdatenbanken enthalten Daten über chemische Routen, Reaktionen und Stoffe sowie die Interaktionen zwischen diesen, beschreiben also die Biochemie des Metabolismus. Solche Datenbanken ermöglichen die graphische Darstellung von Informationen über Synthesewege mittels Netzwerkkarten. BioCyc 16.1 ist eine Zusammenstellung von Netzwerkdatenbanken welche Daten über das Genom eines bestimmten Mikroorganismus enthalten (Caspi et al., 2012). Die Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) ist die umfassendste Netzwerkdatenbank. In ihr sind die Informationen aus fast allen Datenbanken zusammengefasst und direkt verlinkt. Neben den metabolischen Netzwerken zahlreicher Organismen können auch Daten über Reaktionen, Metabolite und Krankheitsbilder abgefragt werden. Die BioPath Datenbank ist eine digitale Weiterentwicklung der Biopathways der Roche AG welche die erste metabolische Karte eines gesamten Organismus darstellte (Michal und Schomburg, 2012). Eine Datenbank für Biokatalyse und biologischen Abbau der Universität von Minnesota (UM-BBD) enthält Informationen über die Aktivität xenobiotischer Stoffe auf den Metabolismus (Gao et al., 2010). MetaNetEx.org bietet automatisierte Genidentifizierung in großen metabolischen Netzwerken über die Verlinkung zu Genomen an (Ganter et al., 2013).

### **Modelldatenbanken**

Mathematische Modelle biologischer Systeme werden in Modelldatenbanken über Rekonstruktionen einfacher Synthesewege bis hin zu genomskaligen Netzwerken zusammenfasst. Die BiGG database ist eine genomskalige Netzwerkrekonstruktion, basierend auf biochemischen, genetischen und genomischen Daten (Schellenberger et al., 2010). BioModels enthält Modelle aus begutachteten Publikationen, sowie anhand von Netzwerkdaten computergenerierte Modelle aus der Path2Models Initiative (Li et al., 2010).

### **Organismusspezifische Datenbanken**

Häufig verwendete Organismen sind von besonderem Interesse und daher sind umfassende und verlässliche Datenbanken zu deren Eigenschaften wie z.B. EcoCyc für *E. coli* oder SGD für *S. cerevisiae* vorhanden (Caspi et al., 2012; Keseler et al., 2011).

Die Planung biochemischer Synthesen beinhaltet neben weiteren Aspekten die Aufdeckung möglicher Nebenreaktionen. Es wäre daher von Vorteil wenn alle möglichen Reaktionen katalysiert durch ein

bestimmtes Enzym, sowie die thermodynamischen und kinetischen Parameter bekannt sind. Bislang existiert noch keine Datenbank, die diese Daten in einer umfassenden Weise systematisch zur Verfügung stellen kann.

**Tabelle 4:** Datenbanken

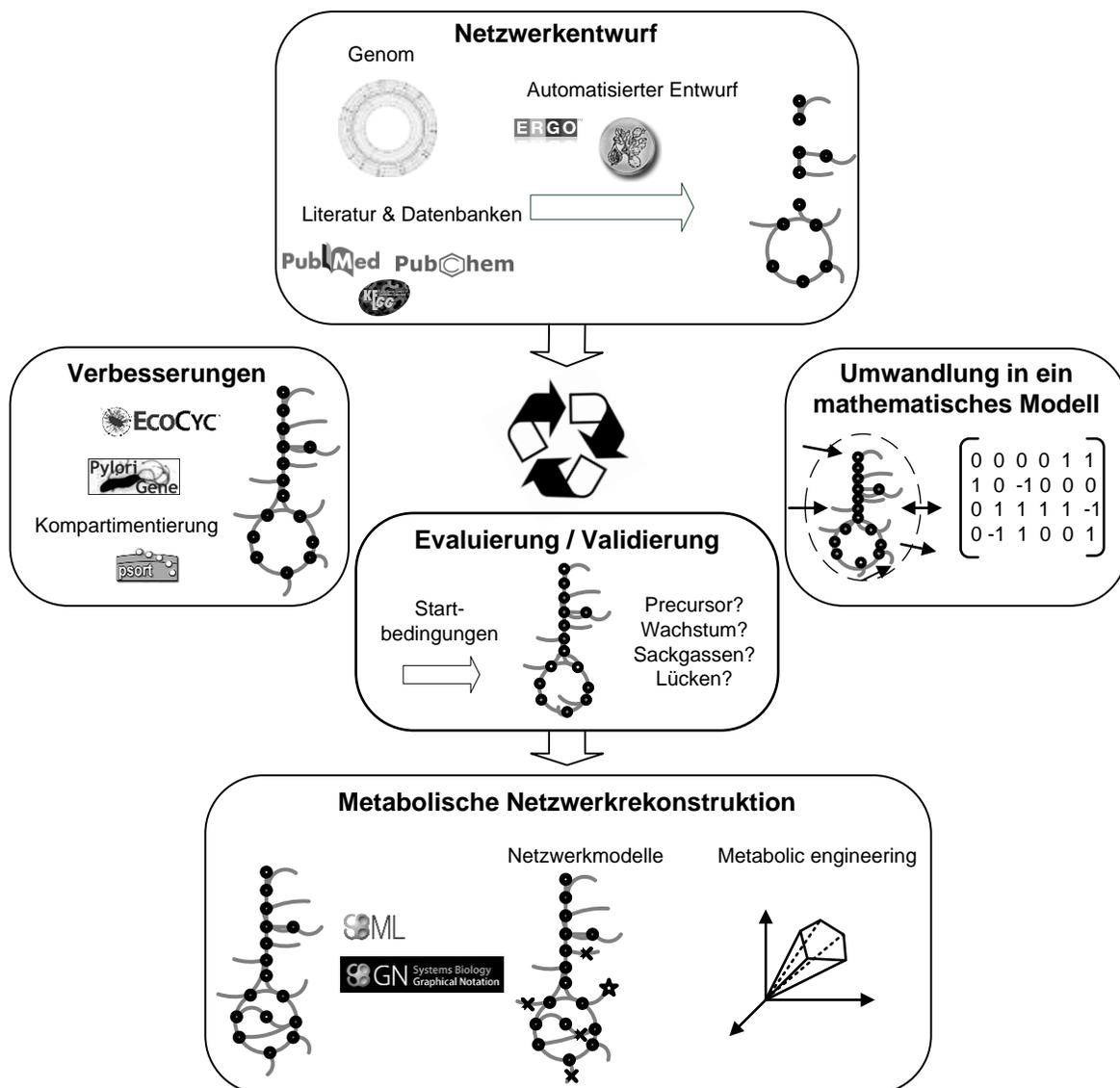
Datenbank	URL	Information
<b>Biochemische Datenbanken</b>		
<i>PubChem</i>	<a href="http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/">http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Moleküle und deren Aktivität in Enzymassays
<i>ChEBI</i>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/chebi/">http://www.ebi.ac.uk/chebi/</a>	Chemische Untereinheiten von biologischem Interesse
<i>TCDB</i>	<a href="http://www.tcdb.org/">http://www.tcdb.org/</a>	Transporter Klassifikationen
<i>Transport DB</i>	<a href="http://www.membranetransport.org/">http://www.membranetransport.org/</a>	Transportproteine
<i>SABIO-RK</i>	<a href="http://sabio.villa-bosch.de/">http://sabio.villa-bosch.de/</a>	Reaktionskinetik
<i>Rhea</i>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/rhea/">http://www.ebi.ac.uk/rhea/</a>	Kommentare zu chemischen Reaktionen
<b>Genomdatenbanken</b>		
<i>GEM</i>	<a href="https://www.gem.re.kr/">https://www.gem.re.kr/</a>	Genome Encyclopedia of Microbes
<i>GenBank</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/</a>	Kommentierte Sammlung öffentlicher DNA-Sequenzen
<i>NCBI Entrez Genome</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome</a>	Sequenzdaten und Karten von über 1000 Genomen
<i>NCBI Entrez Gene</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a>	Gendatenbank
<i>GO</i>	<a href="http://www.geneontology.org/">http://www.geneontology.org/</a>	The Gene Ontology
<i>EMBL</i>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/embl/">http://www.ebi.ac.uk/embl/</a>	Europäische Nucleotidsequenz Datenbank
<b>Protein- und Enzymdatenbanken</b>		
<i>BRENDA</i>	<a href="http://www.brenda-enzymes.info/">http://www.brenda-enzymes.info/</a>	Umfassende Enzyminformationen
<i>Expasy - ENZYME</i>	<a href="http://www.expasy.org/enzyme">http://www.expasy.org/enzyme</a>	Enzymnomenklaturdatenbank
<i>UniProt</i>	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>	The Universal Protein Resource
<i>PSORTdb</i>	<a href="http://db.psort.org/">http://db.psort.org/</a>	Zelluläre Lokalisierung von Proteinen
<i>ProLinks</i>	<a href="http://prl.mbi.ucla.edu/prlbeta/">http://prl.mbi.ucla.edu/prlbeta/</a>	Störende funktionelle Wechselwirkungen von Proteinen
<i>STRING</i>	<a href="http://string-db.org/">http://string-db.org/</a>	Abfrage von Interagierenden Genen/Proteinen
<i>IntAct</i>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/intact/">http://www.ebi.ac.uk/intact/</a>	Datenbank für molekulare Wechselwirkungen
<b>Netzwerkdatenbanken</b>		
<i>KEGG</i>	<a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
<i>BioCyc</i>	<a href="http://biocyc.org/">http://biocyc.org/</a>	Sammlung von 1962 Netzwerk/Genome Datenbanken
<i>BioPath</i>	<a href="http://www.molecular-networks.com/biopath3">http://www.molecular-networks.com/biopath3</a>	Biomoleküle, Reaktionen und Netzwerke
<i>ExpASY - Biochemical Pathways</i>	<a href="http://web.expasy.org/pathways/">http://web.expasy.org/pathways/</a>	Digitale Version der „Biopathways“ von Roche
<i>UniPathway</i>	<a href="http://www.grenoble.prabi.fr/obiwarehouse/unipathway">http://www.grenoble.prabi.fr/obiwarehouse/unipathway</a>	Metabolische Netzwerke
<i>UM-BBD</i>	<a href="http://umbbd.ethz.ch/">http://umbbd.ethz.ch/</a>	Biokatalyse/Stoffwechsel Datenbank

Datenbank	URL	Information
<b>Netzwerkmodelle</b>		
<i>BiGG</i>	<a href="http://bigg.ucsd.edu/">http://bigg.ucsd.edu/</a>	Basis genomskaliger metabolischer Netzwerkrekonstruktionen
<i>BioModels</i>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/">http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/</a>	Veröffentlichte Netzwerkmodelle (kommentiert)
<b>Organismusspezifische Datenbanken</b>		
<i>EcoCyc</i>	<a href="http://ecocyc.org/">http://ecocyc.org/</a>	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655
<i>SGD</i>	<a href="http://www.yeastgenome.org/">http://www.yeastgenome.org/</a>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Genome Database

## Netzwerkrekonstruktion

Rekonstruktionen metabolischer Netzwerke sind strukturierte Datenbanken, welche verfügbare Daten aus Genetik, Genomics und Biochemie über einen Organismus vereinen (Reed et al., 2006). Im Allgemeinen beinhaltet eine genomskalige Netzwerkrekonstruktion eine Liste aus Reaktionen, ihrer Stöchiometrie, den entsprechenden Genen und Enzymen, sowie ausführlicher Charakterisierungen mit Quellenangaben. Ziel der Rekonstruktion ist eine genaue Definition der chemischen Prozesse im Stoffwechsel und ermöglicht eine berechenbare, mathematische Darstellung des Metabolismus für *in silico* Experimente (Zomorodi et al., 2012). Die Entwicklung einer Netzwerkrekonstruktion besteht aus fünf grundlegenden Schritten (Schema 1) (Thiele und Palsson, 2010). Begonnen wird mit einem Entwurf des Netzwerks, welcher eine Liste der Gene mit den zugordneten Reaktionen und entsprechenden EC-Nummern beinhaltet. Der Entwurf basiert auf den aktuellsten Datenbankinformationen über das Genom und entspricht einer Sammlung der genomcodierten Funktionen des Metabolismus. Relevante Informationen zu jedem Gen sind Funktion, Lokalisierung auf dem Genom, Strang und Locusname und codiertes Protein. In Eukaryonten ist auch die Existenz alternativer Transkripte von Relevanz, welche spezielle Funktionen erfüllen oder zelluläre Lokalisierung indizieren (Thiele und Palsson, 2010). Die Erstellung eines Entwurfs wird in der Regel automatisch mit Hilfe entsprechender Software durchgeführt (Schema 1). Um den Entwurf zu verbessern ist eine manuelle Verfeinerung nötig. Zunächst wird die Konsistenz geprüft und fehlende Eingaben ergänzt. Route für Route wird begutachtet und mit vorhandenen Netzwerkkarten, beispielsweise KEGG, abgeglichen. Eine stimmige Stöchiometrie beinhaltet Stoff- und Elementbilanzen, sowie einen Ladungsausgleich. Auch die Beurteilung von Gleichgewichtslagen und Reaktionsrichtung muss manuell erfolgen. Besonderheiten wie die Verwendung von Cofaktoren werden ebenfalls von Hand geprüft. Thermodynamische Daten sind sehr nützlich, müssen aber von Hand eingegeben werden. Entsprechende Daten sind nur selten verfügbar und eher für kleinere Netzwerke praktikabel. Intrazelluläre Transportreaktionen in Eukaryonten können sehr wichtig sein und müssen daher bei der manuellen Evaluation berücksichtigt werden. Falsche Zuordnungen können große Probleme bereiten und zu Lücken im Netzwerk führen. Die Umwandlung der Netzwerkrekonstruktion in ein mathematisches Modell erfolgt größtenteils automatisiert. Eine stöchiometrische Matrix wird anhand der definierten Reaktionen generiert

und Randbedingungen hinzugefügt, wie z.B. die Definition extrazellulärer und intrazellulärer Metabolite. Anschließend erfolgt eine Evaluation und Validierung der Rekonstruktion. Das Modell wird auf die Fähigkeit getestet alle benötigten Metabolite synthetisieren und balancieren zu können. Zudem sollte das Verhalten des Netzwerks bei Störungen dem des Organismus möglichst entsprechen (Haggart et al., 2011). Netzwerkrekonstruktionen können in mehreren Anwendungen mit unterschiedlichen Zielen verwendet werden. Die Auswertung von „high throughput“ Daten kann enorm beschleunigt werden. Neue Netzwerkeigenschaften können ebenso wie intergenetische Zusammenhänge basierend auf Hypothesen entdeckt werden. Im metabolic engineering dient die Netzwerkrekonstruktion als Ausgangspunkt zur Identifizierung von Engpässen im Substratfluss und ermöglicht den Test von Phänotypen ohne praktische Laborarbeit.



**Schema 1:** Arbeitsabläufe bei einer iterativen Erstellung von Netzwerkrekonstruktionen

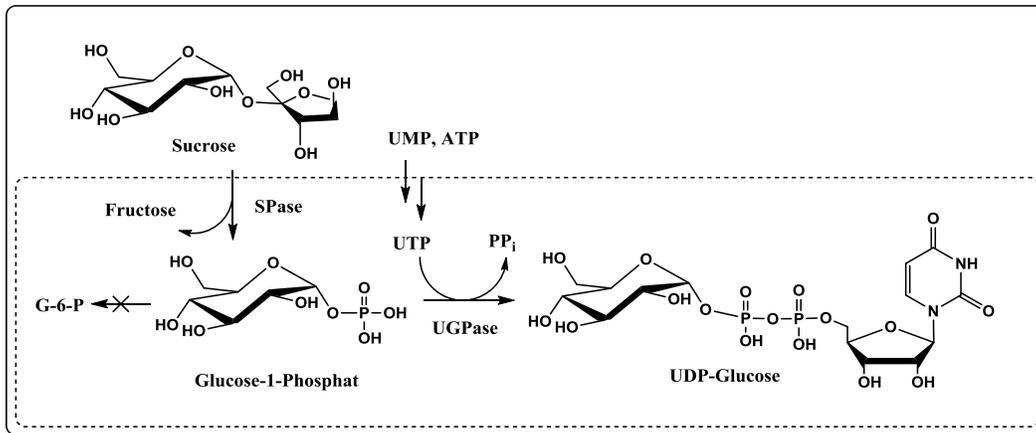
### **Design und Bearbeitung metabolischer Netzwerke**

Die Planung von Biosynthesen mit permeabilisierten Zellen besteht hauptsächlich darin eine Syntheseroute aus den zur Verfügung stehenden metabolischen Pfaden auszuwählen. Ziel ist es aus möglichst einfachen Substraten selektiv und mit hoher Ausbeute das gewünschte Produkt zu produzieren. Unerwünschte Nebenreaktionen können vermieden werden, indem das jeweilige Substrat selektiv in ein Produkt umgewandelt wird oder Reaktionskomponenten nicht zur Verfügung stehen. Die größte Herausforderung besteht darin den Reaktionsansatz so zu wählen, dass möglichst keine Änderungen am Metabolismus der Wirtszelle nötig sind. Besonders im Fall von cofaktorabhängigen Reaktionen sind neue Methoden gefragt um die metabolische Versorgung zu ersetzen (Horinouchi et al., 2006; Horinouchi et al., 2012; Lee et al., 2013).

### **Anwendungen**

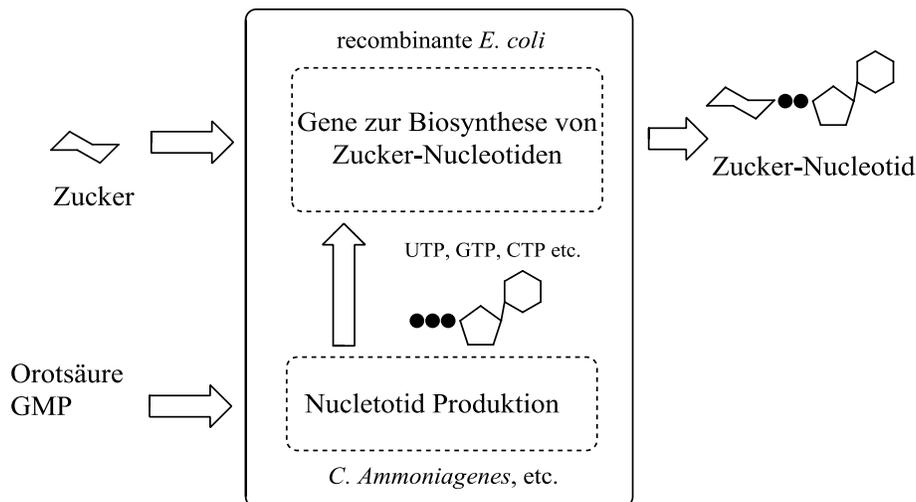
Gerichtete mehrstufige Biokatalyse mit permeabilisierten, ganzen Zellen ist eine neue Strategie zur Synthese von Feinchemikalien. Bisher sind nur wenige Beispiele für die erfolgreiche Anwendung vorhanden. Horinouchi et al. haben ein effizientes System zur Regeneration von ATP in permeabilisierten *S. cerevisiae* entwickelt und mit der Synthese von 2-Deoxyribose-5-Phosphat und 2-Deoxy-ribonucleosid gekoppelt (Horinouchi et al., 2006; Horinouchi et al., 2012). Die Möglichkeit NADPH mit permeabilisierten Zellen zu regenerieren wurde von Zhang et al. bei der Reduktion von  $\beta$ -Keto- zu  $\beta$ -Hydroxy-Estern untersucht (Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2009). Eine Regeneration von NADPH wurde über enzymatische Oxidation von Glucose in permeabilisierten *B. subtilis*, *B. pumilus* und *E. coli* erreicht. Ni et al. haben ebenfalls versucht NADPH auf diese Art zu regenerieren, wobei auch ohne Cosubstrat signifikante Ausbeuten erzielt wurden (Ni et al., 2012).

Die Synthese von UDP-Glucose konnte mit permeabilisierten *E. coli* Zellen katalysiert werden (Schema 2). Dazu wurde Sucrose-Phosphorylase aus *Leuconostoc mesenteroides* in einer *E. coli* K12  $\Delta$ pgm Phosphoglucomutase-Deletionsmutante überexprimiert. Ausgehend von Sucrose, ATP und Uridinmonophosphat konnte UDP-Glucose mit einer maximalen Rate von 52  $\mu$ M pro Minute erzeugt werden. Im Gegensatz zu Literaturangaben konnte gezeigt werden, dass  $Mn^{2+}$  der geeignetere Metall-Cofaktor für die enzymatische Katalyse im Vergleich zu  $Mg^{2+}$  ist. Der Katalysator konnte durch Zentrifugation aus der Reaktionsmischung entfernt werden, wobei maximal 2% zelluläre Proteine freigesetzt wurden.



**Schema 2:** Synthese von UDP-Glucose in permeabilisierten *E. coli*. Ausgehend von Sucrose, Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) und Uridin-5'-monophosphat konnte UDP-Glucose mit nahezu 100% Umsatz hergestellt werden. Durch Deletion von Phosphoglucomutase konnte eine unerwünschte Isomerisierung vermieden werden.

Einen ähnlichen Ansatz verwendet Kyowa Hakko Bio zur Herstellung von Nucleotiden, Zuckern und Peptiden (Schema 3). Eine Cofermentation von *C. ammoniagenes* und genetisch modifizierten *E. coli* wird hierzu mit kleinen Mengen Detergenzien versetzt (Endo und Koizumi, 2000; Endo et al., 1999; Endo et al., 2001; Endo et al., 2000; Koizumi et al., 2000; Koizumi et al., 1998). Dies ermöglicht den Substrataustausch zwischen den Zellen und beschleunigt die Aufnahme von Nucleotid-Triphosphaten in *E. coli*, welche dort zu Zucker-Nucleotiden umgesetzt werden.



**Schema 3:** Zucker-Nucleotid Synthese mit permeabilisierten *C. ammoniagenes* und *E. coli* Zellen (Endo et al., 2000; Koizumi et al., 2000; Koizumi et al., 1998). Geringe Mengen an Detergenzien erleichtern den Transport von Nucleotid-Triphosphaten zwischen den Zellen.

## Abschließende Bemerkungen

Biokatalytische Synthese mit permeabilisierten Zellen könnte die Lücke zwischen *in vivo* und *in vitro* Biotechnologie schließen. Die Kombination der Fortschritte in Genomsequenzierung und bioinformatischer Verarbeitung gibt der Biokatalyse neuen Schwung. Durch das Aufkommen genomskaliger Netzwerkmodelle können die Prozesse im Metabolismus besser verstanden werden und lassen Anwendungen, wie die Synthese mit permeabilisierten Zellen, möglich werden. Auch die zunehmend vereinfachte Modifikation von Mikroorganismen auf genetischer Ebene spielt der Implementierung in der technischen Biochemie zu (Fu et al., 2012). Die mehrstufige Biosynthese mit permeabilisierten Zellen könnte eine große Rolle bei der Herstellung komplexer Molekülstrukturen, vor allem bei deren Derivatisierung, spielen.

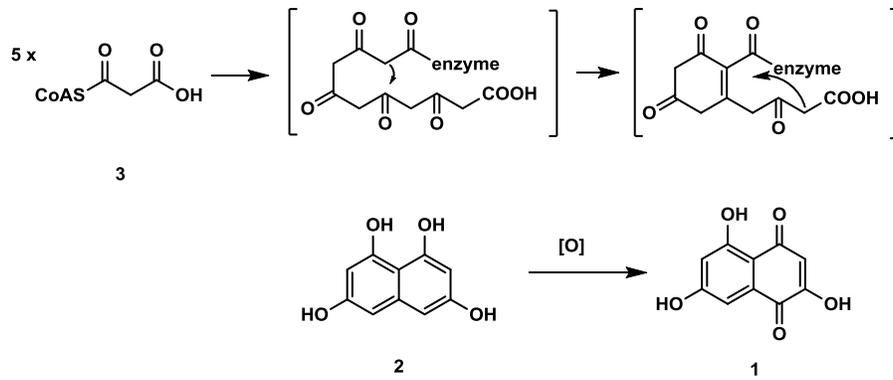
## 2.2 Polyketid-Sekundärmetabolite

Polyketide bilden eine breit gefächerte Substanzklasse der Naturstoffe. Als Leitstrukturen in der Entwicklung pharmakologisch aktiver Substanzen sind Polyketide von enormem Interesse. Wirkstoffe aus der Isolierung und Derivatisierung natürlicher Polyketid-Sekundärmetabolite decken das gesamte Spektrum therapeutischer Anwendungen ab. Die zahlreichen Strukturvariationen der Polyketide liefern Ansatzpunkte bei der Entwicklung von Verbindungen zur pharmazeutischen Nutzung.

Die sehr heterogene Substanzklasse der Polyketide vereint ein gemeinsamer Synthesemechanismus. Der Aufbau des Kohlenstoffgrundgerüsts erfolgt über Acyl-Coenzym A Monomere, welche, ähnlich der Fettsäuresynthese, meist aus Malonyl- und Acetyl-CoA, sukzessive eine Kette aufbauen. In einigen Fällen werden auch andere Substrate, wie beispielsweise Methylmalonyl-CoA eingebaut. Die Synthese der Kernstruktur erfolgt in minimalen Polyketid-Synthasen. Diese bestehen in der Regel aus einer Acyl-Carrier-Untereinheit und weiteren Untereinheiten, welche eine katalytisch aktive Tasche formen (Dutta et al., 2014). Die Struktur der resultierenden Produkte wird dabei durch die dreidimensionale Anordnung der Polyketidkette im aktiven Zentrum des Synthesekomplexes definiert. Man unterscheidet bei Polyketidsynthasen zwischen drei Typen. Typ I Polyketidsynthasen sind große, modular aufgebaute Synthesekomplexe. Polyketidsynthasen vom Typ II sind ebenfalls große Aggregate. Diese bestehen aus Untereinheiten, welche jeweils nur eine spezielle Funktion in der Biosynthese erfüllen. Bei dem dritten Typ handelt es sich um einfachere Polyketidsynthasen, welchen die Acyl-Carrier Funktion fehlt. In vielen Fällen bilden die Polyketidketten durch intramolekulare Kondensationen aromatische Ringsysteme aus.

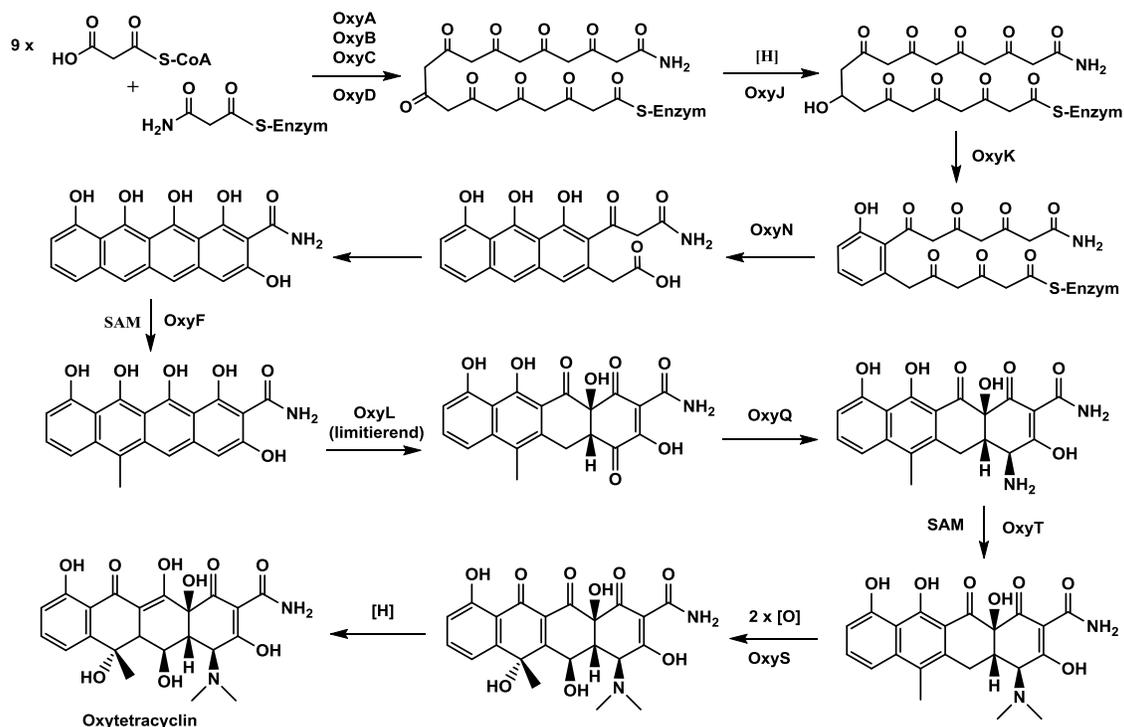
Pflanzen stellen den überwiegenden Teil der bekannten Polyketid-Sekundärmetabolite her. Die bekanntesten darunter sind die Flavonoide, welche meist als Farb- oder Duftstoffe dienen. Auch Streptomyceten stellen oft Polyketid-Sekundärmetabolite her, wobei diese meist antibiotische Eigenschaften haben, wie beispielsweise die Gruppe der Tetracycline. Funa et al. gelang es die für die Synthese des Farbstoffs Flaviolin verantwortliche Polyketid Typ III Synthase (RppA) in *E. coli* zu exprimieren (Funa et al., 1999).

Das Flavonoid Flaviolin (**1**) ist ein einfaches Polyketid. Es wird durch die spontane Oxydation mit gelöstem Sauerstoff aus Tetrahydroxynaphthalin (THN, **2**) erhalten. THN wird durch sukzessive Kettenverlängerung von 5 Malonyl-CoA (**3**) Bausteinen in einer Polyketid Synthase vom Typ III (RppA) enzymatisch synthetisiert (Schema 4). Der intramolekulare Ringschluss erfolgt dabei über eine Claisen-Kondensation.



**Schema 4:** Synthese von Flaviolin. Tetrahydroxynaphthalin **2** wird in einer Polyketidsynthese vom Typ III (RppA) durch Verknüpfung von 5 Malonyl-CoA **3** synthetisiert und nach erfolgtem Ringschluss durch Claisen-Kondensationen von gelöstem Sauerstoff spontan zu Flaviolin **3** oxidiert.

Auch komplexere Polyketid-Sekundärmetabolite können in *E. coli* synthetisiert werden, wie Stevens et al. durch ihre Arbeiten gezeigt haben (Stevens et al., 2013). Eine solche Synthese ist in Schema 5 am Beispiel von Oxytetracyclin dargestellt, welche durch Pickens et al. 2009 veröffentlicht wurde (Pickens und Tang, 2010). Diese wird in einem aus 24 Untereinheiten bestehenden Enzymkomplex einer Polyketid Typ II Synthese durchgeführt. Der natürliche Produzent von Oxytetracyclin, *Streptomyces rimosus*, enthält den oxy Gencluster, welcher die Megasyntase codiert.



**Schema 5:** Oxytetracyclin Biosynthese katalysiert durch Oxytetracyclin Biosynthesecluster (oxyA-oxyS) (Pickens und Tang, 2010).

## 2.3 Problemstellung

Die Synthese von Polyketid-Sekundärmetaboliten durch organisch chemische Verfahren ist eine große Herausforderung. Daher werden Alternativen für die Synthese dieser Naturstoffe gesucht. Die Verwendung von permeabilisierten Mikroorganismen zur Herstellung dieser Naturstoffe und ihrer Derivate könnte eine solche Alternative bieten.

Zunächst soll ein einfaches Polyketid synthetisiert werden um die Verwendung permeabilisierter Zellen mit heterolog exprimierten Genen durch Verlinkung in den Zentralstoffwechsel zu untersuchen und die Versorgung relevanter Precursor, wie Acetyl- und Malonyl-CoA, zu optimieren. Dieses soll am Beispiel des Polyketids Flaviolin geschehen. Der Modellorganismus *Escherichia coli* soll in permeabilisierten Zustand hierfür genutzt werden. Durch Analyse des metabolischen Netzwerks von *E. coli* sollen Synthesewege ausgewählt werden und auf ihre Verwendung bei der Synthese von Polyketiden getestet werden. Dafür müssen präparative Verfahren zur Permeabilisierung der Zellwand von *E. coli* angepasst werden. Um die Effizienz der Synthese durch weitere Optimierungen zu steigern und die Versorgung mit Cofaktoren durch regenerative Prozesse zu ersetzen müssen genetische Modifikationen auf *E. coli* angewandt werden. Es sollen benötigte Cofaktoren zur Synthese von Oxytetracyclin in permeabilisierten Zellen durch Adaptionen bestehender Regenerationsverfahren zu Verfügung gestellt und anhand entsprechender Beispielreaktionen charakterisiert werden. Im Besonderen sind die Cofaktoren ATP, NADPH und SAM dabei von Bedeutung. Am Beispiel von Oxytetracyclin soll schließlich die biokatalytische Synthese komplexer Polyketid-Sekundärmetabolite realisiert werden.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Permeabilisierung

Studien an unserem Institut konnten neue Strategien zur erfolgreichen Permeabilisierung von Mikroorganismen und Säugerzellen aufzeigen (Niklas et al., 2011; Yuan und Heinzle, 2009). Dabei kamen vornehmlich Detergenzien zum Einsatz. Es stellte sich heraus, dass die Bedingungen für eine optimale Permeabilisierung der Zellwand zwischen den Organismen starken Schwankungen unterliegen. Sogar Organismen gleicher Art weisen aufgrund der Beschaffenheit ihrer Zellwand teilweise starke Unterschiede bezüglich ihrer Anforderungen an die Permeabilisierungsbedingungen auf.

Die Kriterien für eine permeabilisierte Zelle wurden so definiert, dass niedermolekulare Verbindungen ungehindert die Zellwand passieren können, die Diffusion durch die Membran also ungehindert erfolgt. Im Idealfall entspricht die Enzymaktivität in permeabilisierten Zellen der Aktivität eines Zellaufschlusses mit gleicher Enzymkonzentration. Die Membrandurchlässigkeit ist dabei der entscheidende Faktor. Es ist davon auszugehen, dass durch die Behandlung mit Detergenzien die Membran bis zu einem gewissen Grad mit Detergenz gesättigt wird bevor ihre strukturelle Integrität irreversibel gestört ist. Diese kontinuierliche Sättigung erlaubt es eine Konzentration zu ermitteln, bei welcher die Membran Diffusion erlaubt, aber in ihrer Struktur erhalten bleibt. Bislang gibt es noch keine konkreten Modelle für den Ablauf dieser Prozesse.

#### **Permeabilisierung von *Escherichia coli* BL 21 DE3**

##### ***Hintergrund***

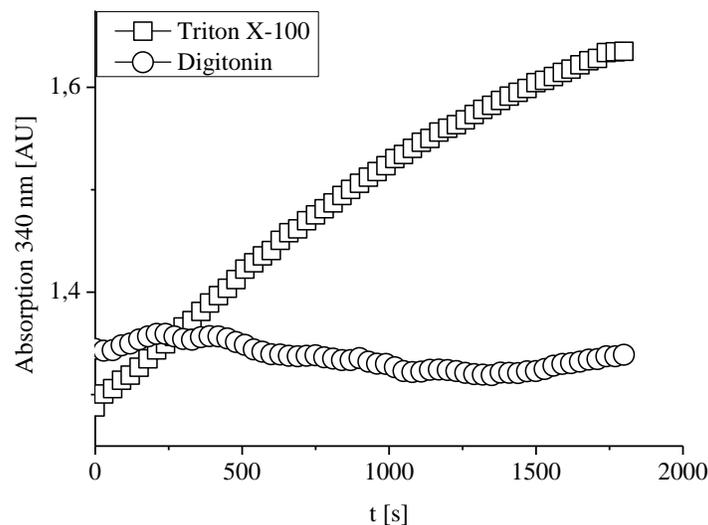
Die Permeabilisierung von *E. coli* Zellen, im speziellen von *E. coli* K12, wurde bereits in früheren Studien untersucht (Felix, 1982). In den Untersuchungen zur Permeabilisierung von *E. coli* BL21 DE3, welcher als Wirtsorganismus zur Expression von Vektorplasmiden mit T7 RNA Polymerase ausgestattet ist, wurde festgestellt, dass sich die Anforderungen an die Permeabilisierungsbedingungen nicht einfach übertragen lassen. Eine ausführliche Charakterisierung der Permeabilisierungsbedingungen wurde aufbauend auf früheren Studien durchgeführt (Yuan und Heinzle, 2009).

##### ***Auswahl des geeigneten Detergenz***

Es stehen zur Permeabilisierung von *E. coli* mehrere Reagenzien zur Auswahl. Sollen die permeabilisierten Zellen in einer Synthese zu Einsatz kommen, ist es erforderlich den Einfluss auf Enzyme durch das Reagenz möglichst gering zu halten. Es empfiehlt sich daher die Permeabilisierung mit einem geeigneten Enzymassay zu überprüfen. Im Fall von *E. coli* BL21 DE3 wurde zunächst die

Verwendung einer heterolog exprimierten Polyketidsynthase angestrebt. Benötigtes Acetyl-CoA sollte dabei aus Pyruvat und Coenzym A über Pyruvat Dehydrogenase hergestellt werden, weshalb das Assay zur Kontrolle der Permeabilität auch dieses Enzym adressiert.

Zunächst wurde aufgrund der Arbeiten von Yuan und Heinzle (Yuan und Heinzle, 2009) Triton X-100 und Digitonin, welche gute Permeabilisierungseigenschaften zeigen getestet. Triton X-100 stellte sich als besser geeignet heraus, da es keine toxische Wirkung zeigt und bereits bei geringen Konzentrationen gute Permeabilisierungseigenschaften zeigt (Abbildung 4).

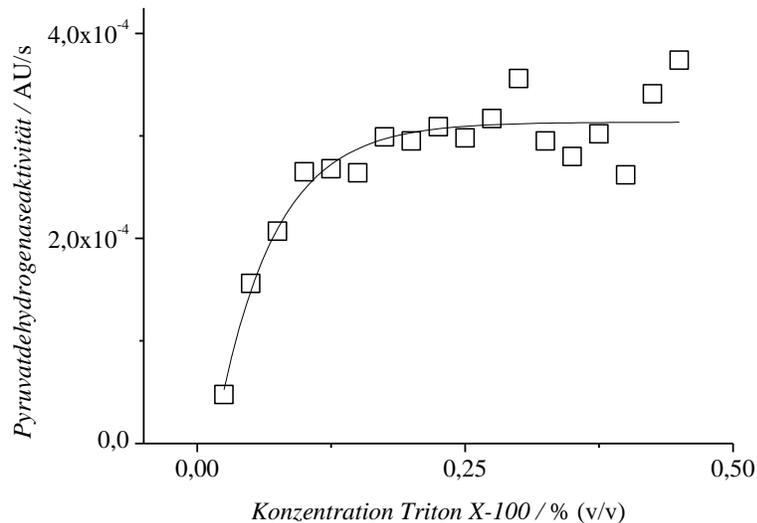


**Abbildung 4:** Absorption von NADH bei 340 nm eines Pyruvat Dehydrogenase Assays mit 1 g/L permeabilisierten *E. coli* BL21 DE3 Zellen, welche mit 0,5% □ Triton X-100 und ○ Digitonin inkubiert wurden.

### **Bestimmung der optimalen Konzentration**

Entsprechend der theoretischen Überlegungen sollte sich die Membran mit Detergenz sättigen. Dabei ist der Verteilungskoeffizient von Detergenz zwischen Membran und Puffermedium entscheidend (Nacke und Schrader, 2011; Nacke und Schrader, 2012). Ab einer gewissen Konzentration an Detergenz lässt sich die Membran nicht weiter mit Detergenz anreichern ohne ihre strukturelle Integrität zu zerstören. Um dieses zu kontrollieren und um die Detergenzkonzentration mit Blick auf die Erhaltung der Enzymaktivität für synthetische Anwendungen zu überprüfen, wurde die Aktivität von Pyruvat-Dehydrogenase in permeabilisierten *E. coli* BL21 DE3 Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Triton X-100 Konzentration bestimmt. Es zeigte sich die erwartete Sättigung der Membran, welche ab einer Konzentration von 0,25% (v/v) Triton X-100 zur Destabilisierung der Zellhülle führt (Abbildung 5). Höhere Konzentrationen an Detergenz brachten keine signifikante Zunahme der Aktivität, welche bei 0,25% Triton X-100 bereits der

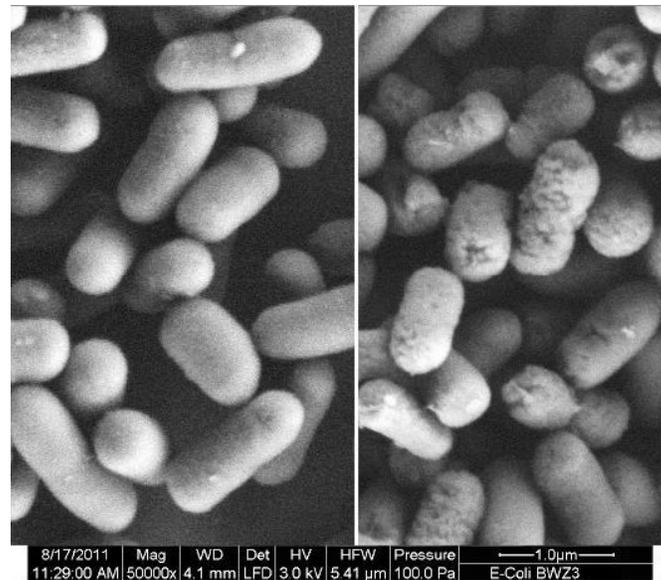
Aktivität eines Zellaufschlusses mit gleicher Enzymkonzentration entsprach. Die Aktivität ist bei geringfügig höheren Konzentrationen annähernd konstant. Eine Inaktivierung des Enzymkomplexes durch das gewählte Triton X-100, welche eine signifikante Abnahme der Aktivität zur Folge hätte, wurde im untersuchten Konzentrationsbereich nicht beobachtet.



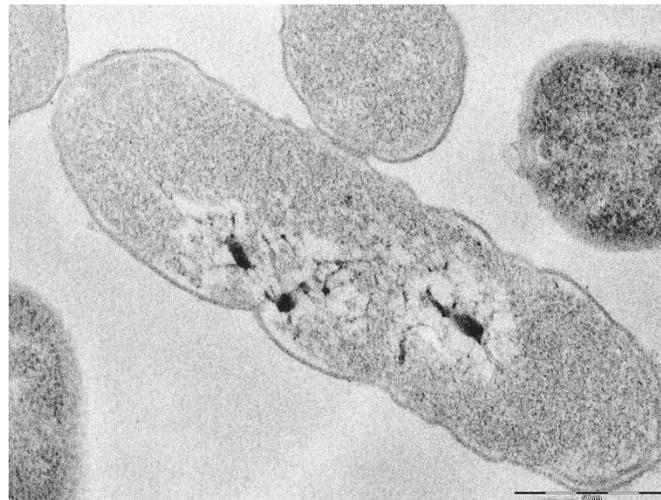
**Abbildung 5:** Aktivität von Pyruvat Dehydrogenase in Enzymassays mit permeabilisierten *E. coli* BL21 DE3 Zellen.

### ***Mikroskopische Struktur permeabilisierter Zellen***

Die mikroskopische Struktur der Zellen bleibt bei der Permeabilisierung weitgehend intakt. Die Zelle kann als eine Art Enzymsack gesehen werden, durch welchen die Substrate diffundieren können. Aufnahmen von permeabilisierten und nativen Zellen zeigen im Environmental Scanning Elektron Mikroskop (ESEM) Unterschiede in der Beschaffenheit der Oberfläche (Abbildung 6). Die Einlagerung von Triton X-100 bewirkt eine Permeabilisierung der Membran, nicht aber die Zerstörung der Zellstruktur. Während native Zellen eine glatte Oberfläche zeigen, ist diese bei permeabilisierten Zellen eher rau. Die Transmissions Elektronen Mikroskopie (TEM) zeigt eine intakte Zellstruktur auch nach der Behandlung mit Detergenz (Abbildung 7). Während niedermolekulare Bestandteile des Cytosols ausgewaschen werden können, verbleiben die Biopolymere im Inneren der Zellhülle. Lichtmikroskopisch sind permeabilisierte Zellen nicht von unbehandelten Zellen zu unterscheiden.



**Abbildung 6:** ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope) Aufnahme von nativen (links) und permeabilisierten (rechts) *E. coli* BWZ3 Zellen. Die Strukturen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit Ethanol sukzessiv entwässert. Anschließend wurde in Hexamethyldisilazan resuspendiert, auf einem Objektträger eingetrocknet und am Institut für neue Materialien (INM) der Universität des Saarlandes mit Gold bedampft und im ESEM abgetastet.



**Abbildung 7:** TEM (Transmission Electron Microscope) Aufnahme von permeabilisierten *E. coli* BWZ3 Zellen. Ultradünnschnitte wurden an der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes angefertigt und untersucht.

### Permeabilisierung weiterer Mikroorganismen

Neben *E. coli* BL21 DE3 sollten weitere interessante Organismen auf ihre Permeabilisierbarkeit geprüft werden. So wurde versucht *Myxococcus xanthus* und *Streptomyces rimosus* mit Detergenzien zu permeabilisieren. Entgegen den Erwartungen konnten keine Bedingungen ermittelt werden, bei welchen *M. xanthus* in einem permeabilisierten Zustand vorlag. Die Zellen von *M. xanthus* wurden bereits bei niedrigsten Detergenzkonzentrationen vollständig lysiert. Im untersuchten Konzentrationsbereich von

0,005 % -0,25% Triton X-100 zeigten die Zellen entweder keine Enzymaktivität von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) oder wurden ab einer Konzentration von 0,01% aufgelöst. Im Fall von *S. rimosus* ist eine Permeabilisierung aufgrund von Agglomeratbildung erschwert. Nur durch hohe Schüttelraten über 220 rpm und Kultivierung in LB Medium konnte die Zusammenlagerung in grobkörnige Zellverbände vermieden werden. Wie bereits *M. xanthus*, zeigte auch *S. rimosus* eine hohe Empfindlichkeit gegen die eingesetzten Detergenzien. Das eingesetzte Triton X-100 führte ab einer Konzentration von 0,01% zur Lyse der Zellen, während mit niedrigeren Konzentrationen behandelte Zellen keine G6PDH Aktivität aufzeigten. Auch Versuche die Zellstruktur mit dem Vernetzungsreagenz Glutaraldehyd (0,001% - 0,006%) während der Permeabilisierung mit Triton X-100 zu fixieren führten zu keiner messbaren Enzymaktivität. Die Membranen des natürlichen Oxytetracyclin-Produzenten *S. rimosus*, wie auch der industriell verwendete *M. xanthus*, können, im Gegensatz zu der Hülle von *E. coli*, nicht mit Triton X-100 permeabilisiert werden. Daher können diese Mikroorganismen mit den getesteten Detergenzien nicht zur Umsetzung von *in situ* Biokatalysen genutzt werden. Umfassendere Untersuchungen zur Permeabilisierung von *S. rimosus* und *M. xanthus* könnten zur Entwicklung einer geeigneten Methode führen.

Das folgende Kapitel ist mit dem Inhalt des Artikels „Multienzyme Whole-Cell In Situ Biocatalysis for the Production of Flaviolin in Permeabilized Cells of *Escherichia coli*“ erschienen in *ChemCatChem* Volume 4 Nummer 6 (2012) im WILEY-VCH Verlag weitgehend identisch (Krauser et al., 2012).

### 3.2 Synthese von Flaviolin mit permeabilisierten *E. coli* Zellen

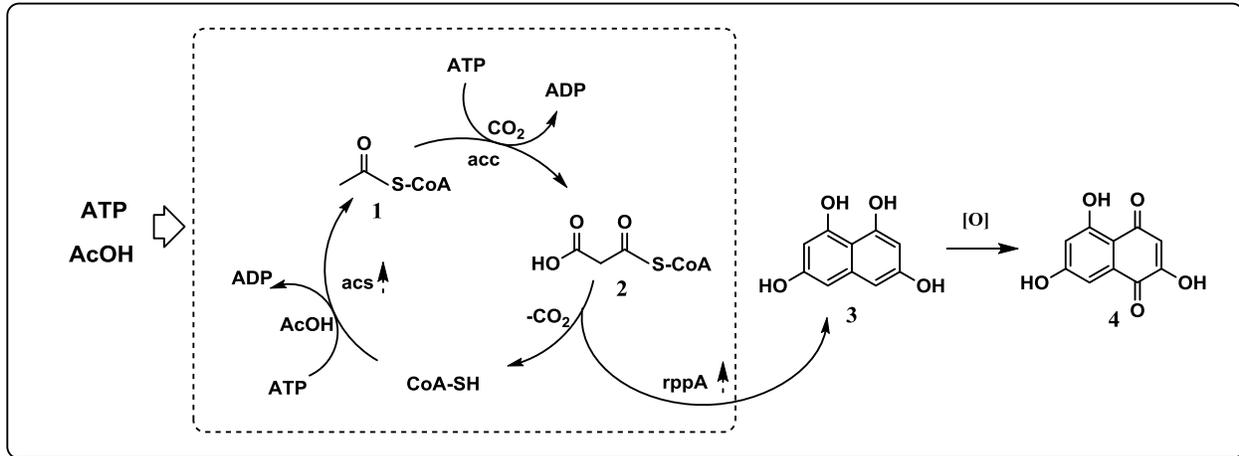
#### Hintergrund

Der Sekundärmetabolit Flaviolin ist ein Stoffwechselprodukt von *Streptomyces griseus* und wird von einer Polyketidsynthase vom Typ III (RppA) synthetisiert. Die Biosynthese verläuft über 5 aufeinander folgende Kettenverlängerungen durch Malonyl-CoA (2). Durch intramolekularen Ringschluß entsteht Tetrahydroxynaphthalin (THN, 3), welches mit atmosphärischem Sauerstoff zu Flaviolin reagiert. Das benötigte Acetyl-CoA kann aus Acetat und Coenzym A bereitgestellt werden. In *S. griseus* wird die Polyketidsynthase durch das *rppA* Gen codiert, welche von Funa et al. 1999 in *E. coli* exprimiert werden konnte (Funa et al., 1999). Flaviolin hat bei einem pH-Wert unter 6,3 eine gelbe und oberhalb eine violette Farbe. In Nährmedien ist bei physiologischem pH eher eine bräunliche Farbe zu beobachten. Diese Eigenschaften ermöglichen eine photometrische Quantifizierung von Flaviolin. Die Charakterisierung der photometrischen Eigenschaften erfolgte anhand eines selbst hergestellten Standards (Krauser et al., 2012). Flaviolin dient als Modellverbindung zur Entwicklung eines Wirtsorganismus für die *in situ* Synthese von Polyketid-Sekundärmetaboliten. Dabei stehen vor allem die Verknüpfungen zum Zentralstoffwechsel im Fokus. Die Versorgung mit dem Precursor Malonyl-CoA und die Vermeidung von Nebenreaktionen durch geeignete Deletionen sind für die Entwicklung eines Biokatalysators zum Einsatz in der Synthese von Polyketid-Sekundärmetaboliten in permeabilisierten *E. coli* Zellen von zentraler Bedeutung für eine erfolgreiche Synthese von Flaviolin.

#### Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse aus der Entwicklung eines multienzymatischen *in situ* Biokatalysators zur Synthese des Sekundärmetaboliten Flaviolin mit permeabilisierten *E. coli* Zellen, welche zur Verwendung in Synthesen von Polyketiden modifiziert wurden, werden nun erläutert. Entsprechend der Arbeiten von Zha et al. kam eine Deletionsmutante von *E. coli* B121 DE3 zum Einsatz, bei welcher die Gene der Acetyl-CoA-Dehydrogenase (AdhE), sowie die Gene von Acetat-Kinase (AckA) und Phospho-Transacetylase (Pta) deletiert sind (Zha et al., 2009). Zusätzlich wurde die konkurrierende Fettsäuresynthese durch Triclosan inhibiert, da eine Deletion entsprechender Gene letal für der Wirtsorganismus wäre (McMurry et al., 1998). Flaviolin (2,5,7-trihydroxynaphthoquinon, 4) ist ein rot-brauner Polyketid-Sekundärmetabolit aus *Streptomyces griseus*, welcher heterolog in lebenden *E. coli* synthetisiert werden kann (Austin et al., 2004;

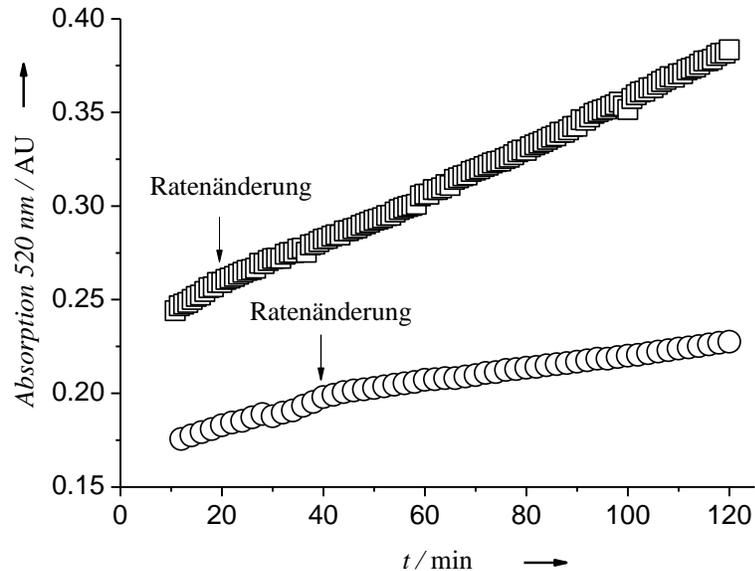
Funa et al., 1999). Das Intermediat Tetrahydroxynaphthalin (THN, 3) ist das eigentliche Enzymprodukt, welches durch atmosphärischen Sauerstoff spontan zu Flaviolin oxidiert wird (Schema 6).



**Schema 6:** Biokatalytische Synthese von Tetrahydroxynaphthalin (THN, 3) mit anschließender Oxidation zu Flaviolin (4). Acetyl-CoA (1) wird aus Acetat und Coenzym A durch Acetyl-CoA Synthase (acs) unter ATP Verbrauch synthetisiert. Acetyl-CoA Carboxylase carboxyliert Acetyl-CoA mit Hilfe von Hydrogencarbonat und ATP zu Malonyl-CoA (2). Die Polyketidsynthase vom Typ III (rppA) verknüpft 5 Malonyl-CoA unter  $\text{CO}_2$ -Abspaltung zu THN. Überexprimierte Gene sind durch einen vertikalen, gestrichelten Pfeil gekennzeichnet.

Triton X-100 wurde aufgrund seiner geringen Toxizität und der erforderlichen niedrigen Konzentration im Permeabilisierungsprozess als Detergenz ausgewählt. Die optimale Konzentration von 0,25% (v/v) wurde anhand eines Pyruvat Dehydrogenase Assays ermittelt (Abbildung 5). Verfolgt wurde die Flaviolin Synthese mittels photometrischer Bestimmung von Flaviolin und MALDI-Tof Massenspektrometrie. Die Produktivität pro Gramm permeabilisierten Zellen lag bei 25 nmol pro Minute während der Startphase und 15 nmol pro Minute im weiteren Verlauf der Reaktion (Abbildung 8). Die Gründe für den Ratensprung konnten bislang noch nicht eindeutig identifiziert werden. Nach 16-stündiger Inkubation des Biokatalysators in Reaktionspuffer (50 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , 30 mM ATP, 50  $\mu\text{M}$  CoA, 0,4 mg/L Triclosan, 0,1 mM Biotin und 20 mM  $\text{MgSO}_4$  in 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  Puffer bei pH 7,8) bei 30 °C konnte eine maximale Konzentration an Flaviolin von 0,93 mM gemessen werden. Dies entspricht etwa der Hälfte der Konzentration welche Fermentationen nach 3 Tagen erreichen. Das eingesetzte ATP wurde zu etwa 30 % zur Synthese von Flaviolin verwendet. Hydrolyse von ATP und andere unerwünschte, unbekannte Nebenreaktionen reduzieren vermutlich die Ausbeute. Die Überexpression von Acetyl-CoA Synthase (Acs) und die Deletion von Enzymen, die Acetyl-CoA verbrauchende Reaktionen katalysieren (Ethanol Synthese mit AdhE und Acetat Synthese via AckA/Pta) führte zu einer erheblichen Verbesserung der Gesamtaktivität und Endkonzentration. Zusätzliche Überexpression von Acetyl-CoA Carboxylase über einen separaten Vektor führte nicht zur erwarteten Verbesserung, sondern verringerte die Ausbeute.

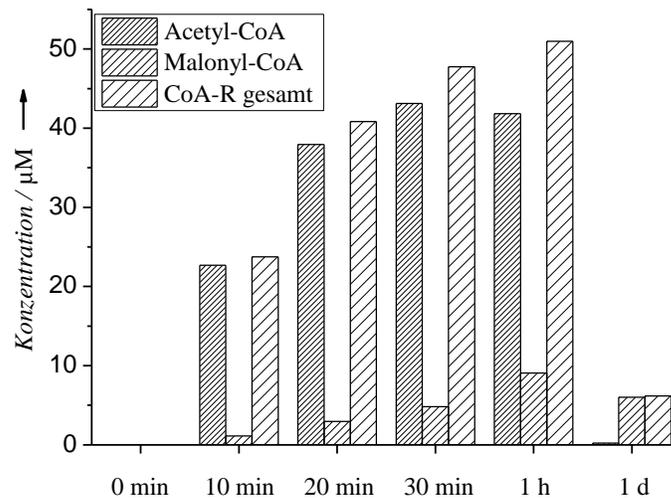
Kombinationen permeabilisierter Zellen, welche jeweils nur eines der benötigten Enzyme überexprimierten zeigten überraschender Weise keine Flaviolin Produktion.



**Abbildung 8:** Absorption von Flaviolin bei 520 nm gemessen in einem Reaktionsansatz mit ○) 25 g/L und □) 50 g/L permeabilisierten *E. coli* BWZ3 *acs/rppA* Zellen in 50 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , 30 mM ATP, 50  $\mu\text{M}$  CoA, 0,4 mg/L Triclosan, 0,1 mM Biotin und 20 mM  $\text{MgSO}_4$  in 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  Puffer bei pH 7,8.

Coenzym A-Intermediate wurden mit LC-MS Analyse quantifiziert (Abbildung 9). Es zeigte sich, dass das zugesetzte CoA (50  $\mu\text{M}$ ) innerhalb von etwa 0,5 h vollständig in die gewünschten CoA-Thioester umgesetzt wurde und effektiv in einem Regenerationszyklus wiederaufbereitet wird (jedes Coenzym A Molekül wurde im Schnitt 93 mal recycelt).

Die anfängliche Akkumulationsrate von Acetyl-CoA für ein Gramm Biokatalysator beträgt etwa 77 nM pro Minute. Beachtet man die Syntheserate von Flaviolin (25 nM pro Minute), welche Acetyl-CoA mit 125 nM pro Minute verbraucht, ergibt sich eine Gesamtrate von 0,2  $\mu\text{M}$  pro Minute für ein Gramm permeabilisierte Zellen. Die Akkumulierung von Malonyl-CoA betrug lediglich 7 nM pro Minute was einer Gesamtsyntheserate von 132 nM pro Minute und Gramm Biokatalysator entspricht. Die Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA ist somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Synthese. Die Bildung von THN wurde nicht separat verfolgt.



**Abbildung 9:** Konzentrationsprofil der CoA-Thioester Intermediate während der Inkubation von permeabilisierten *E. coli* BWZ3 pACYC-acs/pET-rppA Zellen in Reaktionspuffer (vgl. Abbildung 8).

### Anmerkungen

Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwendung permeabilisierter Zellen als *in situ* Biokatalysator eine nützliche Alternative zur Synthese von Sekundärmetaboliten im Vergleich zur *in vivo* und *in vitro* Synthese darstellt. Um die benötigten Acyl-CoA-Thioester zur Synthese von Polyketiden bereitzustellen wurde Acetat als geeignetes Ausgangssubstrat verifiziert. Der Einsatz von Pyruvat resultierte, entgegen den Erwartungen, weder in der Bildung von Flaviolin noch in der Synthese von Acetyl-CoA. Die Aktivität und Ausbeute der Flaviolinsynthese konnte gesteigert werden, indem der initiale Syntheseschritt durch eine Überexpression von Acetyl-CoA Synthase beschleunigt wurde und die anschließenden Umwandlungen in räumlicher Nähe, also derselben Zelle durchgeführt wurden. Anhand der MALDI-MS Analyse des Reaktionspuffers konnten keine signifikanten Nebenprodukte unter den gewählten Bedingungen festgestellt werden. Trotzdem konnte die maximale Ausbeute von 30% bezüglich des eingesetzten ATP nicht überschritten werden. Unerwünschte, potentiell ATP verbrauchende Reaktionen müssten zur Optimierung identifiziert und ausgeschaltet werden.

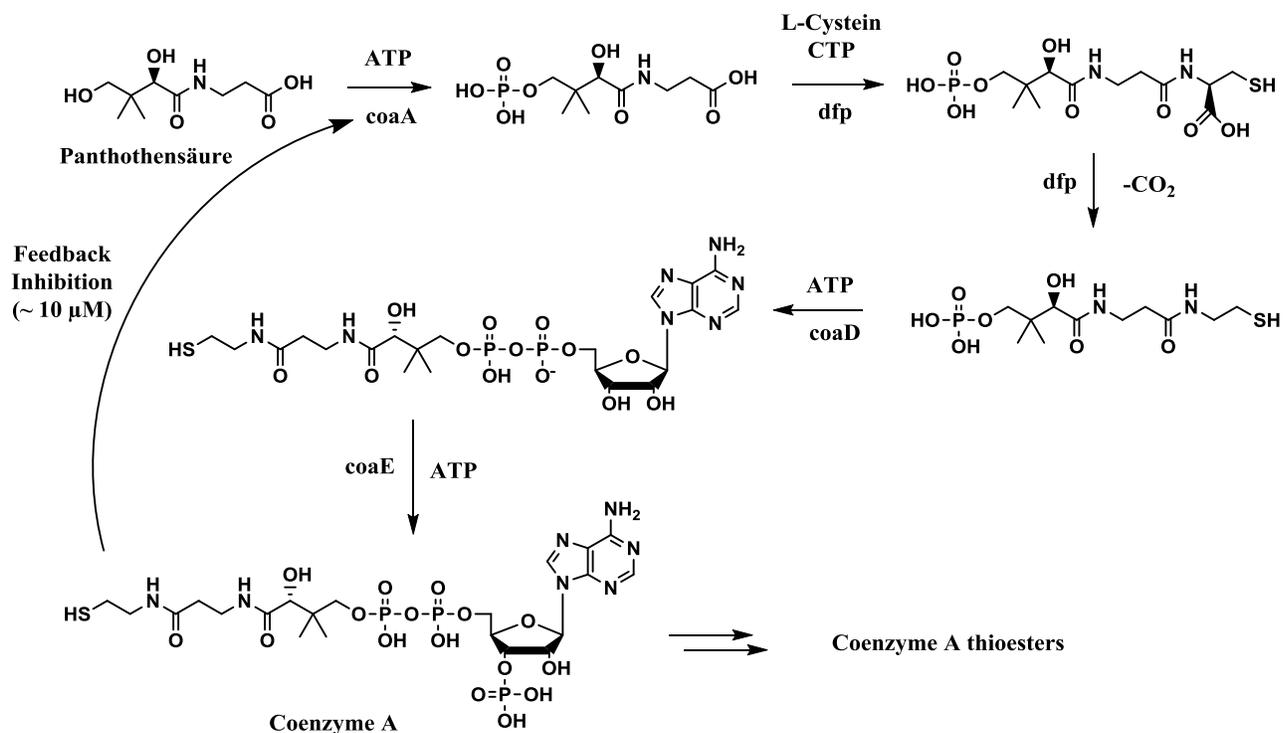
Diese „one-pot“ Strategie erforderte nur wässrige Pufferlösungen und moderate Reaktionsbedingungen (Santacoloma et al., 2011; Wohlgemuth, 2007). Es wurden dabei bislang einfach zu handhabende *E. coli* Zellen eingesetzt. Genomweite Untersuchungen zu Enzymaktivitäten des Wirtsorganismus mit bioinformatischen und „metabolic engineering“ Methoden könnten die Optimierungsmöglichkeiten erweitern und die katalytische Effizienz verbessern. Permeabilisierte Zellen können sehr nützlich für Totalsynthesen sein, da sie im Vergleich zu Gemischen von Enzymen leicht herzustellen, zu verarbeiten

und abzutrennen sind (Cheng et al., 2007). Der Biokatalysator kann nach beendeter Reaktion abzentrifugiert oder durch Ultrafiltration entfernt werden. Die resultierenden Reaktionsgemische sind klar definiert, was die Aufarbeitung vereinfacht und das Abfallaufkommen drastisch reduziert (Heinzle et al., 2006). Cofaktor Regenerierungsmethoden, z.B. die Regeneration von ATP aus Polyphosphat, können *in situ* Methoden zu wirtschaftlichen Alternativen bei der großtechnischen Herstellung hochwertiger Feinchemikalien machen (Kuroda und Kornberg, 1997; Noguchi und Shiba, 1998; Schultheisz et al., 2008). Die vorgestellte Methode kann generell zur Polyketidsynthese verwendet werden, wenn ein passender Wirtsorganismus vorhanden ist.

### 3.3 Synthese von Coenzym A-Thioestern

#### Hintergrund

Aufgrund der Ergebnisse aus der Synthese von Flaviolin konnte davon ausgegangen werden, dass die Coenzym A-Thioester auch *de novo* synthetisiert werden könnten. Der metabolische Syntheseweg für Coenzym A ausgehend von Panthothensäure besteht aus 5 enzymatischen Schritten und benötigt lediglich 4 Substrate (Schema 7).



**Schema 7:** De novo Synthese von Coenzym A Thioestern. Panthothensäure wird von *coaA* unter ATP-Verbrauch an der endständigen Hydroxylgruppe phosphoryliert und von *dfp* mit L-Cystein unter CTP-Verbrauch verknüpft. Nach anschließender Decarboxylierung ligiert *coaD* ein ATP-Molekül unter Pyrophosphatabspaltung welches nach Phosphorylierung der 3'-Position durch *coaE* zu Coenzym A wird. Coenzym A wirkt als Feedback Inhibitor auf *coaA*.

Es wurde bereits in mehrfach versucht Coenzym A und CoA-Thioester *de novo* zu synthetisieren, was aber nur zu kleinen Mengen Coenzym A führte (Basu und Blair, 2012; Kiefer et al., 2011; Shimizu et al., 1983; Willibald et al., 1995). Hier spielt die Feedbackhemmung der Panthothenat Kinase durch Coenzym A eine entscheidende Rolle. Acyl-CoA-Thioester von zeigen wesentlich geringeren inhibierenden Effekt (Faktor 1000) auf die Coenzym A Synthese, was sie zu einem potentiellen Zielmolekül bei der Synthese macht, zumal Coenzym A aus der Hydrolyse der Thioester zurückgewonnen werden kann.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Synthese von Coenzym A-Thioestern sollte theoretisch die Feedbackhemmung durch das Endprodukt aushebeln. Die Synthese im präparativen Maßstab in permeabilisierten Zellen von *E. coli* BWZ3 pACYC-acs scheiterte jedoch an der Zersetzung von L-Cystein, welches in Anwesenheit der zur Acetyl-CoA-Synthese erforderlichen Essigsäure unter Schwefelwasserstoffabspaltung zu O-Acetylserin umgesetzt wird. Der Schwefelwasserstoff führt bereits bei niedrigen Konzentrationen zu einer Inaktivierung der Enzyme. In diesem Fall wäre eine Deletion der entsprechenden Enzyme nötig. In den getesteten Synthesen von Sekundärmetaboliten wurde Coenzym A meist nur in katalytischen Mengen eingesetzt. Daher wurde die *de novo* Synthese von Coenzym A auf katalytische Mengen beschränkt.

Coenzym A wurde in Reaktionsansätzen zur Synthese von Flaviolin entsprechend vorangegangener Studien (Krauser et al., 2012) durch entsprechende Mengen an Panthothenat, L-Cystein und Cytidin-5'-triphosphat ersetzt. Signifikante Mengen an Flaviolin wurden in allen Reaktionsansätzen detektiert, während Kontrollen ohne Zugabe der Substrate negativ blieben (Tabelle 5). Es wurden sogar im Vergleich zur Synthese mit isoliertem Coenzym A ähnliche Konzentrationen an Flaviolin produziert, wenn ATP regeneriert wurde (siehe ATP Versorgung, Seite 54).

**Tabelle 5:** Biokatalytische Synthese von Flaviolin unter Verwendung von Coenzym A als Substrat oder mit *de novo* Coenzym A Synthese.

	Reaktionsansatz	ATP	Absorption	c <sub>Flaviolin</sub> [mM]
<i>E. coli</i> BWZ3 acs/rppA 50 g/L	CoA 50 µM		0,022	0,017
	Panthothenat , L-Cystein, CTP 50 µM	1 mM	0,024	0,018
	-		0,001	-
<i>E. coli</i> BWZ3 acs/rppA 50 g/L <i>E. coli</i> BWZ3 adk/ppk 50 g/L	CoA 50 µM		0,155	0,119
	Panthothenat , L-Cystein, CTP 50 µM	0,1 mM	0,156	0,120
	-		0,011	-

## **Anmerkungen**

Coenzym A kann *de novo* aus Panthothenat, Cystein und CTP unter ATP Verbrauch bereitgestellt werden, solange die eingesetzte Konzentration an L-Cystein niedrig gehalten wird. Ansätze, bei welchen L-Cystein sukzessive zugegeben wurde, entwickelten ebenfalls Schwefelwasserstoff, was darauf deutet, dass die O-Acetylserin-Synthase sehr aktiv ist. Die geringen Mengen Coenzym A, welche durch Zugabe katalytischer Mengen L-Cystein gebildet werden, reichen aus um die Synthese von Flaviolin zu ermöglichen. Cytidin-5'-triphosphat ist essentiell für die Synthese von Coenzym A. Wird auf die Zugabe von CTP verzichtet, entsteht kein Coenzym A. Die Mengen an Coenzym A aus der *de novo* Synthese sind allerdings sehr gering. Eventuell könnten orthogonale Syntheseschritte, wie etwa von Tomita et al. berichtet, Ansätze bieten die Feedbackhemmung zu umgehen (Ishibashi et al., 2012; Tomita et al., 2013; Tomita et al., 2012). Die Umsetzung entsprechender metabolischer Änderungen könnte die Produktivität des Biokatalysators steigern, sodass die Synthese von Coenzym-A Thioestern wirtschaftlich profitabel umgesetzt werden konnte.

Das folgende Kapitel enthält Teile des Artikels „Directed Multistep Biocatalysis for the Synthesis of the Polyketide Oxytetracycline in Permeabilized Cells of *Escherichia coli*“ erschienen in *ACS Catalysis* (Krauser et al., 2015).

### 3.4 Versorgung mit ATP, NADPH und SAM in mehrstufigen Biokatalysen mit permeabilisierten *E. coli* Zellen

#### Hintergrund

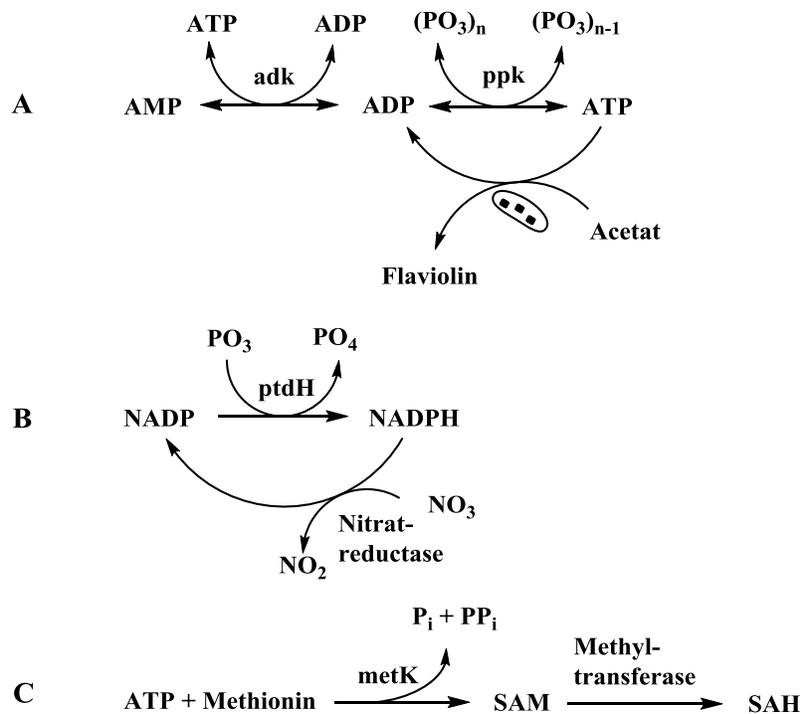
Im Folgenden werden Versorgungsmodule für die essentiellen Cofaktoren ATP, NADPH und SAM zur Verwendung in biokatalytischen mehrstufigen Reaktionen mit permeabilisierten *E. coli* Zellen und Kopplungen mit Biosynthesen an aussagekräftigen Beispielen untersucht. Um dem Anspruch mehrstufiger enzymatischer Reaktionen in Synthesen mit permeabilisierten Zellen zu genügen, wurden entsprechend optimierte *E. coli* Zellen entwickelt. ATP kann aus ADP und AMP unter Verwendung von Polyphosphat regeneriert werden. NADPH wird aus NADP durch die Oxidation von Phosphit regeneriert. Ein Grundlevel von 0,8 mg/L SAM kann durch die Ligation von ATP mit Methionin erzeugt werden.

Cofaktorregenerierung ist eine Kernaufgabe in biokatalytischen Umwandlungen (Krauser et al., 2013; Wohlgemuth, 2010; Wohlgemuth, 2011). Die Effizienz enzymatischer Reaktionen hängt direkt von der Regeneration des entsprechenden Cofaktors ab (Uppada et al., 2014). Da die Kosten für Cofaktoren die der Substrate meist um Größenordnungen übersteigen, können nur katalytische Mengen eingesetzt werden (Ni et al., 2014). Industrielle Anwendungen verlangen daher nach günstigen und verlässlichen Regenerationsstrategien um Cofaktoren zur Bereitstellung von Redox-Äquivalenten, Monomerbausteinen und Energieversorgung.

Enzymatische Synthesewege in Mikroorganismen sind leistungsstark bei der Synthese komplexer organischer Strukturen wie z.B. Sekundärmetabolite. Dabei entsteht in der Regel ein hoher Bedarf an Cofaktoren, welche für gewöhnlich während der Herstellung permeabilisierter Zellen ausgewaschen werden. So müssen Adenosin-5'-triphosphat (ATP),  $\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH, NADPH), S-Adenosylmethionin (SAM) und Coenzym A-Thioester regeneriert werden um einen stöchiometrischen Verbrauch zu vermeiden. Wir haben bereits über eine effektive Methode zur Versorgung mit Acetyl-CoA und Malonyl-CoA berichtet (Krauser et al., 2012) (Kapitel 3.2). Adaptionen bestehender *in vitro* Regenerationen für ATP (Kameda et al., 2001; Noguchi und Shiba, 1998; Shiba et al., 2000) und NADPH (Johannes et al., 2007; Johannes et al., 2005; Relyea et al., 2005; Woodyer et al., 2005; Woodyer et al., 2003; Woodyer et al., 2006; Woodyer et al., 2005; Woodyer et al., 2005; Woodyer et al., 2008; Zhao et al., 2004) wie auch eine Versorgung mit Methylgruppen durch SAM (Grossmann et

al., 2000; Komoto et al., 2004; Matos et al., 1987; Park et al., 1996) sind essentiell für effiziente *in situ* Synthesen.

ATP kann aus ADP und AMP mit Kinasen unter Polyphosphatabbau regeneriert werden um ATP abhängige Schritte der *in situ* Synthese von Flaviolin zu versorgen (Schema 8, A). NADPH Versorgung kann durch eine optimierte Phosphit Dehydrogenase erreicht werden, um z.B. enzymatische Reduktionen wie die Umwandlung von Nitrat zu Nitrit mit Nitrat Reduktase zu unterstützen (Schema 8, B). SAM als Methylgruppendonor für Methyl Transferasen wird aus der Ligation von ATP mit Methionin erhalten (Schema 8, C), Zur Nutzung in permeabilisierten Zellen wurden diese Methoden ausgewählt, da keine zusätzlichen Kohlenstoffquellen dem metabolischen Netzwerk zur Verfügung stehen sollten, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden. Zusätzlich müssen die Reaktionen über ein breites Spektrum an Reaktionsbedingungen ablaufen.

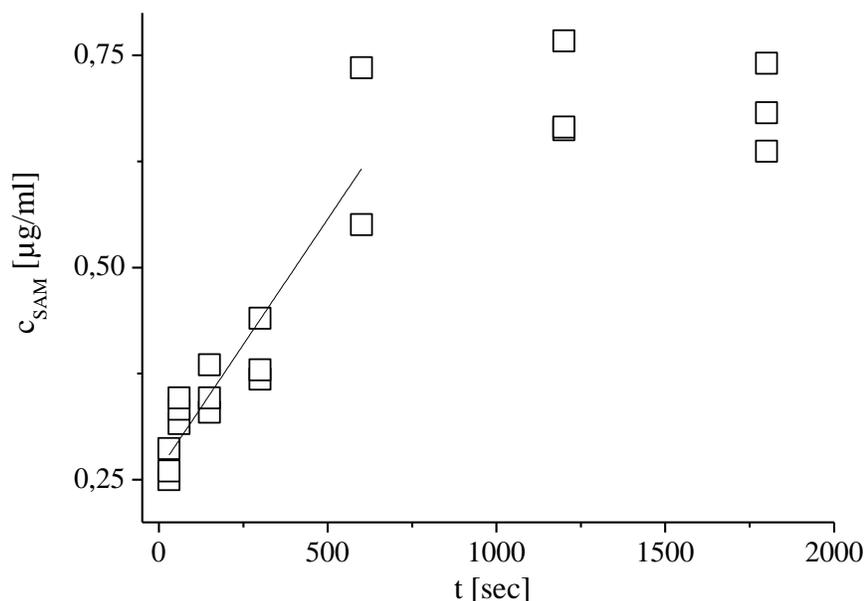


**Schema 8:** Versorgungsreaktionen für essentielle Cofaktoren in permeabilisierten Zellen. A) ATP wird aus ADP und AMP durch Polyphosphat Kinase (*ppk*) und Adenylat Kinase unter Polyphosphat Verbrauch synthetisiert. B) NADPH wird durch Reduktion von  $\text{NADP}^+$  mittels Phosphit Dehydrogenase aus Phosphit erzeugt. C) S-Adenosylmethionin wird durch S-Adenosylmethionin Synthase (*metK*) katalysierte Ligation von ATP und Methionin bereitgestellt.

## Ergebnisse und Diskussion

### SAM Versorgung

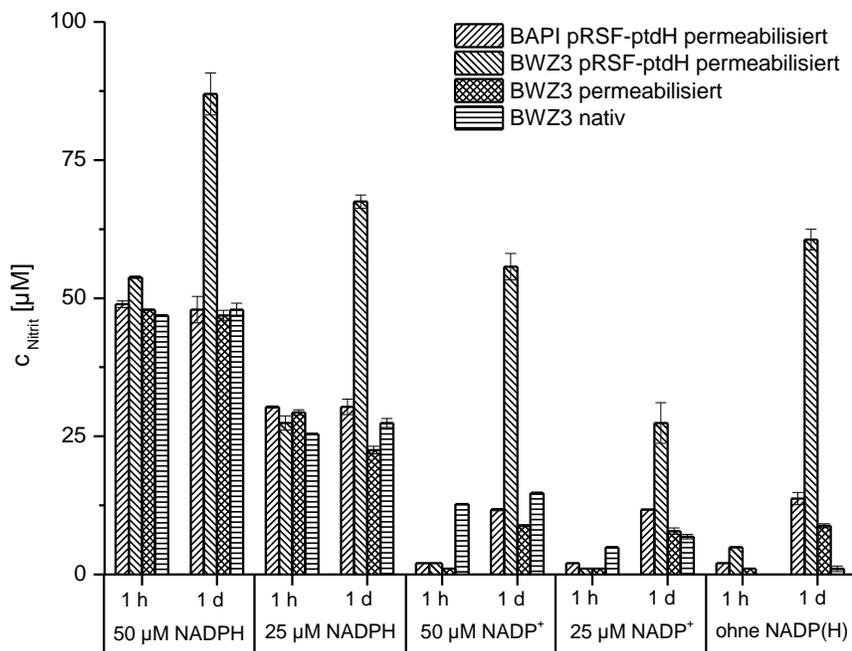
S-Adenosylmethionin (SAM) ist essentiell zur Methylierung von Kohlenstoffgerüsten in Sekundärmetaboliten. Zur Synthese von Oxytetracyclin werden drei Moleküle SAM benötigt. Die Verbindung ist unter physiologischen Bedingungen nur mäßig stabil. Ein stöchiometrischer Einsatz wäre daher unvorteilhaft. SAM wird nach Abspaltung der Methylgruppe am Schwefel in Homocystein und Adenosin umgewandelt. Eine Regeneration ist in diesem Fall, wenn überhaupt, nur schwer zu realisieren. Da die S-Adenosylmethionin-Synthase (MetK) einer Feedback Inhibierung durch SAM unterliegt, ist eine präparative Synthese ebenfalls unvorteilhaft. Biokatalytische Synthesen bedürfen meist nur einer geringen Konzentration an SAM, welche für eine ausreichende Aktivität sorgt. ATP-verbrauchende Reaktionen würden von einer on-demand- Synthese sogar profitieren. Um diese zu erreichen wurde *C. glutamicum* MetK in *E. coli* BWZ3 heterolog überexprimiert, was eine effiziente Versorgung mit SAM über mehr als 16 Stunden sicherstellt. Eine konstante Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  (0,8 mg/L) kann auf diese Weise aufrecht erhalten werden, wobei die maximale Produktivität des Versorgungsmoduls bei 4,5 nmol/min pro Gramm permeabilisierten *E. coli* BWZ3 pRSF-*metK* Zellen liegt (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Zeitlicher Verlauf der Synthese von SAM in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat Puffer mit 10 mM ATP, 10 mM Methionin und 50 g/L permeabilisierten *E. coli* BWZ3 pRSF-*metK* Zellen.

## NADPH Versorgung

Wie bereits von Woodyer et al. gezeigt wurde, weist die E175A, A176R Doppelmutante von *Pseudomonas stutzeri* Phosphit-Dehydrogenase (PtdH), welche nativ  $\text{NAD}^+$  als Substrat bevorzugt, einen signifikanten Zuwachs bei der Aufnahme von  $\text{NADP}^+$  als Substrat auf (Woodyer et al., 2003). Aus Gründen verbesserter Proteinexpression wurde die ursprüngliche Sequenz für *E. coli* codonoptimiert. Zellen permeabilisierter *E. coli* BWZ3 mit pRSF-*ptdH* Vektor zeigten signifikante NADPH-Bildung. In Redox Assays mit permeabilisierten *E. coli* BWZ3 und *E. coli* BAPI wurden die Redoxindikatoren NBT (0,1 mM) und DCPIP (10 mM) in NADPH selektiven Redoxsystemen komplett in die reduzierte Form überführt. Dieser Effekt wurde allerdings auch ohne externe Zugabe von  $\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Phosphat Spezies beobachtet. Unpermeabilisierte Zellen zeigten ähnliche Redoxeigenschaften gegenüber den Redoxindikatoren, jedoch mit drastisch geringerer Aktivität. Gekoppelt an eine NADPH abhängige Reduktion von Nitrat zu Nitrit zeigten permeabilisierte sowie unpermeabilisierte Zellen NADPH generierende Aktivität (Abbildung 11). Das Assay zeigte in Voruntersuchungen keine negativen Wechselwirkungen mit Phosphit und wurde daher als geeignet angesehen um die durch NADPH erzeugten Reduktionsäquivalente zu bestimmen. Aufgrund von Substratinhibierung wurden nur Nitratkonzentrationen unterhalb von 10 mM eingesetzt (Jacques et al., 2014).



**Abbildung 11:** Nitritproduktion durch NADPH verbrauchende Reduktion von Nitrat via Nitrat-Reduktase. Reaktionen wurden in Tris-HCl Puffer (0.1 M) mit 4 g/L Natriumphosphit, 5 mM Natriumnitrat und 50 g/L permeabilisierte Zellen von *E. coli* BAPI pRSF-*ptdH*, *E. coli* BWZ3 pRSF-*ptdH*, *E. coli* BWZ3, bzw. native *E. coli* BWZ3 Zellen. Nitritkonzentrationen wurden mit einem photometrischen Diazo-Farbstoff Assay der Firma Boehringer (Beutler et al., 1986) vermessen. Proben wurden nach einer Stunde und einem Tag Inkubation bei 30 °C und schütteln mit 230rpm in einem 50 ml Regiergefäß genommen und bei 8 g zentrifugiert.

Trotz zahlreicher kombinatorischer Reaktionsansätze wurden nur Nitritkonzentrationen gemessen welche maximal auf 0,1 mM NADPH schließen lassen. Eine Sequenzanalyse von pRSF-*ptdH* zeigte die korrekte Insertion des *P. stutzeri* E175A, A176R Doppelmutanten in die BamHI-HindIII Restriktionsstelle (siehe Seite 69).

Untersuchungen zur Expression von *ptdH* zeigten, dass die Enzymmenge an PtdH in *E. coli* BWZ3, wie auch in *E. coli* BAPI sehr niedrig ist. Die Überexpression von *ptdH* wird vermutlich von zellulären Mechanismen unterdrückt wie z.B. der Zersetzung von mRNA und Protein. Da die Expressionsraten von pRSFduet-1 in *E. coli* B121 DE3 für heterologe Gene für gewöhnlich sehr hoch sind, wird davon ausgegangen, dass der Abbau der Transkripte rasch abläuft. Dies muss zur endgültigen Aufklärung weiter untersucht werden. Es konnten nur geringe Mengen der Phosphit-Dehydrogenase auch nach Variation der Expressionsbedingungen (IPTG 0,3 – 1 mM, 28 – 37 °C) exprimiert werden. Die besten Expressionsbedingungen wurden bei 2,5 Stunden Inkubation mit 1 mM IPTG bei 28 °C gefunden. Ermittelt wurden die Expressionsbedingungen über die Effizienz von PtdH-Dynabeads® zur Synthese von NADPH. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Zellen nicht nur NADPH aus NADP<sup>+</sup> erzeugten, sondern die Reduktion von Nitrat auch ohne Zugabe von β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid Spezies ablief, obwohl diese im Reaktionsaufbau nur enzymatisch erfolgen kann. So wurden 60 µM Nitrit in Reaktionsansätzen mit 50 g/L permeabilisierten *E. coli* BWZ3 pRSF-*ptdH* Zellen gemessen, ohne dass NADP<sup>+</sup> zugegeben wurde. Möglicherweise spielt enzymgebundenes NADP<sup>+</sup> eine Rolle, welches nach fortschreitender Reaktionsdauer freigesetzt wird. Dieser Effekt trat nur auf, wenn die Zellen vor der Verwendung permeabilisiert wurden und war ohne Überexpression von *ptdH* sehr gering. Unbehandelte Zellen waren in der Lage 28% des zur Verfügung gestellten NADP<sup>+</sup> in NADPH umzuwandeln, was auf membranassoziierte Redoxreaktionen schließen lässt.

### **ATP Versorgung**

ATP Regeneration kann durch Phosphorylierung von ADP via Polyphosphat-Kinase (Ppk) erreicht werden (Kameda et al., 2001; Kuroda und Kornberg, 1997; Nahalka et al., 2006; Nahálka et al., 2002; Nocek et al., 2008; Resnick und Zehnder, 2000). Polyphosphat ist ein natürlicher Energiespeicher in Zellen und wird während des Wachstums auf energiereichem Nährmedium angereichert (Achbergerova und Nahalka, 2011; Achbergerova und Nahalka, 2014; Meng et al., 2011). Die Phosphorylierung von Nucleotid Phosphaten ist reversibel und bildet ein Gleichgewicht aus. Es wurde gezeigt, dass die Umsetzung von ADP zu ATP durch Phosphorylierung mittels Ppk bis zu 52,3% erreicht (Noguchi und Shiba, 1998). Polyphosphat-Kinase wurde in *E. coli* BWZ3 überexprimiert. Zellen mit überexprimierter *E. coli* Ppk wurden permeabilisiert und als ATP-Regenerationsmodul mit der biokatalytischen Synthese von

Flaviolin gekoppelt (Tabelle 6). Die Ausbeute an Flaviolin wurde mit dem Verbrauch an ATP korreliert, wobei ein Molekül Flaviolin bei der Synthese 10 Moleküle ATP verbraucht (siehe Schema 6, Seite 44).

**Tabelle 6:** ATP Verbrauch biokatalytischer *in situ* Synthesen von Flaviolin (10 Moleküle ATP pro Molekül Flaviolin) in Anwesenheit von Acetat und katalytischen Mengen Coenzym A (50  $\mu$ M).

Mischung permeabilisierter <i>E. coli</i> BWZ3 pRSF- <i>ppk</i> (50 mg/ml) und <i>E. coli</i> BWZ3 pACYC-acs/pET-rppA (50 mg/ml) Zellen 16 h inkubiert mit	$C_{\text{flaviolin}}$ [ $\mu$ M]	ATP Turnover
ATP 30 mM (ohne Überexpression von <i>ppk</i> )(Krauser et al., 2012)	920	0,30
ATP 50 $\mu$ M	22,2	4,45
ATP 50 $\mu$ M + Polyphosphat Glas 10 mM	33,7	6,75
ATP 50 $\mu$ M + Metaphosphat 10 mM	34,5	6,90
ohne ATP	0,0	-
Reaktionspuffer (Referenz)	0,0	-
Mischung permeabilisierter <i>E. coli</i> BWZ3 pRSF- <i>adk/ppk</i> (50 mg/ml) und <i>E. coli</i> BWZ3 pACYC-acs/pET-rppA (50 mg/ml) Zellen 16 h inkubiert mit	$C_{\text{flaviolin}}$ [ $\mu$ M]	ATP Turnover
ADP 50 $\mu$ M + Polyphosphat 10 mM	130,3	26,05
ohne ADP	0,0	-

Das eingesetzte ATP konnte bis zu 7-mal recycelt werden. Interessant ist, dass die Menge an Flaviolin in Reaktionen ohne Polyphosphat ebenfalls auf eine Regeneration von ATP schließen lässt. Es ist anzunehmen, dass enzymgebundenes Polyphosphat aus der Wachstumsphase von *E. coli* pRSF-*ppk* die Regeneration von ATP unterstützt, da die Überexpression der Polyphosphat-Kinase die Bildung von Polyphosphat während der Induktionsphase begünstigt (Achbergerova und Nahalka, 2011; Rangarajan et al., 2006; Shiba et al., 2000). Weitere Untersuchungen der Reaktionsmischung zeigten, dass ATP zu AMP umgewandelt wird, obwohl aus der enzymatischen Reaktion nur ADP entsteht. Hydrolyse von ADP durch enzymatische Disproportionierung kann dabei der ausschlaggebende Faktor sein. Es ist gelungen die Regenerationseffizienz durch Coexpression von *E. coli* Adenylat-Kinase, welche unter ATP Verbrauch AMP in ADP umwandelt, drastisch zu steigern. Flaviolin Konzentrationen von 130  $\mu$ M in Reaktionen mit permeabilisierten *E. coli* BWZ3 pRSF-*adk/ppk* verweisen auf 1,3 mM ATP. Die katalytische Menge an ADP (50  $\mu$ M) wurde daher mindestens 26-fach in ATP umgewandelt. Beachtet man die anfänglichen Ausbeuten der Flaviolinsynthese bezüglich ATP von maximal 30%, wurde die katalytische Effizienz mit dem ATP Regenerationsmodul auf das 90-fache gesteigert.

## **Anmerkungen**

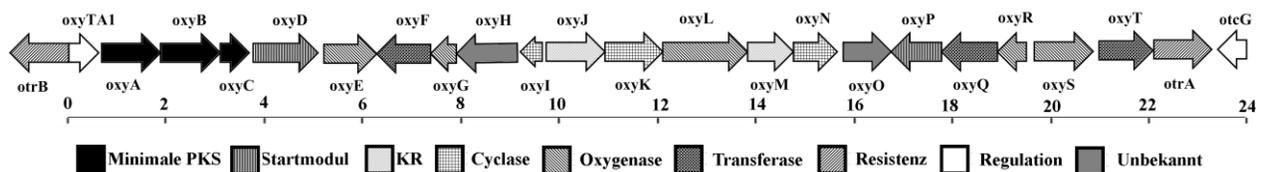
ATP kann durch die Verwendung der Polyphosphat-Kinase effektiv regeneriert werden. Dies ermöglicht die Synthese von Metaboliten mit hohem ATP-Bedarf ohne den Einsatz stöchiometrischer Mengen an ATP. Die Ausbeute kann enorm gesteigert werden, wenn Adenylat-Kinase ebenfalls überexprimiert wird. Der Redox-Cofaktor NADPH lässt sich über anorganisches Phosphit bereitstellen. Hierbei ist die Bindung des Cofaktors an die Synthesenzyme für eine effizientere Regeneration hinderlich. S-Adenosylmethionin kann man *de novo* aus Methionin und ATP bereitstellen. Eine Synthese nach Bedarf scheint vorteilhaft, da in one-pot Synthesen die Konkurrenz um ATP unterdrückt werden kann. Die vorgestellten Versorgungsmodule können auch in anderen *E. coli* Stämmen mit entsprechenden Anpassungen an Synthesewege zur Anwendung kommen und sind frei kombinierbar, da keine Wechselwirkungen der Reaktionswege bekannt sind. Die vorrangige Anwendungsmöglichkeit permeabilisierter Zellen besteht wohl in der mehrstufigen Biosynthese von Sekundärmetaboliten mit hohem Wert. Besonders die Synthese von organisch-chemisch nur schwer zugänglicher Sekundärmetabolite wird durch die Verwendung der Versorgungsmodule unterstützt. Mit den Versorgungsmodulen könnten wirtschaftliche Prozesse umgesetzt werden, welche mit *in vitro*, *in vivo* und organisch-chemischen Synthesen konkurrieren können.

Teile des folgenden Kapitels wurden in dem Artikel „Directed Multistep Biocatalysis for the Synthesis of the Polyketide Oxytetracycline in Permeabilized Cells of *Escherichia coli*“ (ACS Catalysis) publiziert (Krauser et al., 2015).

### 3.5 Synthese von Oxytetracyclin in permeabilisierten *E. coli* Zellen

#### Hintergrund

Oxytetracyclin (OTC) ist ein Tetracyclin Sekundärmetabolit aus *Streptomyces rimosus* und wirkt als Inhibitor für RNA Polymerase auf die Proteinbiosynthese in Bakterienzellen. Es wird industriell als bakteriostatisches Antibiotikum bei der Viehzucht eingesetzt. OTC ist ein Polyketid und wird in *S. rimosus* von einem Polyketid Synthetase (PKS) Typ II Enzymcluster synthetisiert. Der Megacluster sorgt durch „channeling“ dafür, dass die Intermediate nicht in das intrazelluläre Medium abgegeben werden. Durch Deletionen einzelner Gene des Operons wird die Synthese des Endprodukts unterbrochen. Dies kann genutzt werden um die Funktion der jeweiligen Untereinheiten zu charakterisieren. Pickens et al. haben die Biosynthese von Oxytetracyclin ausführlich untersucht und die Enzyme des 24 kbp OTC-Gencluster in *S. rimosus* charakterisiert (Abbildung 12) (Pickens und Tang, 2009; Pickens und Tang, 2010).



**Abbildung 12:** Oxytetracyclin Gencluster von *S. rimosus* (Pickens und Tang, 2010).

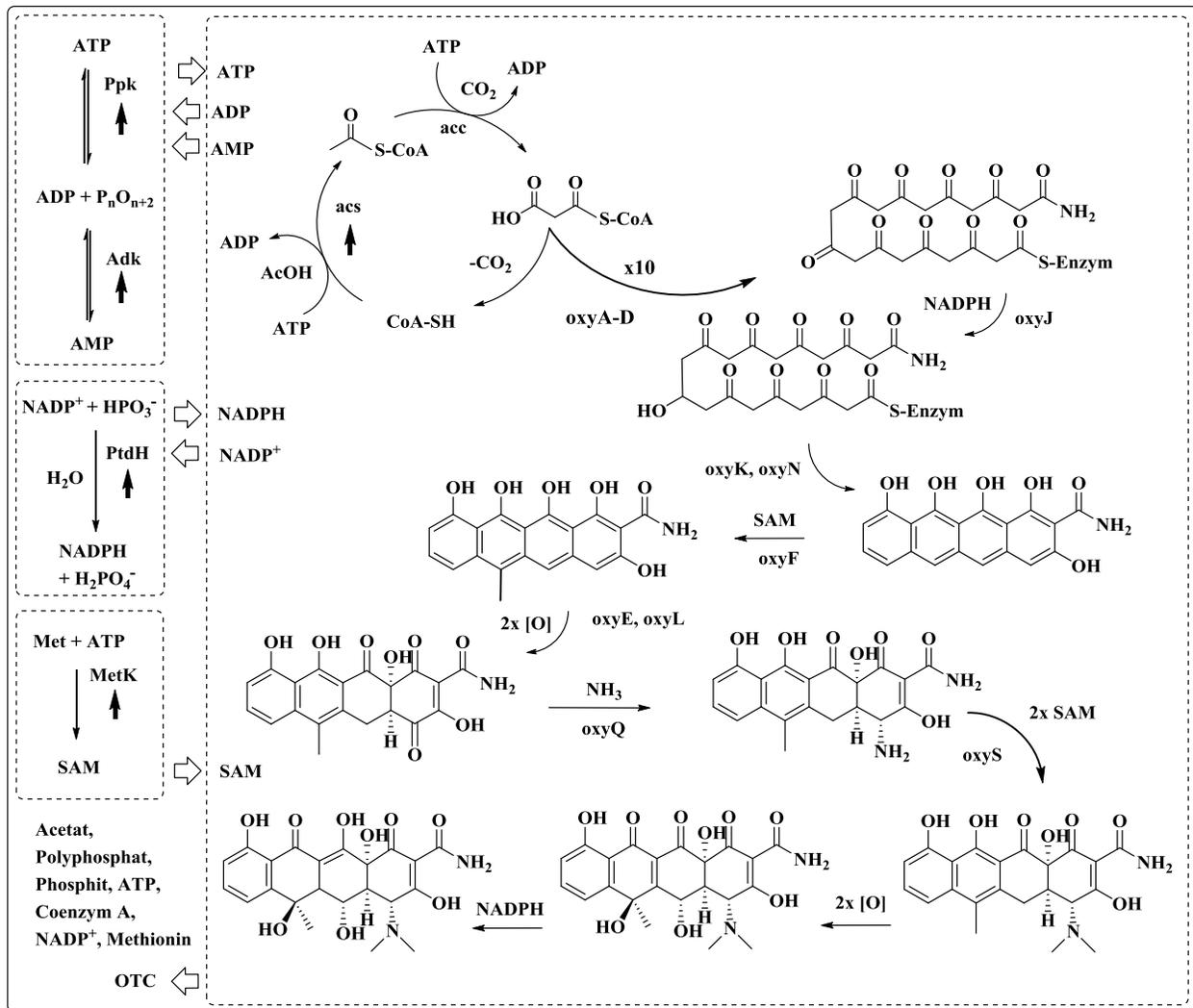
Dennoch bleibt die Struktur des Enzymclusters selbst noch unklar. Die Isolierung intakter Megacluster ist bislang noch nicht realisierbar, da diese während der Aufarbeitung meist zerstört werden. Zudem ist die Menge in der Zelle sehr gering, was es schwer macht genügend Material für eine Strukturaufklärung über Röntgendiffraktion oder Kernspinresonanz zu erhalten. Bioinformatische Ansätze hingegen könnten hier eine neue Möglichkeit bieten.

Der native Oxytetracyclin Produzent *S. rimosus* produziert geringe Mengen Oxytetracyclin. Die Synthese von OTC findet dabei vornehmlich bei geringer Zelldichte statt (Kim et al., 1994; Zhan, 2009). *S. rimosus* schleust das synthetisierte OTC aus und reichert es in der näheren Umgebung an (Kim et al., 1994). Erste Versuche den natürlichen Produzenten zu permeabilisieren scheiterten an dessen Empfindlichkeit

gegenüber den eingesetzten Permeabilisierungsmethoden und auch der industriell genutzten *M. xanthus* war für die Anwendung in Synthesen mit permeabilisierten Zellen ungeeignet (siehe Permeabilisierung, Seite 41) (Stevens et al., 2010). Im Jahr 2010 meldeten Boddy und Garza ein Patent an, in welchem die Expression des Oxytetracyclin Synthesecusters in *E. coli* beschrieben wird (Boddy und Garza, 2010). Darin wird der  $\sigma^{54}$ -Faktor aus *M. xanthus* coexprimiert und ermöglicht der RNA Polymerase in *E. coli* den Zugang zum *oxy*-Gencluster von *S. rimosus*. Entsprechende Plasmide zur Expression konnten mit freundlicher Unterstützung der Patentinhaber erhalten werden. Ein mit Chaperonen zur Faltung heterologer Proteine ausgestatteter *E. coli* BAPI Stamm (*E. coli* BL21 DE3Mutant) wurde mit den Plasmiden zur Expression des  $\sigma^{54}$ -Faktors (pDCS02) und der Oxytetracyclin Synthetase (pMRH08) transformiert. Dieser zeigte entgegen den Erwartungen keine Produktion von Oxytetracyclin bei Kultivierung im Schüttelkolben (MS-Analyse). Anfänglich war anzunehmen, dass besondere Anforderungen an die zur Synthese von OTC benötigten Cofaktoren, wie beispielsweise die Verwendung des seltenen *Streptomyces* Cofaktor F420 statt dem üblichen NADPH eine Synthese verhinderten, da entsprechende Gene in *E. coli* nicht vorhanden sind. Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich, dass Oxytetracyclin in *E. coli* weiter umgesetzt wird. Dies führt dazu, dass sich statt des gewünschten OTC dessen Abbauprodukte anreichern. Oxytetracyclin wird dabei vermutlich von Ketoreduktasen reduziert.

## Ergebnisse und Diskussion

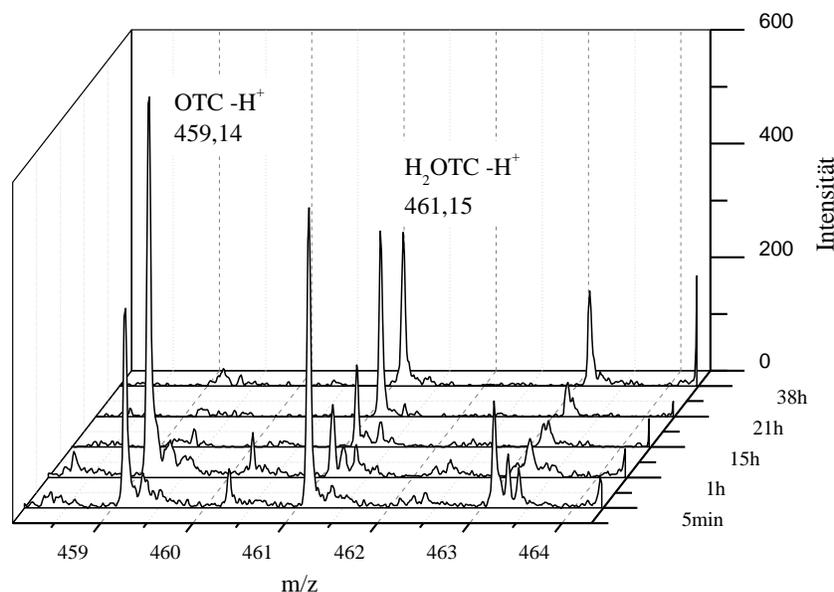
Die Synthese von Oxytetracyclin verläuft über neun sukzessive Kettenverlängerungsschritte, bei welchen Malonyl-CoA zur Konstruktion des Polyketid-Grundgerüsts verknüpft wird. Die Malonamid Starteinheit, welche in der Amidgruppe an C2 resultiert, wird von *oxyD* aus malonyl-CoA synthetisiert. Weitere Zyklisierungsschritte, Keto-Reduktionen, Hydroxylierungen und Methylierungen modifizieren das Grundgerüst in Oxytetracyclin (Schema 9). Der Enzymcluster konnte erfolgreich in permeabilisierten Zellen von *E. coli* BAPI zur Synthese von Oxytetracyclin genutzt werden, sofern die Synthese durch die zuvor entwickelten Versorgungsmodule für ATP, NADPH und SAM unterstützt wurde. Ohne die Verwendung der Versorgungsmodule war keine Bildung von Oxytetracyclin oder dessen Reduktionsprodukt, Dihydro-Oxytetracyclin ( $H_2OTC$ ), messbar. Die Synthese von OTC in permeabilisierten Zellen von *E. coli* BAPI, welche die Expressionsvektoren pMRH08 und pDCS02 enthielten, durch Zugabe von Malonyl-CoA, SAM, NADPH und ATP war ebenfalls nicht festzustellen.



**Schema 9:** Synthese von Oxytetracyclin in permeabilisierten *E. coli* Zellen. Die Synthese von Oxytetracyclin erfolgt in permeabilisierten *E. coli* BAPI pMRH08/pDCS02 Zellen. Acetyl-CoA wird in permeabilisierten *E. coli* BWZ3 pACYC-acs Zellen synthetisiert und von in *E. coli* vorhandener Acetyl-CoA-Carboxylase in Malonyl-CoA umgewandelt. ATP wird in katalytischen Mengen eingesetzt und nach Verbrauch in permeabilisierten *E. coli* BWZ3 pRSF-*adk/ppk* aus AMP und ADP regeneriert. SAM wird nach Bedarf von permeabilisierten *E. coli* BWZ3 pRSF-*metK* synthetisiert. Reduktionsäquivalente in Form von NADPH werden in *E. coli* BWZ3 pRSF-*ptdH* aus NADP<sup>+</sup> synthetisiert. Als Substrate werden Acetat, Polyphosphat, Phosphit und Methionin, sowie katalytische Mengen an CoA (bzw. Panthothenat, L-Cystein, CTP), NADP<sup>+</sup> und ATP dem Reaktionsansatz zugegeben.

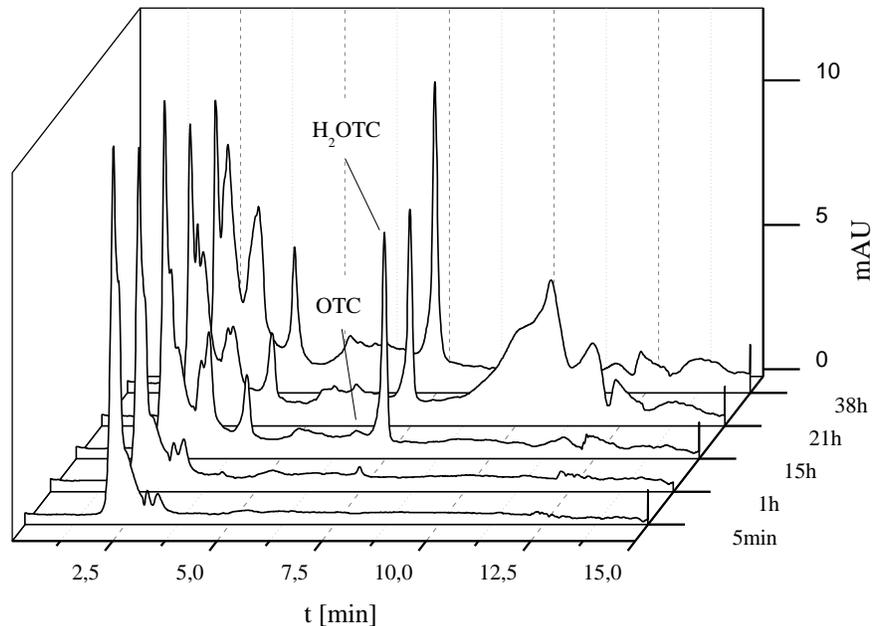
Anhand der Syntheseroute entsprechend Schema 9 wurden mehrere Ansätze mit permeabilisierten Zellen von *E. coli* BAPI pMRH08/pDCS02, *E. coli* BWZ3 pRSF-*adk/ppk*, *E. coli* BWZ3 pRSF-*ptdH*, *E. coli* pACYC-*acs* und *E. coli* BWZ3 pRSF-*metK* auf die Synthese von Oxytetracyclin untersucht. Wie sich herausstellte, wurde Oxytetracyclin in keinem Reaktionsansatz angereichert, wohl aber Dihydro-Oxytetracyclin (Abbildung 13). Während der *in situ* Versorgung mit Cofaktoren durch die entsprechenden Synthesemodule wurde Oxytetracyclin (m/z: 459.14) gebildet. Die Reaktionsmischung wies eine anfängliche Zunahme der Oxytetracyclin-Konzentration auf (Abbildung 13). Oxytetracyclin wurde im

Reaktionsverlauf weiter umgesetzt, was zur Akkumulation von Dihydro-Oxytetracyclin (H<sub>2</sub>OTC, m/z 461,15) führt. Es wird davon ausgegangen, dass eine der Ketogruppen von Oxytetracyclin durch enzymatische Reduktion über Ketoreduktasen reduziert wird. Zur genaueren Definition über die Position der Hydrierung an OTC müssen weitere Studien zur Struktur der Reaktionsprodukte erfolgen. Die Summenformel von H<sub>2</sub>OTC (C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub>N<sub>2</sub>) konnte durch hochauflösende FTICR-Massenanalyse bestätigt werden (siehe Anhang, Seite 98). Die experimentell bestimmte Masse des Peaks bei m/z = 461,15 weicht nur um 1,25 ppm von der theoretischen Masse des einfach negativ geladenen monoisotopischen Dihydro-Oxytetracyclin ab.



**Abbildung 13:** MALDI-TOF MS Analyse der *in situ* OTC Synthese. Massenspektren wurden aus Proben bei 5 min, 1 h, 15 h, 21 h and 38 h von Zentrifugaten der Reaktionsmischung im Negativmodus generiert. Die Proben wurden 1:1 (v/v) mit 9-Aminoacridin-Matrix (9 mg in MeOH) auf einem Edelmetalltarget kokristallisiert. Die Abbildungen zeigt die OTC-Spezies in der Reaktionsmischung nach Inkubation bei 30 °C. Jeweils 25 g/L permeabilisierte Zellen von *E. coli* BAPI pMRH08/pDCS02, *E. coli* BWZ3 pRSF-*adk/ppk*, *E. coli* BWZ3 pRSF-*ptdH*, *E. coli* pRSF pACYC-*acs* und *E. coli* BWZ3 pRSF-*metK* in wurden in 5 mL Reaktionspuffer (0,1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 40 mM NH<sub>4</sub>OAc, 4 g/L NaHPO<sub>3</sub>, 4 g/L Natriumpolyphosphat, 50 μM NADP<sup>+</sup> pH 7,8) vorgelegt und mit 50 μM ATP und Coenzym A versetzt.

OTC ( $t_R = 7,054$  min) und H<sub>2</sub>OTC ( $t_R = 7,493$  min) wurden als Reaktionsprodukt zusammengefasst und gemeinsam quantifiziert (Abbildung 14). Die Produktivität von einem Gramm der Biokatalysatormischung beträgt 2,05 ng/h und erreicht eine Endkonzentration von 0,93 mg/L OTC/H<sub>2</sub>OTC. Da Oxytetracyclin im Verlauf der Reaktion weiter umgesetzt wird, kann auch ein Abbau von Dihydro-Oxytetracyclin nicht ausgeschlossen werden. Das entsprechende vierfach hydrierte Derivat konnte nicht zweifelsfrei als solches identifiziert werden. Im Fall eines weiteren Abbaus von H<sub>2</sub>OTC wäre die eigentliche Syntheserate der eingesetzten Katalysatormischung entsprechend höher.



**Abbildung 14:** Chromatographische Analyse des Reaktionsansatzes zur Synthese von Oxytetracyclin in permeabilisierten Zellen. 20  $\mu\text{L}$  Zentrifugat wurden unbehandelt auf eine  $\text{C}_{18}$ -Säule. Die Chromatogramme wurden mittels DAD-Detektion bei 365 nm generiert und zeigen die Komponenten der Reaktionsmischung im zeitlichen Verlauf zwischen 5 min (vorne) und 38 h (hinten) nach Inkubation bei 30 °C. Jeweils 25 g/L permeabilisierte Zellen von *E. coli* BAPI pMRH08/pDCS02, *E. coli* BWZ3 pRSF-*adk/ppk*, *E. coli* BWZ3 pRSF-*ptdH*, *E. coli* pRSF pACYC-*acs* und *E. coli* BWZ3 pRSF-*metK* in wurden zusammen in 5 mL Reaktionspuffer (0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 40 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , 4 g/L  $\text{NaHPO}_3$ , 4 g/L Natriumpolyphosphat, 50  $\mu\text{M}$   $\text{NADP}^+$  pH 7,8) vorgelegt und mit 50  $\mu\text{M}$  ATP und Coenzym A versetzt.

Es wurde weiter untersucht, ob sich die Synthese durch Verwendung der *in situ* Coenzym A Bereitstellung realisieren lässt (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Quantifizierung von Oxytetracyclin und Dihydro-Oxytetracyclin in Reaktionen mit permeabilisierten Zellen.

	Konzentration OTC / $\text{H}_2\text{OTC}$ [mmol/L]	
	<i>in situ</i> CoA Synthese	CoA, ATP
5min	$0,25 \cdot 10^{-3}$	$0,16 \cdot 10^{-3}$
1h	$0,11 \cdot 10^{-3}$	$0,15 \cdot 10^{-3}$
15h	$1,16 \cdot 10^{-3}$	$1,34 \cdot 10^{-3}$
21h	$1,19 \cdot 10^{-3}$	$1,46 \cdot 10^{-3}$
38h	$2,10 \cdot 10^{-3}$	$1,88 \cdot 10^{-3}$

Die höchste Konzentration wurde bei Synthesen mit *in situ* CoA Synthese erhalten, wobei der Hauptbestandteil  $\text{H}_2\text{OTC}$  ist. Aus den Konzentrationsverläufen lässt sich die Produktivität des Katalysatorgemischs in den ersten 15 Stunden ermitteln (Tabelle 8). Die höchste Produktivität erzielt der Ansatz, bei welchem ATP und Coenzym A zugegeben werden.

**Tabelle 8:** Produktivität der OTC Katalysatorkombination bei der Synthese von Oxytetracyclin und Dihydro-Oxytetracyclin mit verschiedenen Substratkombinationen.

Ansatz	Produktivität [ $\frac{nmol}{g \cdot h}$ ]
in situ CoA Synthese	$3,1 \cdot 10^{-3}$
CoA, ATP	$3,6 \cdot 10^{-3}$

### Anmerkungen

Die Ergebnisse zeigen, dass auch die Synthese von komplexen Sekundärmetaboliten durch Megasyntase-Cluster mit *in situ* Biokatalysatoren realisierbar ist. Das Design optimierter Wirtszellen ist dabei von entscheidender Bedeutung. Im Fall von Sekundärmetaboliten mit Polyketid-Ursprung hat sich die Synthese ausgehend von Acetat bewährt und erzeugt keine signifikanten Nebenprodukte (Krauser et al., 2012). Weitere Optimierungen der Biokatalysator-Mischung zur Vermeidung des Abbaus von Oxytetracyclin könnte die Synthese signifikant verbessern. Deletionen von Ketoreduktase-Genen sollten die Hydrierung von OTC unterbinden und könnten so zum gewünschten Hauptprodukt des Oxytetracyclin-Syntheseclusters führen, sofern dies der Grund für die Entstehung des Dihydro-Derivats ist. Die Synthese von Oxytetracyclin in permeabilisierten Zellen von *E. coli* läuft zwar ab, allerdings wird Oxytetracyclin nicht als Endprodukt erhalten. Das einfach reduzierte Derivat ( $H_2OTC$ ) wird von dem Katalysatormischung angereichert, wodurch nur Kleinstmengen an OTC detektiert werden konnten. Vermutlich wird Oxytetracyclin nach der Synthese im Enzymkomplex durch Ketoreduktasen hydriert, welche in permeabilisierten Zellen bei Anwesenheit von NADPH durchaus aktiv sein können. Eine genaue Identifizierung könnte schwierig sein, da in der Regel keine allzu hohe Selektivität solcher enzymatischen Reduktionen für das jeweilige Substrat vorliegt. Um Oxytetracyclin anzureichern müssten Deletionsvarianten von *E. coli* hergestellt und untersucht werden, wobei es sein kann, dass die Deletion einiger Ketoreduktasen letal für die Zelle wäre.

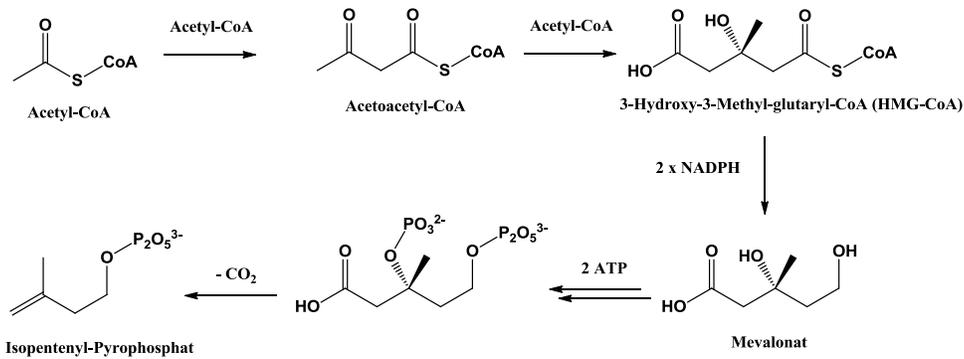
## 4. Abschließende Anmerkungen und Ausblick

Anhand der durchgeführten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, permeabilisierte Zellen zur biokatalytischen Synthese komplexer Sekundärmetabolite zu nutzen. Grundlagen zur *in situ* Synthese von Polyketiden konnten durch die Realisierung der Synthesen von Flaviolin und Oxytetracyclin erarbeitet werden. Dabei wurde festgestellt, dass die Synthese des Polyketid-Grundgerüsts ausgehend von Acetat von Vorteil ist. Die Synthese verläuft ohne signifikante Nebenreaktionen, wenn Acetat als Substrat genutzt wird. Die Regeneration von ATP aus Polyphosphat erhöht die Ausbeute an Flaviolin bezüglich ATP in Synthesen mit Permeabilisierten Zellen um das 26-fache im Vergleich zu stöchiometrischem Einsatz. Die Bereitstellung von NADPH aus Phosphit ist ebenfalls von Vorteil. Weitere Optimierungen des NADPH Versorgungsmoduls können dessen Effizienz steigern (Johannes et al., 2007; Woodyer et al., 2008). Die Versorgung von *in situ* Synthesen mit S-Adenosylmethionin durch eine on-demand Synthese aus ATP und Methionin, ermöglicht den Verzicht auf den kostenintensiven Einsatz stöchiometrischer SAM-Mengen. Die Nutzung der OTC-Megasynthase zur Synthese von Oxytetracyclin zeigt, dass auch komplizierte Strukturen mit permeabilisierten Zellen synthetisiert werden können. Auch hier sind noch einige Optimierungsmöglichkeiten zur Steigerung der Effizienz vorhanden. Das ganze Potential der Synthesemethode ist noch bei Weitem nicht ausgeschöpft. Mit Anschlussprojekten zu weiteren Synthesen, kann die *in situ* Biokatalyse innovative Ansätze zur systematischen Lösung von Syntheseproblemen liefern und zu einer alternativen Technologie heranreifen. Durch die Umsetzung der Synthese von Oxytetracyclin in permeabilisierten Zellen können auch neue Ansätze zur Aufklärung der Biosynthesen komplexer Sekundärmetabolite abgeleitet werden. Die weitestgehend zerstörungsfreie Permeabilisierung der Zellwand ermöglicht den Zugang zu Enzymkomplexen und damit auch zur Untersuchung solcher in einer weitgehend natürlichen Umgebung.

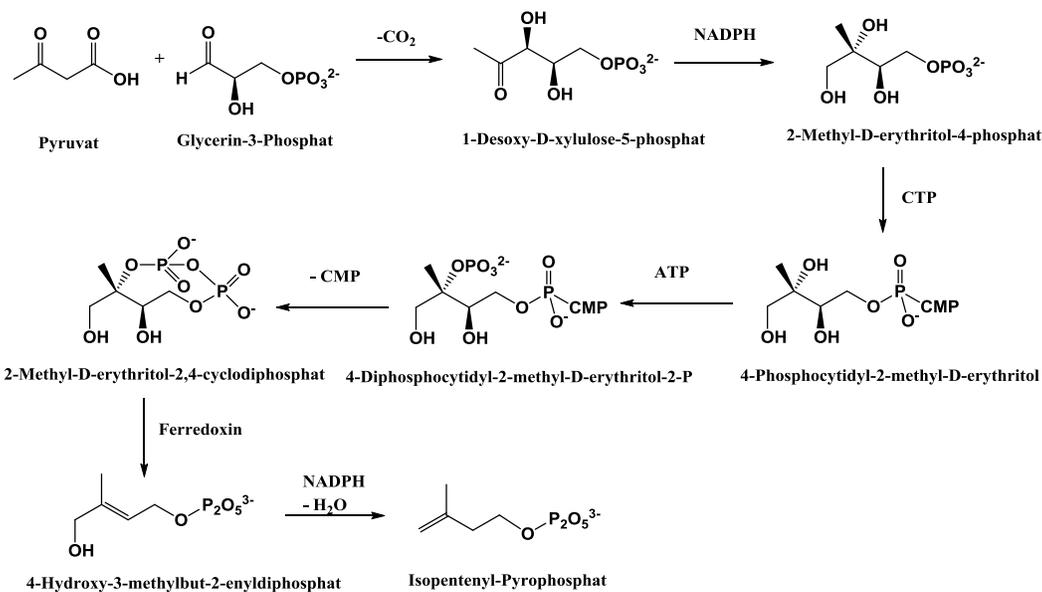
Die Entwicklung von *in situ* Biokatalysatoren basiert auf dem Wissen aus Genetik, Biochemie und Bioinformatik. Es handelt sich um einen Ansatz, welcher aus der Kombination enormer Fortschritte in den Einzeldisziplinen profitiert. Erst die detaillierte Information über metabolische Netzwerke ermöglicht den benötigten Überblick. Gezieltes Design kann mit zuverlässigen Methoden erfolgen, welche die Molekularbiologie mit den entsprechenden Methoden zur genetischen Modifikation bereithält. Während die Netzwerkanalyse bislang noch manuell erfolgt, können bioinformatische Methoden durch eine automatisierte Untersuchung möglicher Syntheserouten das Design funktionsfähiger Biokatalysatoren für *in situ* Synthesen drastisch vereinfachen. Die gesammelten Erkenntnisse aus den Arbeiten zur Synthese von Polyketid-Sekundärmetaboliten können zu Vorschlägen für funktionierende Syntheserouten, ausgehend von möglichst einfachen Substraten als Startpunkt, genutzt werden. Das Ziel sollte es sein anhand einer Retrosynthese mögliche Reaktionsansätze vorzuschlagen, welche in praktischen Experimenten umgesetzt werden können.

Polyketidsynthesen sind weit verbreitet in der Natur. Dennoch sind nur wenige Biosynthesen vollständig aufgeklärt. Der arbeitsintensive Prozess zur Aufklärung unbekannter Biosynthesen könnte mit Hilfe der *in situ* Synthese erleichtert werden. Prinzipiell sollte sich jede Polyketidstruktur mit den Bedingungen zur Oxytetracyclinsynthese erzeugen lassen. Die Vektorplasmide, welche die Gene zur Expression von Enzymen der Cofaktor-Versorgung enthalten, können in entsprechend optimierte Mutanten übertragen werden. Die Funktion sollte dadurch nicht wesentlich beeinträchtigt werden. Die Synthese komplexer Verbindungen wie Oxytetracyclin in einem Schritt ist für organisch chemische Methoden nahezu undenkbar. Der biokatalytische Ansatz über *in situ* Synthesen kann nach weiteren Optimierungen dazu genutzt werden auch technische Lösungen für Syntheseprobleme zu entwickeln. Besonders zur Herstellung pharmazeutischer Ausgangsstoffe können *in situ* Ansätze von Interesse sein. Die one-pot Strategie vereinfacht die praktischen Abläufe enorm. Zudem sorgt die hohe Selektivität enzymatischer Umsetzungen für die erforderliche stereochemische Reinheit.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Synthesecenter komplexer Polyketid-Sekundärmetabolite in permeabilisierten Zellen verwendet werden können, entsteht eine Vielzahl neuer Möglichkeiten auch Synthesen von Peptiden, Terpenen und Kohlenhydrat-Sekundärmetaboliten mit permeabilisierten Zellen zu realisieren. Diese sind ebenfalls von großem Interesse, da auch diese Verbindungen als Leitstrukturen für die Entwicklung von pharmazeutischen Wirkstoffen dienen. Entsprechende Bedingungen für erfolgreiche Synthesen müssen noch ermittelt werden. Es sollte jedoch gelingen, die Precursormoleküle für die jeweilige Sekundärmetabolitklasse durch entsprechende Adaption des Metabolismus geeigneter Zellen bereitzustellen. Entsprechende Arbeiten von Christian Weyler zur Synthese des Oligopeptids Luminmid und Derivaten aus entsprechenden Aminosäurebausteinen in permeabilisierten Hefezellen zeigen vielversprechende Ergebnisse, sind jedoch noch nicht veröffentlicht. Für eine Synthese von Terpenen muss das Monomer Isopentenyl-Pyrophosphat bereitgestellt werden, welches entweder über Mevalonat (Schema 10) oder Methyl-Erythritol (Schema 11) bereitgestellt werden kann. Die entsprechenden Biosynthesewege kommen nicht natürlich in *E. coli* vor, was entweder durch eine Stammkonstruktion oder einen alternativen Organismus gelöst werden muss (Weaver et al., 2015; Yang und Guo, 2014). Andere Cofaktoranforderungen, erfordern die Entwicklung weiterer Versorgungsmodule. So enthält der Methylerythritolphosphatweg beispielsweise einen Schritt, bei welchem Ferredoxin benötigt wird. Können diese Hürden überwunden werden, eröffnet sich ein breites Spektrum weiterer Synthesemöglichkeiten für Terpene in permeabilisierten Zellen.



**Schema 10:** Mevalonatweg zur Synthese von Isopentenyl-Pyrophosphat.



**Schema 11:** Methylerythritolphosphatweg zur Synthese von Isopentenyl-Pyrophosphat.

Die Erforschung der Grundlagen für die multienzymatische Synthese in permeabilisierten Zellen sollte aufgrund der vielversprechenden Resultate weiter ausgedehnt werden. Auch in Bezug auf die Verwendung unnatürlicher Substratanaloga zur Synthese von Strukturderivaten der nativen Produkte sind noch viele Fragen offen. Deren Beantwortung in Folgestudien könnten die Erkenntnisse zur *in situ* Synthese ergänzen. Die Entwicklung dieser Basistechnologie kann dazu beitragen das synthetische Repertoire zu vergrößern, und bietet darüber hinaus neue Möglichkeiten zur Untersuchung komplexer Biosynthesen. Durch entsprechende Forschung können nachhaltige Synthesemethoden für die Bereitstellung essentieller Metabolite zur Synthese von Feinchemikalien etabliert werden. Diese können sowohl modularer Natur sein, als auch gezielt für bestimmte Anwendungen entwickelt werden.

## 5. Material und Methoden

Im Folgenden werden Standardmethoden erläutert, welche bei der praktischen Arbeit zum Einsatz kamen. Besonderheiten und Abweichungen, sowie Details zu Analyseparametern werden in dem entsprechenden Ergebnisteil separat erläutert.

### 5.1 Geräte und Chemikalien

Lösemittel wurden den Originalgebinden der Hersteller, bzw. den in entsprechenden Kits enthaltenen Lösemittelbehältern entnommen.

Chemikalien wurden von Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen und den Herstellerangaben gemäß gelagert.

FastDigest® Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase, Alkaline-Phosphatase und Taq-, bzw. Phusion-DNA-Polymerase wurden von Invitrogen (LifeTechnologies, Thermo Fisher, Darmstadt, Detuschland) bezogen. Der Cloningvektor pRSFduet-1 wurde von Novagen (Merck KGaA, Darmstadt, Detuschland) bezogen.

Kulturen von Mikroorganismen wurden in autoklavierter, ofengetrockneter Glasware im schikanierten Erlenmeyerkolben unter Laboratmosphäre durchgeführt.

Reaktionsgefäße (Eppendorf Tubes und Falcons) aus Polypropylen wurden sterilen Vorratspackungen entnommen (VWR, Bruchsal, Deutschland).

Flüssigmedien und Agarplatten zur Kultivierung wurden 30 Minuten bei 120 °C autoklaviert.

Pufferlösungen mit hitzeempfindlichen Komponenten wurden mit Sterile Syringe Zelluloseacetatfiltern (0,2 µm) sterilfiltriert.

Arbeiten mit Mikroorganismen wurden in einer Sterilwerkbank mit autoklavierten Pipettenspitzen durchgeführt. Verwendete Gegenstände wurden mit 70% Ethanol desinfiziert und bei Bedarf ausgeheizt.

Photometrische Messungen wurden in einem Helios α Einstrahlphotometer von Spectronic Unicam durchgeführt.

## 5.2 Mikroorganismen und Plasmidkonstrukte

Während den praktischen Arbeiten kamen verschiedene Mikroorganismen und Plasmidkonstrukte zum Einsatz. In Tabelle 9 sind diese zusammengefasst.

**Tabelle 9:** Mikroorganismen und Plasmidkonstrukte

Name	Information	Quelle
<i>Corynebacterium Glutamicum</i>	ATCC 13032	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
<i>Escherichia coli</i> BAPI	<i>E. coli</i> BL21 DE3 mit genomisch integriertem Set an Chaperonen	Boddy, University of Ottawa (Boddy und Garza, 2010)
<i>Escherichia coli</i> BWZ3	<i>E. coli</i> BL21 DE3 $\Delta$ <i>ackA/pta</i> $\Delta$ <i>adhE</i>	Zhao, University of Illinois (Zha et al., 2009)
<i>Myxococcus xanthus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
<i>Streptomyces rimosus</i>	<i>S. rimosus</i> , Subspezies <i>rimosus</i> . Natürlicher Produzent von Oxytetracyclin	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
pACYC- <i>acs</i>	pACYCDuet Vektor mit Acetyl-CoA-Synthase ( <i>acs</i> ) Sequenz von <i>E. coli</i>	Zhao, University of Illinois (Zha et al., 2009)
pDSC02	Expressionsvektor mit $\sigma^{54}$ -factor ( <i>rpoN</i> ) Sequenz von <i>M. Xanthus</i>	Boddy, University of Ottawa (Boddy und Garza, 2010)
pET- <i>rppA</i>	pET-16b Vektor mit Polyketid-Synthase ( <i>rppA</i> ) Sequenz von <i>Streptomyces griseus</i>	Ohnishi, Tokyo University (Funa et al., 1999)
pMRH08	Cosmid mit OTC Gencluster von <i>S. rimosus</i> und <i>asgE</i> Promotorregion von <i>M. Xanthus</i>	Boddy, University of Ottawa (Boddy und Garza, 2010)
pRSF- <i>acc</i>	pRSFDuet-1 Vektor mit Acetyl-CoA-Carboxylase-Komplex Sequenz ( <i>acc</i> ) von <i>E. coli</i>	Zhao, University of Illinois (Zha et al., 2009)
pRSF- <i>adk/ppk</i>	pRSFDuet-1 Vektor mit Adenylat-Kinase Sequenz ( <i>adk</i> ) und Polyphosphat-Kinase Sequenz ( <i>ppk</i> ) von <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pRSF- <i>metK</i>	pRSFDuet-1 Vektor mit S-Adenosylmethionin-Synthase Sequenz ( <i>metK</i> ) von <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pRSF- <i>ptdH</i>	pRSFDuet-1 Vektor mit codonoptimierter Sequenz einer E175A/A176R Phosphit-Dehydrogenase Doppelmutante ( <i>ptdH</i> ) von <i>P. stutzeri</i>	Diese Arbeit, Genscript

### 5.3 Pufferlösungen

Pufferlösungen aus Vorratsbehältern wurden vor der Verwendung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und bei Bedarf verdünnt (Tabelle 10).

Tabelle 10: **Pufferlösungen**

Stoffname	Einwaage [g]	Stoffname	Einwaage [g]
<b>Tris-HCl Puffer 100 mM</b>		<b>50-fach Tris-Acetat-EDTA Agarosegel-Laufpuffer</b>	
Tris-HCl 100 mM	12	Ethylendiamintetraessigsäure	14,6
Kaliumchlorid	7,4	ad. 100 mL milliQ, pH 8 (NaOH)	
ad 1 L milliQ, pH 7,8 (HCl)		Tris	242
<b>Ammoniumhydrogencarbonat Puffer 100 mM</b>		Natriumacetat	58
Ammoniumhydrogencarbonat	7,9	ad 1 L milliQ, pH 8	
ad 1 L milliQ, pH 7,8 (HAc)		<b>TB-Puffer</b>	
<b>Polyketid Synthesepuffer</b>		PIPES	0,302
Ammoniumhydrogencarbonat	7,9	Kalziumchlorid	0,22
Ammoniumacetat	3,9	Kaliumchlorid	1,78
ad 1 L milliQ, pH 7,8 (HAc)		ad 100 mL milliQ, pH 6,8 (NaOH)	
<b>ATP Regenerationspuffer</b>		Manganchlorid	1,09
Ammoniumacetat	7,9	steril filtrieren	
Natriumpolyphosphat	5	<b>4-fach SDS Denaturierungspuffer</b>	
ad 1 L milliQ, pH 7,8 (HAc)		Glycerin	2
<b>NADPH Regenerationspuffer</b>		Bromphenolblau	0,005
Tris-HCl	12	Tris	9,2
KCl	7,4	Natriumdodecylsulfat	0,6
Natriumphosphit	1,05	ad 40 mL milliQ	
ad 1 L milliQ, pH 7,8 (HAc)		<b>SDS Laufpuffer</b>	
<b>10-fach Agarosegelladepuffer</b>		Tris	3
Orange G	0,1	Glycin	14,2
Glycerin	0,015	Natriumdodecylsulfat	1
ad 50 mL milliQ		ad 1 L milliQ	

## 5.4 Nährmedien

Zur Kultivierung von Mikroorganismen wurden ausschließlich Komplexmedien verwendet (Tabelle 11) und zur Selektion rekombinanter Organismen mit Resistenzmarkern versetzt. Zum Einsatz kamen Ampicillin (50 mg/L), Chloramphenicol (25 mg/L) und Kanamycin (50 mg/L). Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Nährmedien 1% Agar zugesetzt.

**Tabelle 11:** Nährmedien

Stoffname	Einwaage [g]	Stoffname	Einwaage [g]
<b>LB Medium</b>		<b>LB + 20 mM MgSO<sub>4</sub> Medium</b>	
Trypton	10	Trypton	10
Natriumchlorid	5	Natriumchlorid	5
Hefeextrakt	5	Hefeextrakt	5
ad 1 L milliQ, pH 7,8		Magnesiumsulfat · 7 H <sub>2</sub> O	4,92
		ad 1 L milliQ, pH 7,8	
<b>LB-5G Medium</b>		<b>SOC Medium</b>	
Trypton	10	Trypton	20
Natriumchlorid	5	Natriumchlorid	5
Hefeextrakt	5	Hefeextrakt	5
Glucose	5	Glucose	3,5
ad 1 L milliQ, pH 7,8		Magnesiumsulfat · 7 H <sub>2</sub> O	2,5
		Magnesiumchlorid (wasserfrei)	1
		ad 1 L milliQ, pH 7,8	

## 5.5 Konstruktion von Vektorplasmiden

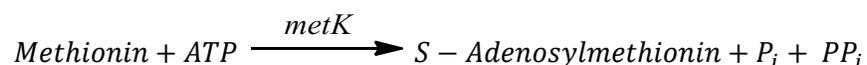
Zur Konstruktion der verwendeten Vektorplasmide wurde die Sequenz des jeweiligen Gens aus der KEGG Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/>) abgefragt. Mit der Vektor-NTI® Sequenzanalyse Software (Life Technologies) wurden entsprechend der vorhandenen Restriktionsschnittstellen der multiple cloning sites (MCSI oder MCSII) auf pRSFDuet-1 geeignete Restriktionsenzyme zur Klonierung des jeweiligen Gens ausgewählt. Anhand der gewählten Restriktionsenzyme wurden Primerpaare zur Amplifikation des Gens designt und von Sigma Aldrich synthetisiert. Die Amplifikation der jeweiligen Gene aus genomischer DNA des Wirtsorganismus wurde mittels optimierter PCR erreicht. Vektor und Genkonstrukt wurden mit FastDigest®-Restriktionsenzymen (Invitrogen) verdaut, wobei der Vektor weiter einer 5'-Dephosphorylierung mit Alkaline-Phosphatase unterzogen wurde. Aufgereinigte DNA

wurde im Verhältnis 1:5 (Vektor:Insert) mit T4 DNA-Ligase (1U) in Ligationspuffer (Invitrogen) mit ATP (0,2 mM) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach 30 minütiger Dialyse gegen 10% Glycerin mit elektroschockkompetenten Zellen (50 µL) vermischt. Nach erfolgter Elektroporation wurden die transformierten Zellen auf Agarplatten mit Selektionsmarker für 24 - 48 h bei 30°C inkubiert. Mutanten wurden mit colony-PCR und Restriktionsverdau des isolierten Plasmids auf die Insertion des Gens geprüft. Plasmidkonstrukte wurden bei GATC-Biotech sequenziert und mit den Originalsequenzen abgeglichen. Mit geeigneten Enzymassays wurde die Aktivität der Genprodukte verifiziert.

### **Konstruktion von *pRSF-metK***

#### **Hintergrund**

In biologischen Systemen werden Methylierungen mehrere wichtige Eigenschaften zugesprochen. Methylgruppen verändern nicht nur die Struktur von biologischem Material, sondern beeinflussen auch wesentlich, wie dieses durch Enzyme und sensorische Proteine erkannt wird. Beispiele hierfür sind die DNA, welche durch Methylierung vor unerwünschter Degradierung geschützt wird, oder die Methylierung von Sekundärmetaboliten, welche die Moleküleigenschaften verändert. Intrazellulär sind vor allem S-Adenosylmethionin (SAM) und Tetrahydrofolsäure (THF) als Methyldonor relevant, wobei THF meist die katabolischen Reaktionen und SAM die metabolischen Reaktionen unterstützt (Loenen, 2006; Matos et al., 1987).



#### ***pRSF-metK***

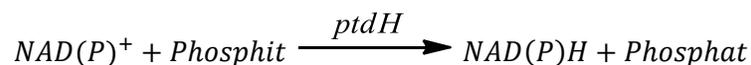
Um SAM zur Synthese von Sekundärmetaboliten bereitzustellen empfiehlt es sich auf eine „on-demand“ Synthese zu setzen. Die Verbindung ist bei physiologischen Bedingungen mäßig stabil und wird schnell zersetzt. Zudem liegt der Marktpreis von SAM bei etwa 8000 €/g was einen stöchiometrischen Einsatz unwirtschaftlich macht. Daher wurde ein SAM-Synthesemodul entwickelt, welches aus ATP und Methionin SAM in geringen Mengen zur Verfügung stellen kann. Die S-Adenosylmethionin Synthase (MetK) aus *C. glutamicum* wurde bereits eingehend untersucht und wurde für eine Überexpression in *E. coli* ausgewählt (Grossmann et al., 2000; Komoto et al., 2004; Matos et al., 1987; Shiomi et al., 1988). Genomische DNA von *C. glutamicum* enthält die *metK* Sequenz (1224 bp).

S-Adenosylmethionin-Synthase (MetK) aus *Corynebacterium glutamicum* mit Startcodonwechsel zu ATG wurde mit 5'-TGAGCTCATGGCTCAGCCAACCGCC-3' und 5'-TAAGCTTTTAGGCCAACTTG-AGGGCTGCG-3' Primern amplifiziert und in die SacI-HindIII Restriktionsschnittstelle von pRSFduet-1 kloniert (Grossmann et al., 2000). *E. coli* BWZ3 wurde durch Standardmethoden mit dem Vektorplasmid transformiert. *E. coli* BWZ3 pRSF-*metK* wurde in LB + 20 mM MgSO<sub>4</sub> mit 50 mg/L Kanamycin bei 37 °C und 230 rpm im schikanierten Erlenmeyerkolben kultiviert. Expression des Vektorgens wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG für zwei Stunden bei 28 °C und 230 rpm induziert.

## **Konstruktion von pRSF-*ptdH***

### **Hintergrund**

Redoxäquivalente werden intrazellulär meist von β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid Spezies übertragen. Daneben sind auch Flavin-Adenin-Dinucleotid und andere Elektronentransporter an der zellulären Elektrochemie beteiligt. Die Redoxäquivalente werden intrazellulär durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff oder aus der oxidativen Aufarbeitung von Kohlenhydraten bereitgestellt. Regenerationsmethoden bedienen sich daher meist dieser Reaktionen um sie in Enzymkaskaden mit einer verbrauchenden Reaktion zu verknüpfen. Im Fall permeabilisierter Zellen ist eine Bereitstellung aus anorganischen Materialien wie z.B. Phosphit von Vorteil, da die Limitierung der Kohlenstoffquellen einen essentiellen Selektivitätsvorteil bringt. Huimin Zhao und sein Mitarbeiter Ryan Woodyer beschäftigen sich schon seit einigen Jahren mit der Anwendung von Phosphit Dehydrogenasen zur Regeneration von NAD(P)H (Woodyer et al., 2003; Woodyer et al., 2006; Woodyer et al., 2005; Woodyer et al., 2008). Speziell für Sekundärmetabolitsynthese wird besonders NADPH benötigt. Hierzu wurde die Phosphit Dehydrogenase von *Pseudomonas stutzeri* intensiven Optimierungen zur Verbesserung der Substratakzeptanz, Aktivität, sowie Temperatur- und Lösemitteltoleranz unterzogen. Zur Verwendung in Synthesen mit permeabilisierten Zellen genügt die verbesserte Substratakzeptanz für NADPH.



### **pRSF-*ptdH***

Die E175A, A176R Doppelmutante der Phosphit Dehydrogenase von *P. stutzeri* weist im Vergleich zum nativen Enzym eine etwa 1000-fach verbesserte Substratakzeptanz für NADPH auf (Woodyer et al., 2003). Das, durch rationales Design optimierte Enzym eignet sich besonders zur Verwendung in permeabilisierten Zellen, da auf eine zusätzliche Kohlestoffquelle in Form von Zuckern verzichtet werden

kann. Zudem ist Phosphit äußerst günstig verfügbar. Die Vorarbeiten von Woodyer et al. auf diesem Gebiet sind ausführlich und bilden die Grundlage für die NADPH Versorgung in permeabilisierten Zellen (Woodyer et al., 2005; Woodyer et al., 2003; Woodyer et al., 2006; Woodyer et al., 2005; Woodyer et al., 2005; Woodyer et al., 2008). *P. stutzeri* Phosphit Dehydrogenase liegt als Oktamer vor, wobei davon auszugehen ist, dass die Punktmutationen am aktiven Zentrum keine Änderung an der Faltung zur Folge haben. Genomische DNA von *P. stutzeri* enthält die *ptdH* Sequenz (1011 bp). Die codonoptimierte Sequenz der ptdH Doppelmutante zur Expression in *E. coli* lautet (Punktmutationen sind fett markiert):

```
ATGCTGCCGAAACTGGTTATTACCCACCGTGTCCATGACGAAATCCTGCAACTGCTGGCTCCG
CACTGTGAACTGATGACGAATCAAACCGATTCAACCCTGACGCGTGAAGAAATTCTGCGTCC
CTGCCGCGATGCACAGGCTATGATGGCGTTTATGCCGGACCGTGTGATGCGGACTTCCTGC
AAGCCTGCCCAGAACTGCGTGTGGTTGGTTGTGCACTGAAAGGTTTTGACAACCTTCGATGTG
GATGCATGTACCGCCCGTGGCGTGTGGCTGACGTTTGTTCGGATCTGCTGACCGTTCGACG
GCAGAACTGGCTATCGGTCTGGCAGTCGGTCTGGGTTCGTCATCTGCGCGCGGCCGATGCATT
TGTCGCTCGGGCGAATTTTCAGGGTTGGCAGCCGCAATTCTATGGCACCGGTCTGGATAATG
CCACGGTGGGCATTCTGGGCATGGGTGCAATCGGTCTGGCGATGGCCGACCGTCTGCAAGGT
TGGGGTGCAACCCTGCAATAACCATGCGCGCCAAAGCCCTGGATAACCCAGACGGAACAACGTC
TGGGCCTGCGCCAGGTGGCATGCAGTGAAGTGTTCGCGAGCAGCGATTTTCATTCTGCTGGCA
CTGCCGCTGAACGCTGACACCCAGCACCTGGTTAATGCAGAACTGCTGGCTCTGGTCCGTC
GGGCGCCCTGCTGGTGAACCCGTGTCGCGGTTCCGTCGTGGATGAAGCAGCTGTGCTGGCAG
CCCTGGAACGTGGTCAGCTGGGCGGTTATGCAGCTGATGTTTTTGAATGGAAGATTGGGCA
CGCGCTGACCGTCCGCGTCTGATCGACCCGGCACTGCTGGCTCATCCGAACACCCTGTTACAG
CCGCACATTGGTTCTGCGGTTCTGCGGTCGTCGCCGTCGCGCTGGAAATCGAACGTTGCGCGGCCAGAA
TATTATCCAAGTGCTGGCGGGTGCTCGTCCGATCAACGCTGCTAACCGTCTGCCGAAAGCCG
AACCGGCTGCCTGCTGA
```

Die translatierte Aminosäuresequenz lautet wie folgt (336 As, 36,44 kDa, Punktmutationen sind fett markiert):

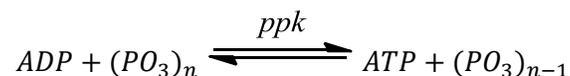
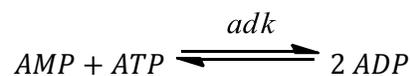
```
MLPKLVITHRVHDEILQLLAPHCELMTNQTDSTLPREEILRRCRDAQAMMAFMPDRVDADFLQA
CPELRVVGKALGFDFNFDVDACTARGVWLTFVDPDLLTVPTAELAIGLAVGLGRHLRAADAFVRS
GKFQGWQPQFYGTGLDNATVGILGMGAIGLAMADRLQGWGATLQYHARKALDTQTEQRLGLR
RVACSELFASDFILLALPLNADTQHLVNAELLALVRPGALLVNPCRGSVVDEAAVLAALERGL
GGYAADVFEDEWARADRPRLIDPALLAHPNTLFTPHIGSAVRAVRLEIERCAAQNIQALAGAR
PINAANRLPKAEPAAAC
```

Zur Konstruktion von pRSF-*ptdH* wurde codonoptimierte E175A, A176R *P. stutzeri* Phosphit Dehydrogenase (PtdH) Doppelpunktmutante (Woodyer et al., 2003; Woodyer et al., 2005) von Genscript nach Vorgaben synthetisiert und in die NdeI-EcoRV Restriktionsschnittstelle von pRSFduet-1 kloniert. *E. coli* BWZ3 wurde durch Standardmethoden mit dem Vektorplasmid transformiert. *E. coli* BWZ3 pRSF-*ptdH* wurde in LB + 20 mM MgSO<sub>4</sub> mit 50 mg/L Kanamycin bei 37 °C und 230 rpm im schikanierten Erlenmeyerkolben kultiviert. Die Expression des Vektorgens wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG für zwei Stunden bei 28 °C und 230 rpm induziert.

## Konstruktion von *pRSF-adk/ppk*

### Hintergrund

Adenosin-5'-triphosphat (ATP) ist die Energiewährung biologischer Systeme. Endergone Reaktionen werden durch Hydrolyse von Phosphorsäure-Anhydrid-Bindungen aktiviert. Kinasen verbrauchen ATP und erzeugen entsprechende Di- oder Monophosphate (ADP/AMP). Durch Phosphorylierungsreaktionen lassen sich ADP und AMP wieder in ATP überführen. Die Möglichkeiten zur Regeneration von ATP sind vielfältig. Im lebenden Organismus entsteht ATP hauptsächlich in der Atmungskette gekoppelt mit ATP Synthase, aber auch während der Glykolyse. In enzymatischen Reaktionen wird ATP in der Regel regeneriert, indem lebende Zellen Glucose verstoffwechseln (Calhoun und Swartz, 2007; Clegg und Jackson, 1988; Ouhabi et al., 1998). Andere Methoden verwenden Pyrophosphat, welches unter Spaltung eine Phosphorsäureanhydridbindung überträgt (Baykov et al., 1999; Bonofiglio et al., 2005; Elling, 1996; Fujita et al., 1998; Hossain et al., 1994; Jensen und Mygind, 1996; Kuroda und Kornberg, 1997; Lee et al., 2011; Tzeng und Kornberg, 2000; Wilson et al., 2013). Eine weitere Methode, welche anorganisches Polyphosphat zur Regeneration von ATP aus ADP nutzt, scheint die vielversprechendste für eine Anwendung in permeabilisierten Zellen zu sein (Itoh et al., 2006; Kameda et al., 2001; Kuroda, 2007; Kuroda und Kornberg, 1997; Moe et al., 1992; Nahalka et al., 2006; Nocek et al., 2008; Noguchi und Shiba, 1998; Proudfoot et al., 2004; Rangarajan et al., 2006; Resnick und Zehnder, 2000; Shiba et al., 2000; Tzeng und Kornberg, 2000; Zhu et al., 2005).



### *pRSF-ppk*

In Zusammenarbeit mit Anne Wilhelm wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit der Expressionsvektor *pRSF-ppk* konstruiert um die Enzymmenge von Ppk zu erhöhen, sodass eine hohe Aktivität in permeabilisierten Zellen zur Verfügung steht. Genomische DNA von *E. coli* BL21 DE3 enthält die *ppk* Sequenz (2067 bp).

### *pRSF-adk/ppk*

Falls ATP in AMP umgewandelt wurde, z.B. durch Hydrolyse, kann durch Phosphorylierung von AMP mit ATP durch Adenylat Kinase ADP erzeugt werden, welches wiederum in den ATP

Regenerationskreislauf eingeht (Berry et al., 2006; Kameda et al., 2001; Motomura et al., 2014; Proudfoot et al., 2004). Darauf aufbauend wurde der Expressionsvektor pRSF-*adk/ppk* für eine Coexpression von Adenylat Kinase und Polyphosphat Kinase konstruiert. Genomische DNA von *E. coli* BL21 DE3 enthält die *adk* Sequenz (645 bp).

Zur Konstruktion von pRSF-*adk* wurde *E. coli* Adenylat Kinase (*adk*) von Genscript nach Vorgaben synthetisiert und in die BamHI-HindIII Restriktionsschnittstelle von pRSFduet-1 kloniert. Zur Konstruktion von pRSF-*adk/ppk* wurde *E. coli* Polyphosphat-Kinase (*ppk*) mit 5'-TACCATGGGTCAGGAAAAGCTATA-3' und 5'-ATGGATCCTTATTCAGGTTGTTCGAG-TGA-3' Primern amplifiziert und in die NcoI-BamHI Restriktionsschnittstelle von pRSF-*adk* kloniert. *E. coli* BWZ3 wurde durch Standardmethoden mit dem Vektorplasmid transformiert. *E. coli* BWZ3 pRSF-*adk/ppk* wurde in LB + 20 mM MgSO<sub>4</sub> mit 50 mg/L Kanamycin bei 37 °C und 230 rpm im schikanierten Erlenmeyerkolben kultiviert. Expression des Vektorgens wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG für zwei Stunden bei 28 °C und 230 rpm induziert.

## 5.6 Synthese von Flaviolin mit permeabilisierten *E. coli* Zellen

Zellsuspensionen (50 g/L in 0,1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> Puffer, pH 7,8) wurden mit 0,25% (v/v) Triton X-100 versetzt und 15 Minuten bei 30 °C mit 230 rpm geschüttelt. Permeabilisierte Zellen von *E. coli* BWZ3 pACYC-*acs/pET-rppA* wurden dreimal mit Ammoniumhydrogencarbonat Puffer gewaschen (pelletieren bei 8500 rpm und resuspendieren) und in Reaktionspuffer (50 mM NH<sub>4</sub>OAc, 50 μM Coenzym A, 0,4 mg/L Triclosan, 0,1 mM Biotin, 20 mM MgSO<sub>4</sub> in 0,1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 7,8) zu Zelldichten von 25 g/L und 50 g/L resuspendiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ATP gestartet und 1 mL Proben zur CoA-Thioester Analyse mit 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril gequencht.

Proben zur MALDI ToF MS Analyse wurden 1:1 mit 9-Aminoacridin Matrix (9 g/L in MeOH) vermischt und auf ein Edelmetalltarget gespottet. Die Messungen wurden mit einem 4800 MALDI ToF/ToF Analyser von Applied Biosystems im Negativmodus ausgeführt.

Pyruvat Dehydrogenase Aktivitäten wurden mit einem Standardassay ermittelt (Hinman und Blass, 1981).

Coenzym A-Thioester wurden mittels nano Ionenpaar Umkehrphasen HPLC-MS an einem Eksigent NanoLC-Ultra 2D HPLC gekoppelt an ein LTQ-Orbitrap Massenspektrometer analysiert (Kiefer et al., 2011). Zur Quantifizierung wurde mit einer Isotopenlösung aus Zellextrakt von <sup>13</sup>C Methanol Kulturen von *Methylobacterium extorquens* AM1 nach Wu et al. gearbeitet (Wu et al., 2005). Der Zellextrakt

enthält eine Ansammlung U-<sup>13</sup>C markierter CoA-Thioester bekannter Konzentration zu welchen auch Acetyl-CoA zählt. Da nur Spuren im Zellextrakt enthalten waren, wurde Malonyl-CoA mittels eines co-eluierenden Masse Peaks bei  $m/z = 891,2093$ , bestehend aus Succinyl- und Methylmalonyl-CoA als internem Standard quantifiziert. Dazu wurden 1-10  $\mu\text{M}$  Malonyl-CoA Standards mit isotoopenmarkiertem Zellextrakt vor der Analyse vermischt. Die extrahierten Ionenchromatogramme monoisotopischer Masse von Malonyl-CoA wurden zu Auswertung auf die internen Standards normalisiert. Die resultierende Kalibrierkurve war linear ( $R^2 > 0,99$ ).

## 5.7 Versorgung mit ATP, NADPH und SAM in mehrstufigen Biokatalysen mit permeabilisierten *E. coli* Zellen

*E. coli* BWZ3 ( $\Delta\text{adhE } \Delta\text{ackA/pta}$  Deletionsmutant von *E. coli* BL21 DE3) (Zha et al., 2009), zur Verfügung gestellt von Huimin Zhao (University of Illinois) wurde als Wirtszelle für die Expression von Vektorplasmid-Genen genutzt. *E. coli* BAPI (*E. coli* BL21 DE3 mit einem Set an Chaperonen) wurde verwendet um die Expression von pRSF-*ptdH* zu überprüfen.

### **Enzym- /Redoxreaktionen**

Permeabilisierte Zellen von *E. coli* BWZ3 pRSF-*ptdH* wurden in 0,1 M Tris/KCL Puffer (pH 7,8) zu einer Zelldichte von 50 mg/ml resuspendiert und mit 50 mg/L Phenazin-methosulfat (PMS) und 0,1 mM Nitroblue Tetrazolium (NBT) bzw. 10 mM Indophenol Blue (DCPIP) versetzt. Die Redoxreaktion wurde durch Zugabe von Natriumphosphit und  $\text{NADP}^+$  (50  $\mu\text{M}$  bzw. 25  $\mu\text{M}$ ) gestartet. Die ATP Regeneration wurde mit einem Flaviolin Synthese Assay verfolgt (Krauser et al., 2012) (siehe Seite 74). NADPH abhängige Reduktion von Nitrat zu Nitrit durch Nitrat-Reduktase und anschließende kolorimetrische Quantifizierung der Nitrit-abhängigen Bildung eines Diazo-Farbstoffs wurde entsprechend dem Boehringer Nitrit/Nitrat Assay durchgeführt (Beutler et al., 1986).

### **Trennung, Detektion und Quantifizierung von SAM**

Alle Messungen wurden an einem Dionex Ultimate 3000 RSLC System mit einer Waters BEH C<sub>18</sub>, 50 · 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  dp Säule mit 1  $\mu\text{L}$  Probevolumen durchgeführt (Kirsch et al., 2009). Eine Trennung wurde durch isokratische Elution mit 0,1% Ameisensäure in Wasser bei einer Flussrate von 350  $\mu\text{L}/\text{min}$  und 45 °C erreicht. LC-MS Kopplung wurde mit einem Advion Triversa Nanomate nano-ESI System angeschlossen an eine Thermo Fisher Orbitrap umgesetzt. SAM wurde über single-reaction-monitoring (SRM) der linearen Ionenfalle quantifiziert. Das Vorläuferion wurde bei  $m/z = 399,1 \pm 1$  isoliert und mit

CID bei 35 eV fragmentiert. SRM-basierende Peakflächen des charakteristischen  $m/z = 250$  Fragments (Methioninabspaltung) wurde zur Quantifizierung verwendet. Eine 5-Punkt Kalibrierkurve wurde aus Standards von Sigma Aldrich (> 80%) erstellt. Vollständige Massenspektren wurden zwischen  $m/z$  von 150 – 500 bei einer Auflösung von  $R=30000$  generiert.

## 5.8 Synthese von Oxytetracyclin in permeabilisierten *E. coli* Zellen

Eine Vielzahl von Studien beschäftigte sich mit der quantitativen Analyse von Oxytetracyclin in Lebensmitteln wie Milch und Fleisch (Boatto et al., 1999; Fletouris und Papapanagiotou, 2008; Furusawa, 2003; Loke et al., 2003; Lykkeberg et al., 2004; Maia et al., 2007; Smola und Urleb, 2000; Smyrniotakis und Archontaki, 2007; Zhang, 2003). Exzessive Einsätze von Oxytetracyclin in der Viehzucht machten es nötig Produkte und Umwelt auf Rückstände von OTC zu testen und verlässliche Methoden zur Quantifizierung zu entwickeln. Zur Bestimmung von Oxytetracyclin eignen sich chromatographische Methoden (HPLC) wie auch bestimmte spektrometrische Analysen (IR-, UV-Analyse).

### ***Trennung, Detektion und Quantifizierung von OTC***

UPLC Analyse wurde mit einem Agilent Infinity UPLC System durch eine Gemini 5U C<sub>18</sub> 110A, 150 x 4.6 mm Trennsäule durchgeführt. Eine Trennung von 20  $\mu$ L Probevolumen wurde erreicht mit Gradientelution Acetonitril / 0.1 % Phosphorsäure von 7.5 % auf 25 % Acetonitril über 9.5 Minuten bei einer Flussrate von 0.8 ml/min. Die Detektion von Oxytetracyclin erfolgte durch einen Diode Array Detektor (DAD) bei 365 nm. Peakflächen der Elutionspeaks bei 7.054 min und 7.493 min wurden zur Quantifizierung genutzt. Eine neunpunkt-Kalibrierkurve wurde anhand eines Kommerziellen Standards für Oxytetracyclin (Sigma Aldrich, >99 %) erstellt. Zur Analyse mit MALDI-ToF Massenspektrometrie wurden die Proben 1:1 mit 9-Aminoacridin-Matrix (9 mg/ml in MeOH) gemischt. Die Proben wurden im Negativmodus bei Laser-Intensitäten zwischen 3700 und 4600 mit einem Applied Biosystems 4800 MALDI-ToF/ToF analyzer analysiert. Hochauflösende Massenanalyse wurde mit MALDI-FTICR durchgeführt. Proben der MALDI-ToF Analyse wurden auf ein MALDI-Target zur Analyse mit einem Bruker solariX ESI/MALDI-FTICR-MS transferiert. Die MALDI Quelle mit gepulstem ND:YAG Laser wurde bei -100 V plate offset und -180 V deflector plate mit 50 % Laserintensität betrieben. Ionen wurden direkt in einen Octopole Ionenleiter (5 MHz) gespeist, während mit flüssigem Helium gekühlt wurde. Ionen aus 250 Laserbeschüssen wurden bei 14 V im Octopole akkumuliert und bei 7 V in die Analysezelle extrahiert.

## **Synthese von Oxytetracyclin**

Reaktionsmischungen zur Synthese von Oxytetracyclin mit OTC-Megasynthase enthielten ein Gemisch aus permeabilisierten Zellen von 5 verschiedenen Stämmen (*E. coli* BAPI pMRH08/pDCS02, *E. coli* BWZ3 pRSF-*adk/ppk*, *E. coli* BWZ3 pRSF-*ptdH*, *E. coli* BWZ3 pRSF-*metK* and *E. coli* BWZ3 pRSF-*acs*), wobei die Zelldichte jeweils 25 g/L betrug. Die permeabilisierten Zellen wurden in Reaktionspuffer (100  $\mu$ M ATP, 50  $\mu$ M NADP<sup>+</sup>, 50  $\mu$ M CoA, 50  $\mu$ M Methionin, 40 mM NH<sub>4</sub>OAc, 4 g/L Natriumphosphit und 4 g/L Natriumpolyphosphat in 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> Puffer, pH 7.8) resuspendiert. Proben mit einem Volumen von 1 ml wurden bei 8500 g zentrifugiert und das Zentrifugat der Analyse zugeführt.

## **5.9 Molekularbiologische Standardmethoden**

### **PCR**

Zur Amplifikation von DNA Fragmenten wurde DNA-Polymerase thermophiler Organismen genutzt. Diese wurde in einer Reaktionslösung mit DNA Template und Primerpaaren etwa 20-30 Denaturierungs- und Syntheszyklen ausgesetzt, was zu einer exponentiellen Konzentrationszunahme des Zielfragments führt. In der präparativen Molekularbiologie nutzt man die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Herstellung modifizierter DNA Fragmente, indem man die Primer-DNA mit Basenpaarsequenzen von Restriktionsschnittstellen verlängert oder Punktmutationen einfügt. Qualitativ lassen sich durch die Amplifikation kleinste DNA Spuren analysieren, sofern die Zielsequenz bekannt ist.

Bei den praktischen Arbeiten wurde Taq-DNA-Polymerase (1U) bzw. Phusion-DNA-Polymerase (0,5U) (Invitrogen) mit 50 ng Template DNA, Primern (2  $\mu$ M) und dNTP's (0,2 mM) in mitgeliefertem Reaktionspuffer angesetzt. Feintuning der Polymerase-Reaktionen erfolgte durch Variation von Annealing- und Elongationstemperatur, sowie DMSO und MgCl<sub>2</sub> Zugabe. Die Reaktionsansätze wurden im Anschluss durch Agarosegelelektrophorese analysiert, bzw. aufgereinigt.

### **Herstellung kompetenter Zellen**

#### **Elektrokompetente Zellen**

Zur Herstellung elektroschockkompetenter Zellen werden 100 mL LB-5G Medium mit 1 mL Vorkultur inokuliert und bei 37 °C bis zu OD<sub>660nm</sub> 0,5 im Schüttelkolben kultiviert. Die Zellen werden bei 5000 rpm in der Zentrifuge pelletiert und dreimal in autoklaviertem milliQ resuspendiert. Die gewaschenen Zellen werden in autoklavierter 10% Glycerinlösung zu einer Zelldichte von 10 g/L resuspendiert, und in 50  $\mu$ L

Aliquoten bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zellen sind mehrere Monate stabil und können direkt in Elektroschocktransformationen verwendet werden.

### **Hitzeschockkompetente Zellen**

Zur Herstellung hitzeschockkompetenter Zellen werden 100 mL LB + 20 mM  $\text{MgSO}_4$  Medium mit 1 mL Vorkultur inokuliert und bei  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zu  $\text{OD}_{660\text{nm}}$  0,5 im Schüttelkolben kultiviert. Die Zellen werden 10 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 3000 rpm in der  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlten Zentrifuge pelletiert. Das Pellet wird mit kaltem, sterilem TB-Puffer resuspendiert und steril in 2/3 TB-Puffer und 1/3 DMSO bei einer Zelldichte von 10 g/L gelagert. Aliquote zu 50  $\mu\text{L}$  werden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  sind die Zellen mehrere Monate stabil und können direkt in Hitzeschocktransformationen verwendet werden.

### **Transformation kompetenter Zellen**

#### **Elektroporation**

Elektrokompetente Zellen (50  $\mu\text{L}$ ) werden mit Plasmid-DNA (200 ng) vermischt und in einer Elektroporationsküvette 4 s bei 2,5 kV, 200  $\Omega$  und 25  $\mu\text{F}$  mit einem Gene Pulser (Bio-Rad) geschockt. Die transformierten Zellen werden in 0,9 mL SOC-Medium aufgenommen und eine Stunde bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  kultiviert, bevor sie auf einer Agarplatte mit Resistenzmarker ausplattiert werden. Es ist zu beachten dass die Plasmid-DNA möglichst salzfrei ist. Gegebenenfalls muss vor der Transformation gegen 10% Glycerinlösung dialysiert oder mit midi-prep Säulen aufgereinigt werden.

#### **Hitzeschocktransformation**

Hitzeschockkompetente Zellen (50  $\mu\text{L}$ ) werden mit Plasmid-DNA (200 ng) vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wird anschließend 30 Sekunden auf  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt und sofort wieder für 2 min auf Eis gekühlt. Die Zellen werden in 0,9 mL SOC-Medium aufgenommen und eine Stunde bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  kultiviert, bevor sie auf einer Agarplatte mit Resistenzmarker ausplattiert werden. Die hitzeschockkompetenten Zellen sollten vor der Transformation bei einer Temperatur von maximal  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  bereit gehalten werden.

## 5.10 Elektronenmikroskopie

### *Environmental Scanning Elektronen Mikroskopie (ESEM)*

Bei der ESEM wird die Probe auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Elektronenstrahl abgetastet. Der Vorteil der ESEM besteht darin, dass geringe Mengen an Wasser in der Probe vorhanden sein können. Proben zur Untersuchung im ESEM wurden mit 2 % Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatlösung (Sigma-Aldrich) fixiert und sukzessive mit Ethanol entwässert und mit Hexamethylsilazan auf einem Objektträger aus Borsilikat Glas eingetrocknet.

### *Transmissions Elektronenmikroskopie (TEM)*

Die TEM ist eine sehr hochauflösende Variante der Elektronenmikroskopie. Dabei werden ultradünnschnitte von Proben mit Elektronen beschossen und die Beugungsmuster der durchgängigen Elektronen in ein Bild umgewandelt. Die Proben werden ähnlich der ESEM mit 2 % Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatlösung fixiert und anschließend in ein Polymerharz eingeschlossen. Dieses wird nach dem Aushärten in Ultradünnschnitte geschnitten. TEM Bilder wurden von der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes angefertigt und untersucht.

## 5.11 Analysemethoden

### *MALDI-MS*

Bei der Matrix gestützten Laser-Desorptions-Ionisierung Massenspektrometrie (MALDI-MS) macht man sich die Energie eines Laserstrahls zu Nutze um die Probe in eine massenspektrometrisch analysierbare Form zu Überführen. Matrixmoleküle, vornehmlich organische Substanzen mit der Affinität Protonen aufzunehmen oder abzugeben, absorbieren die Laserenergie und erzeugen Plasma aus einem Matrix-Probenmischung. In diesen werden Protonen auf das Probenmolekül übertragen oder abgespalten, was eine Ladung am Analyt verursacht. Beschleunigt durch ein starkes elektromagnetisches Feld wird die Flugzeit der geladenen Probenmoleküle vom Beschleuniger zum Detektor sehr genau vermessen und aus der Dauer ein Masse/Ladungs-Verhältnis errechnet. Der Detektor wandelt dabei die Einschläge von geladenen Probenmolekülen durch Verstärkung direkt in ein elektrisches Signal.

MALDI-Tof MS Analysen erfolgten an einem 4800 MALDI ToF/ToF Analyzer von Applied Biosystems. Ionen aus 1250 Beschüssen mit einem Stickstofflaser bei einer Intensität von 3800 wurden mit einer Verzögerung von 400 ns mit 15 kV beschleunigt und im Reflektormodus analysiert.

MADLI-FTICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonanz) Analysen erfolgten an einem solariX ESIMALDI-FTICR Massenspektrometer der Firma Bruker. Die MALDI Quelle wurden mit einem ND:YAD Laser beschossen und direkt in eine Octopol-Ionenleitung (5 MHz) extrahiert und mit flüssigen Helium gekühlt. Ionen aus 250 Laserbeschüssen wurden im Octopol bei 14 V akkumuliert und mit 7 V extrahiert.

### **HPLC/UPLC**

Chromatographische Verfahren eignen sich sehr gut um komplexe Proben nach bestimmten Kriterien aufzutrennen und die einzelnen Analyte zu quantifizieren. Dabei werden Analytmischungen auf eine stationäre Phase gegeben und mit einer mobilen Phase eluiert. Dabei stehen zahlreiche Kombinationen aus stationärer Phase und Eluent zu Verfügung um die jeweiligen Moleküleigenschaften zu adressieren. Die verbreitetste Variante ist die Umkehrphasen Chromatographie (RPLC), bei welcher die Probe anhand der Hydrophobie der einzelnen Analyten aufgetrennt wird. Eluiert wird meist mit einem Gemisch aus organischen Lösemitteln und Wasser. Zur quantitativen Analyse verwendet man hauptsächlich mit stationärer Phase gepackte Trennsäulen, über welche mit einem definierten Fluss Eluent gepumpt wird. Der Unterschied zwischen HPLC und UPLC besteht hauptsächlich in Packungsdichte und Korngröße der verwendeten Trennsäule und dem daraus resultierenden Druck zum Transport der mobilen Phase, welcher im Fall der UPLC bis zu 400 bar betragen kann. Die Detektion erfolgt meist online über UV/Vis-Methoden wie beispielsweise einem Diode Array Detektor oder einem Fluoreszenz Lumineszenz Detektor.

Zur Analyse von Oxytetracyclin kam eine Agilent Infinity UPLC Anlage mit einer Gemini 5U C<sub>18</sub> 110A, 150 x 4.6 mm Umkehrphase zum Einsatz.

### **LC-MS**

Die Kopplung von chromatographischen und massenspektrometrischen Methoden ermöglicht eine qualitative und eine quantitative Analyse komplexer Proben. Zudem weisen LC-MS Methoden eine sehr hohe Empfindlichkeit auf, was die Nachweisgrenze stark herabsetzt. Die Kopplung erfolgt meist online durch Aufsplitten des Eluats aus der chromatographischen Trennung und Elektro Spray Ionisierung. Dabei wird der Analyt vom Eluent getrennt und mit einer Ladung versehen, bevor im Massenspektrometer die genaue Masse bestimmt wird. Auch bei der LC-MS bestehen zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten, was diese Methode zu der wichtigsten Analyseverfahren in der Bioanalytik werden ließ.

## ***Gelelektrophorese***

Zur Auftrennung geladener Proben eignen sich elektrophoretische Methoden, bei welchen die geladenen Probenmoleküle im elektromagnetischen Feld entsprechend ihrer Ladung und hydrodynamischem Radius in einer Pufferlösung zur Anode oder Kathode wandern. Besonders wird die Elektrophorese bei der Trennung von DNA-Fragmenten eingesetzt, wobei hier zusätzlich eine Gelmatrix benötigt wird, da das Verhältnis von Ladung und hydrodynamischem Radius bei DNA für alle Größen konstant bleibt. In der Molekularbiologie bedient man sich meist eines Agarosegels, da dieses leicht handhabbar ist und eine Maschengröße aufweist, mit welcher DNA-Fragmente nach der Größe aufgetrennt werden können. Zur Detektion wird die Einlagerung von Ethidiumbromid in die Doppelhelix der DNA genutzt, welche mit UV-Licht angeregt zu einer Fluoreszenz führt.

Proben zur elektrophoretischen Auftrennung wurden mit Orange G Ladepuffer versetzt und mit einem Gel aus 1% Agarose in TAE-Puffer bei konstanter Spannung von 110V aufgetrennt.

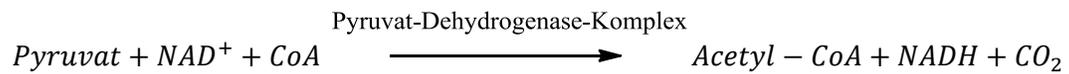
## ***Photometrie***

Die Photometrie basiert auf der Absorption elektromagnetischer Strahlung durch Materie. Atome und Moleküle absorbieren elektromagnetische Strahlung auf eine für jedes Element und Verbindung charakteristische Weise. Dies macht man sich zu Nutze um bei den jeweiligen Absorptionsmaxima quantitative Analyse durchzuführen. In einem gewissen Konzentrationsbereich ist die Absorption linear proportional zur Konzentration des absorbierenden Analyt und folgt dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Durch Kalibrierung mit einem Standard lassen sich auf diese Weise zahlreiche, meist farbige, Verbindungen quantifizieren.

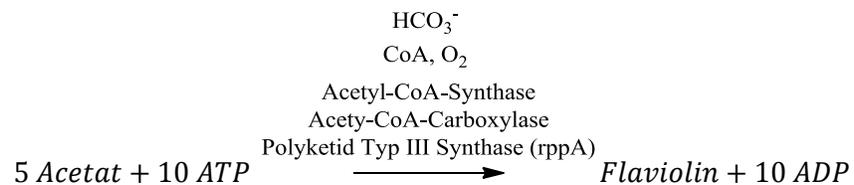
## ***Enzymassays***

Zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen eignen sich besonders Enzymassays, welche leicht und selektiv detektierbare Substrate verbrauchen oder deren Produkte in entsprechender Weise analysiert werden können. In der Praxis haben sich photometrische Methoden bewährt. Oft werden Aktivitätsbestimmungen mit einer Folgereaktion gekoppelt um die entsprechende Detektierbarkeit zu erreichen. Am weitesten verbreitet sind dabei Redox-Reaktionen welche  $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid Spezies verbrauchen. Diese lassen sich aufgrund ihrer charakteristischen und intensiven Absorption im nahen UV bei 340 nm leicht photometrisch analysieren und ermöglichen eine online Verfolgung.

Zur Überprüfung, ob *E. coli* Zellen nach der Behandlung mit Triton bzw. Digitonin in einem permeabilisierten Zustand vorlagen, wurde ein  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  gekoppelter Pyruvat-Dehydrogenase Assay verwendet (Hinman und Blass, 1981).



Zur Ermittlung der Aktivität der Flaviolin-Synthese kam ein selbstentwickelter photometrischer Assay zum Einsatz (Krauser et al., 2012). Dabei wurde Acetat mit ATP in Anwesenheit von CoA und Hydrogencarbonat zu Flaviolin umgesetzt. Detektiert wurde bei 520 nm.



## 6. Referenzen

- Abraham, J., Bhat, S., Permeabilization of baker's yeast with N-lauroyl sarcosine *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2008**, *35*, 799-804.
- Achbergerova, L., Nahalka, J., Polyphosphate - an ancient energy source and active metabolic regulator *Microbial Cell Factories* **2011**, *10*.
- Achbergerova, L., Nahalka, J., PPK1 and PPK2-which polyphosphate kinase is older? *Biologia* **2014**, *69*, 263-269.
- Aehle, W., Enzymes in industry, Wiley-VCH, **2004**.
- Aidemark, M., Andersson, C. J., Rasmusson, A. G., Widell, S., Regulation of callose synthase activity in situ in alamethicin-permeabilized Arabidopsis and tobacco suspension cells *Bmc Plant Biology* **2009**, *9*.
- Akai, S., Hanada, R., Fujiwara, N., Kita, Y., Egi, M., One-Pot Synthesis of Optically Active Allyl Esters via Lipase-Vanadium Combo Catalysis *Organic Letters* **2010**, *12*, 4900-4903.
- Alcantara, R., Axelsen, K. B., Morgat, A., Belda, E., Coudert, E., Bridge, A., Cao, H., de Matos, P., Ennis, M., Turner, S., Owen, G., Bougueleret, L., Xenarios, I., Steinbeck, C., Rhea-a manually curated resource of biochemical reactions *Nucleic Acids Research* **2012**, *40*, D754-D760.
- Aragon, J. J., Feliu, J. E., Frenkel, R. A., Sols, A., Permeabilization of Animal Cells for Kinetic Studies of Intracellular Enzymes - In situ Behavior of the Glycolytic Enzymes of Erythrocytes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **1980**, *77*, 6324-6328.
- Austin, M. B., Izumikawa, M., Bowman, M. E., Udvary, D. W., Ferrer, J. L., Moore, B. S., Noel, J. P., Crystal structure of a bacterial type III polyketide synthase and enzymatic control of reactive polyketide intermediates *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 45162-45174.
- Banerjee, R., Ragsdale, S. W., The many faces of vitamin B-12: Catalysis by cobalamin-dependent enzymes *Annual Review of Biochemistry* **2003**, *72*, 209-247.
- Bar-Even, A., Tawfik, D. S., Engineering specialized metabolic pathways-is there a room for enzyme improvements? *Current Opinion in Biotechnology* **2013**, *24*, 310-319.
- Basu, S. S., Blair, I. A., SILEC: a protocol for generating and using isotopically labeled coenzyme A mass spectrometry standards *Nature Protocols* **2012**, *7*, 1-11.
- Baykov, A. A., Hyytiä, T., Turkina, M. V., Efimova, I. S., Kasho, V. N., Goldman, A., Cooperman, B. S., Lahti, R., Functional characterization of Escherichia coli inorganic pyrophosphatase in zwitterionic buffers *European Journal of Biochemistry* **1999**, *260*, 308-317.
- Becker, D. M., Guarente, L., High-Efficiency Transformation of Yeast Cells By Electroporation *Methods in Enzymology* **1991**, *194*, 182-187.
- Becker, J., Zelder, O., Haefner, S., Schroeder, H., Wittmann, C., From zero to hero-Design-based systems metabolic engineering of Corynebacterium glutamicum for L-lysine production *Metabolic Engineering* **2011**, *13*, 159-168.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Sayers, E. W., GenBank *Nucleic Acids Research* **2013**, *41*, D36-42.
- Bernal, V., Sevilla, A., Canovas, M., Iborra, J. L., Production of L-carnitine by secondary metabolism of bacteria *Microbial Cell Factories* **2007**, *6*, 1-17.
- Berry, M. B., Bae, E. Y., Bilderback, T. R., Glaser, M., Phillips, G. N., Crystal structure of ADP/AMP complex of Escherichia coli adenylate kinase *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2006**, *62*, 555-556.

- Beutler, H. O., Wurst, B., Fischer, S., A New Method to Enzymatically Determine Nitrate in Foodstuffs *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **1986**, 82, 283-289.
- Boatto, G., Pau, A., Palomba, M., Arenare, L., Cerri, R., Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1999**, 20, 321-326.
- Boddy, C. N., Garza, A., System and Method For the Heterologous Expression of Polyketide Synthase Gene Clusters *US Patent* **2010**.
- Bode, H. B., Muller, R., The impact of bacterial genomics on natural product research *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, 6828-6846.
- Bogman, K., Erne-Brand, F., Alsenz, J., Drewe, J., The role of surfactants in the reversal of active transport mediated by multidrug resistance proteins *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, 92, 1250-1261.
- Bonnafous, J.-C., Dornand, J., Mani, J.-C., Alamethicin or detergent permeabilization of the cell membrane as a tool for adenylate cyclase determination: Application to the study of hormone responsiveness in lymphocytes *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1982**, 720, 235-241.
- Bonofiglio, L., García, E., Mollerach, M., Biochemical Characterization of the Pneumococcal Glucose 1-Phosphate Uridyltransferase (GalU) Essential for Capsule Biosynthesis *Current Microbiology* **2005**, 51, 217-221.
- Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., Robins, K., Engineering the third wave of biocatalysis *Nature* **2012**, 485, 185-194.
- Brachmann, A. O., Bode, H. B., Identification and Bioanalysis of Natural Products from Insect Symbionts and Pathogens *Yellow Biotechnology I: Insect Biotechnologie in Drug Discovery and Preclinical Research* **2013**, 135, 123-155.
- Branco, R. J. F., Graber, M., Denis, V., Pleiss, J., Molecular Mechanism of the Hydration of *Candida antarctica* Lipase B in the Gas Phase: Water Adsorption Isotherms and Molecular Dynamics Simulations *ChemBioChem* **2009**, 10, 2913-2919.
- Broadwater, S. J., Roth, S. L., Price, K. E., Kobaslija, M., McQuade, D. T., One-pot multi-step synthesis: a challenge spawning innovation *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, 3, 2899-2906.
- Bujara, M., Panke, S., In silico assessment of cell-free systems *Biotechnology and Bioengineering* **2012**, 109, 2620-2629.
- Caiazzo, A., Garcia, P. M. L., Wever, R., van Hest, J. C. M., Rowan, A. E., Reek, J. N. H., Synergy between chemo- and biocatalysts in multi-step transformations *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, 7, 2926-2932.
- Calhoun, K. A., Swartz, J. R., Energy systems for ATP regeneration in cell-free protein synthesis reactions *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2007**, 375, 3-17.
- Cánovas, M., Torroglosa, T., Iborra, J. L., Permeabilization of *Escherichia coli* cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into l-carnitine *Enzyme and Microbial Technology* **2005**, 37, 300-308.
- Caspi, R., Altman, T., Dreher, K., Fulcher, C. A., Subhraveti, P., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., Ong, Q., Paley, S., Pujar, A., Shearer, A. G., Travers, M., Weerasinghe, D., Zhang, P. F., Karp, P. D., The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases *Nucleic Acids Research* **2012**, 40, D742-D753.
- Cheng, Q., Xiang, L., Izumikawa, M., Meluzzi, D., Moore, B. S., Enzymatic total synthesis of enterocin polyketides *Nature Chemical Biology* **2007**, 3, 557-558.
- Cheng, S., Wei, D., Song, Q., Zhao, X., Immobilization of permeabilized whole cell penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis* using pore matrix crosslinked with glutaraldehyde *Biotechnology Letters* **2006**, 28, 1129-1133.
- Chiang, P. K., Gordon, R. K., Tal, J., Zeng, G. C., Doctor, B. P., Pardhasaradhi, K., McCann, P. P., S-adenosylmethionine and methylation *Faseb Journal* **1996**, 10, 471-480.

- Clardy, J., Walsh, C., Lessons from natural molecules *Nature* **2004**, *432*, 829-837.
- Clegg, J. S., Jackson, S. A., Glycolysis in Permeabilized L-929 Cells *Biochemical Journal* **1988**, *255*, 335-344.
- Colbeau, A., Nachbaur, J., Vignais, P. M., Enzymatic Characterization and Lipid Composition of Rat Liver Subcellular Membranes *Biochimica Et Biophysica Acta* **1971**, *249*, 462-&.
- Cook, G. A., Gattone, V. H., Evan, A. P., Harris, R. A., Structural Changes of Isolated Hepatocytes During Treatment with Digitonin *Biochimica Et Biophysica Acta* **1983**, *763*, 356-367.
- Crane, F. L., Biochemical functions of coenzyme Q(10) *Journal of the American College of Nutrition* **2001**, *20*, 591-598.
- Crotti, L. B., Drgon, T., Cabib, E., Yeast cell permeabilization by osmotic shock allows determination of enzymatic activities in situ *Analytical Biochemistry* **2001**, *292*, 8-16.
- Cryle, M. J., Schlichting, I., Structural insights from a P450 Carrier Protein complex reveal how specificity is achieved in the P450(Biol) ACP complex *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 15696-15701.
- Curran, K. A., Crook, N. C., Alper, H. S., Using flux balance analysis to guide microbial metabolic engineering *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2012**, *834*, 197-216.
- Daines, A. M., Maltman, B. A., Flitsch, S. L., Synthesis and modifications of carbohydrates, using biotransformations *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8*, 106-113.
- De Groeve, M., Depreitere, V., Desmet, T., Soetaert, W., Enzymatic production of  $\alpha$ -d-galactose 1-phosphate by lactose phosphorylase *Biotechnology Letters* **2009**, *31*, 1873-1877.
- De Matos, P., Adams, N., Hastings, J., Moreno, P., Steinbeck, C., A database for chemical proteomics: ChEBI *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2012**, *803*, 273-296.
- Dimarco, A. A., Bobik, T. A., Wolfe, R. S., Unusual Coenzymes of Methanogenesis *Annual Review of Biochemistry* **1990**, *59*, 355-394.
- Ding, Y., Lu, H., Shi, G., Liu, J., Shen, G., Yu, R., Cell-based immobilization strategy for sensitive piezoelectric immunoassay of total prostate specific antigen *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *24*, 228-232.
- Donnelly, J. G., Folic acid *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **2001**, *38*, 183-223.
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W., High-Efficiency Transformation of Escherichia Coli by High Voltage Electroporation *Nucleic Acids Research* **1988**, *16*, 6127-6145.
- Drauz, K., Waldmann, H., Enzyme catalysis in organic synthesis, Wiley-VCH, **2012**.
- Dutta, S., Whicher, J. R., Hansen, D. A., Hale, W. A., Chemler, J. A., Congdon, G. R., Narayan, A. R. H., Hakansson, K., Sherman, D. H., Smith, J. L., Skiniotis, G., Structure of a modular polyketide synthase *Nature* **2014**, *510*, 512-+.
- Eliot, A. C., Kirsch, J. F., Pyridoxal phosphate enzymes: Mechanistic, structural, and evolutionary considerations *Annual Review of Biochemistry* **2004**, *73*, 383-415.
- Elling, L., Kinetic characterization of UDP-glucose pyrophosphorylase from germinated barley (malt) *Phytochemistry* **1996**, *42*, 955-960.
- Endo, T., Koizumi, S., Large-scale production of oligosaccharides using engineered bacteria *Current Opinion in Structural Biology* **2000**, *10*, 536-541.
- Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., Kakita, S., Ozaki, A., Large-scale production of N-acetyllactosamine through bacterial coupling *Carbohydrate Research* **1999**, *316*, 179-183.

- Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., Kakita, S., Ozaki, A., Large-scale production of the carbohydrate portion of the sialyl-Tn epitope, alpha-Neup5Ac-(2 -> 6)-D-GalpNAc, through bacterial coupling *Carbohydrate Research* **2001**, 330, 439-443.
- Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., Ozaki, A., Large-scale production of CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial coupling *Applied Microbiology and Biotechnology* **2000**, 53, 257-261.
- Escoffre, J. M., Dean, D. S., Hubert, M., Rols, M. P., Favard, C., Membrane perturbation by an external electric field: a mechanism to permit molecular uptake *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **2007**, 36, 973-983.
- Feist, A. M., Henry, C. S., Reed, J. L., Krummenacker, M., Joyce, A. R., Karp, P. D., Broadbelt, L. J., Hatzimanikatis, V., Palsson, B. O., A genome-scale metabolic reconstruction for Escherichia coli K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information *Molecular Systems Biology* **2007**, 3, 18.
- Felix, H., Permeabilized cells *Analytical Biochemistry* **1982**, 120, 211-234.
- Ferrer, P., Hedegaard, L., Halkier, T., Diers, I., Savva, D., Asenjo, J. A., Molecular cloning of a lytic beta-1,3-glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica* LLG109 - A beta-1,3-glucanase able to selectively permeabilize the yeast cell wall in *Recombinant DNA Biotechnology Iii: The Integration of Biological and Engineering Sciences, Vol. 782* (Eds.: J. A. Asenjo, B. A. Andrews), New York Acad Sciences, New York, **1996**, pp. 555-565.
- Findrik, Z., Vasic-Racki, D., Overview on Reactions with Multi-enzyme Systems *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **2009**, 23, 545-553.
- Fiskum, G., Craig, S. W., Decker, G. L., Lehninger, A. L., The Cytoskeleton of Digitonin-Treated Rat Hepatocytes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **1980**, 77, 3430-3434.
- Fletouris, D. J., Papapanagiotou, E. P., A new liquid chromatographic method for routine determination of oxytetracycline marker residue in the edible tissues of farm animals *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, 391, 1189-1198.
- Flores, M. V., Voget, C. E., Ertola, R. J. J., Permeabilization of Yeast-Cells *Kluyveromyces* with Organic-Solvents *Enzyme and Microbial Technology* **1994**, 16, 340-346.
- Foulstone, M., Reading, C., Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of Augmentin, in biological fluids with high-performance liquid chromatography *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, 22, 753-762.
- Fowler, Z. L., Koffas, M. A. G., Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives *Applied Microbiology and Biotechnology* **2009**, 83, 799-808.
- Frank, R. A. W., Leeper, F. J., Luisi, B. F., Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes *Cellular and Molecular Life Sciences* **2007**, 64, 892-905.
- Fromm, M., Callis, J., Taylor, L. P., Walbot, V., Electroporation of DNA and RNA Into Plant-Protoplasts *Methods in Enzymology* **1987**, 153, 351-366.
- Fu, J., Bian, X. Y., Hu, S. B., Wang, H. L., Huang, F., Seibert, P. M., Plaza, A., Xia, L. Q., Muller, R., Stewart, A. F., Zhang, Y. M., Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting *Nature Biotechnology* **2012**, 30, 440ff.
- Fujita, K.-I., Tanigawa, T., Machida, K., Tanaka, T., Taniguchi, M., Synthesis of uridine 5'-monophosphate glucose as an inhibitor of UDP-glucose pyrophosphorylase *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1998**, 86, 145-148.
- Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Horinouchi, S., A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms *Nature* **1999**, 400, 897-899.
- Furusawa, N., Clean and rapid liquid chromatographic technique for monitoring of oxytetracycline and sulphadimicline in milk without use of organic solvents *Chromatographia* **2003**, 57, 317-320.

- Galabova, D., Tuleva, B., Spasova, D., Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by Triton X-100 *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, *18*, 18-22.
- Ganter, M., Bernard, T., Moretti, S., Stelling, J., Pagni, M., MetaNetX.org: a website and repository for accessing, analysing and manipulating metabolic networks *Bioinformatics* **2013**, *29*, 815-816.
- Gao, J., Ellis, L. B. M., Wackett, L. P., The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: improving public access *Nucleic Acids Research* **2010**, *38*, D488-D491.
- Ginsburg, V., Comparative biochemistry of nucleotide-linked sugars *Progress in clinical and biological research* **1978**, *23*, 595-600.
- Gowda, L. R., Bachhawat, N., Bhat, S. G., Permeabilization of Bakers' yeast by cetyltrimethylammonium bromide for intracellular enzyme catalysis *Enzyme and Microbial Technology* **1991**, *13*, 154-157.
- Grossmann, K., Herbster, K., Mack, M., Rapid cloning of metK encoding methionine adenosyltransferase from *Corynebacterium glutamicum* by screening a genomic library on a high density colony-array *Fems Microbiology Letters* **2000**, *193*, 99-103.
- Haggart, C. R., Bartell, J. A., Saucerman, J. J., Papin, J. A., Whole -Genome Metabolic Network Reconstruction and Constraint-Based Modeling in *Methods in Enzymology, Vol 500: Methods in Systems Biology, Vol. 500* (Eds.: D. Jameson, M. Verma, H. V. Westerhoff), Elsevier Academic Press Inc, San Diego, **2011**, pp. 411-433.
- Heinzle, E., Biwer, A. P., Cooney, C. L., Development of sustainable bioprocesses, Wiley-VCH, **2006**.
- Heinzle, E., Matsuda, F., Miyagawa, H., Wakasa, K., Nishioka, T., Estimation of metabolic fluxes, expression levels and metabolite dynamics of a secondary metabolic pathway in potato using label pulse-feeding experiments combined with kinetic network modelling and simulation *Plant Journal* **2007**, *50*, 176-187.
- Hill, C. P., Yee, J., Selsted, M. E., Eisenberg, D., Crystal Structure of Defensin HNP-3 Amphiphilic Dimer - Mechanisms of Membrane Permeabilization *Science* **1991**, *251*, 1481-1485.
- Hinman, L. M., Blass, J. P., An NADH-Linked Spectrophotometric Assay for Pyruvate-Dehydrogenase Complex in Crude Tissue-Homogenates *Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*, 6583-6586.
- Hoffmann, T., Krug, D., Huettel, S., Mueller, R., Improving Natural Products Identification through Targeted LC-MS/MS in an Untargeted Secondary Metabolomics Workflow *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 10780-10788.
- Horinouchi, N., Ogawa, J., Kawano, T., Sakai, T., Saito, K., Matsumoto, S., Sasaki, M., Mikami, Y., Shimizu, S., Efficient production of 2-deoxyribose 5-phosphate from glucose and acetaldehyde by coupling of the alcoholic fermentation system of baker's yeast and deoxyriboaldolase-expressing *Escherichia coli* *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2006**, *70*, 1371-1378.
- Horinouchi, N., Sakai, T., Kawano, T., Matsumoto, S., Sasaki, M., Hibi, M., Shima, J., Shimizu, S., Ogawa, J., Construction of microbial platform for an energy-requiring bioprocess: practical 2'-deoxyribonucleoside production involving a C-C coupling reaction with high energy substrates *Microbial Cell Factories* **2012**, *11*.
- Hossain, S. A., Tanizawa, K., Kazuta, Y., Fukui, T., Overproduction and Characterization of Recombinant UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Escherichia coli* K-12 *J Biochem* **1994**, *115*, 965-972.
- Ishibashi, T., Tomita, H., Yokooji, Y., Morikita, T., Watanabe, B., Hiratake, J., Kishimoto, A., Kita, A., Miki, K., Imanaka, T., Atomi, H., A detailed biochemical characterization of phosphopantothenate synthetase, a novel enzyme involved in coenzyme A biosynthesis in the Archaea *Extremophiles* **2012**, *16*, 819-828.
- Itoh, H., Kawazoe, Y., Shiba, T., Enhancement of protein synthesis by an inorganic polyphosphate in an E-coli cell-free system *Journal of Microbiological Methods* **2006**, *64*, 241-249.
- Jackson, R. W., Demoss, J. A., EFFECTS OF TOLUENE ON *ESCHERICHIA COLI* *Journal of Bacteriology* **1965**, *90*, 1420-&.

- Jacques, J. G. J., Burlat, B., Arnoux, P., Sabaty, M., Guigliarelli, B., Leger, C., Pignol, D., Fourmond, V., Kinetics of substrate inhibition of periplasmic nitrate reductase *Biochimica et biophysica acta* **2014**, 1837, 1801-1809.
- Jamur, M. C., Oliver, C., Permeabilization of cell membranes *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2010**, 588, 63-66.
- Jensen, K. F., Mygind, B., Different oligomeric states are involved in the allosteric behavior of uracil phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli* *European Journal of Biochemistry* **1996**, 240, 637-645.
- Jitrapakdee, S., Wallace, J. C., The biotin enzyme family: Conserved structural motifs and domain rearrangements *Current Protein & Peptide Science* **2003**, 4, 217-229.
- Johannes, T. W., Woodyer, R. D., Zhao, H., Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, 96, 18-26.
- Johannes, T. W., Woodyer, R. D., Zhao, H. M., Directed evolution of a thermostable phosphite dehydrogenase for NAD(P)H regeneration *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, 71, 5728-5734.
- Johansson, F. I., Michalecka, A. M., Moller, I. M., Rasmusson, A. G., Oxidation and reduction of pyridine nucleotides in alamethicin-permeabilized plant mitochondria *Biochemical Journal* **2004**, 380, 193-202.
- Joosten, V., van Berkel, W. J. H., Flavoenzymes *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, 11, 195-202.
- Kameda, A., Shiba, T., Kawazoe, Y., Satoh, Y., Ihara, Y., Munekata, M., Ishige, K., Noguchi, T., A novel ATP regeneration system using polyphosphate-AMP phosphotransferase and polyphosphate kinase *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2001**, 91, 557-563.
- Kaur, G., Panesar, P. S., Bera, M. B., Kumar, H., Hydrolysis of whey lactose using CTAB-permeabilized yeast cells *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2009**, 32, 63-67.
- Kearsey, S. E., Brimage, L., Namdar, M., Ralph, E., Yang, X., In situ assay for analyzing the chromatin binding of proteins in fission yeast *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2005**, 296, 181-188.
- Keseler, I. M., Collado-Vides, J., Santos-Zavaleta, A., Peralta-Gil, M., Gama-Castro, S., Muniz-Rascado, L., Bonavides-Martinez, C., Paley, S., Krummenacker, M., Altman, T., Kaipa, P., Spaulding, A., Pacheco, J., Latendresse, M., Fulcher, C., Sarker, M., Shearer, A. G., Mackie, A., Paulsen, I., Gunsalus, R. P., Karp, P. D., EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology *Nucleic Acids Research* **2011**, 39.
- Kiefer, P., Delmotte, N., Vorholt, J. A., Nanoscale Ion-Pair Reversed-Phase HPLC-MS for Sensitive Metabolome Analysis *Analytical Chemistry* **2011**, 83, 850-855.
- Kim, E. S., Bibb, M. J., Butler, M. J., Hopwood, D. A., Sherman, D. H., Sequences of the Oxytetracycline Polyketide Synthase-Encoding OTC Genes from *Streptomyces rimosus* *Gene* **1994**, 141, 141-142.
- Kirsch, S. H., Knapp, J.-P., Geisel, J., Herrmann, W., Obeid, R., Simultaneous quantification of S-adenosyl methionine and S-adenosyl homocysteine in human plasma by stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2009**, 877, 3865-3870.
- Koizumi, S., Endo, T., Tabata, K., Nagano, H., Ohnishi, J., Ozaki, A., Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2000**, 25, 213-217.
- Koizumi, S., Endo, T., Tabata, K., Ozaki, A., Large-scale production of UDP-galactose and globotriose by coupling metabolically engineered bacteria *Nat Biotech* **1998**, 16, 847-850.
- Komoto, J., Yamada, T., Takata, Y., Markham, G. D., Takusagawa, F., Crystal structure of the S-adenosylmethionine synthetase ternary complex: A novel catalytic mechanism of S-adenosylmethionine synthesis from ATP and Met *Biochemistry* **2004**, 43, 1821-1831.

- Krauser, S., Hoffmann, T., Heinzle, E., Directed Multistep Biocatalysis for the Synthesis of the Polyketide Oxytetracycline in Permeabilized Cells of *Escherichia coli* *ACS catalysis* **2015**, *5*, 1407–1413.
- Krauser, S., Kiefer, P., Heinzle, E., Multienzyme Whole-Cell In Situ Biocatalysis for the Production of Flaviolin in Permeabilized Cells of *Escherichia coli* *Chemcatcher* **2012**, *4*, 786-788.
- Krauser, S., Weyler, C., Blass, L. K., Heinzle, E., Directed Multistep Biocatalysis Using Tailored Permeabilized Cells *Fundamentals and Application of New Bioproduction Systems* **2013**, *137*, 185-234.
- Kroemer, J. O., Wittmann, C., Schroeder, H., Heinzle, E., Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* *Metabolic Engineering* **2006**, *8*, 353-369.
- Kuhn, D., Kholiq, M. A., Heinzle, E., Buehler, B., Schmid, A., Intensification and economic and ecological assessment of a biocatalytic oxyfunctionalization process *Green Chemistry* **2010**, *12*, 815-827.
- Kuroda, A., Use of an *Escherichia coli* Recombinant Producing Thermostable Polyphosphate Kinase as an ATP Regenerator To Produce Fructose 1,6-Diphosphate *Applied and environmental microbiology* **2007**, *73*.
- Kuroda, A., Kornberg, A., Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 439-442.
- Lee, H.-J., Ho, M.-R., Tseng, C.-S., Hsu, C.-Y., Huang, M.-S., Peng, H.-L., Chang, H.-Y., Exponential ATP amplification through simultaneous regeneration from AMP and pyrophosphate for luminescence detection of bacteria *Analytical Biochemistry* **2011**, *418*, 19-23.
- Lee, W.-H., Kim, M.-D., Jin, Y.-S., Seo, J.-H., Engineering of NADPH regenerators in *Escherichia coli* for enhanced biotransformation *Applied microbiology and biotechnology* **2013**, *97*, 2761-2772.
- Lehrer, R. I., Barton, A., Daher, K. A., Harwig, S. S. L., Ganz, T., Selsted, M. E., Interaction of Human Defensins with *Escherichia coli* - Mechanism of Bactericidal Activity *Journal of Clinical Investigation* **1989**, *84*, 553-561.
- Leonardi, R., Zhang, Y. M., Rock, C. O., Jackowski, S., Coenzyme A: Back in action *Progress in Lipid Research* **2005**, *44*, 125-153.
- Li, C., Donizelli, M., Rodriguez, N., Dharuri, H., Endler, L., Chelliah, V., Li, L., He, E., Henry, A., Stefan, M. I., Snoep, J. L., Hucka, M., Le Novere, N., Laibe, C., BioModels Database: An enhanced, curated and annotated resource for published quantitative kinetic models *Bmc Systems Biology* **2010**, *4*.
- Lichtenstein, A., Mechanism of Mammalian-Cell Lysis Mediated by Peptide Defensins - Evidence for an Initial Alteration of the Plasma-Membrane *Journal of Clinical Investigation* **1991**, *88*, 93-100.
- Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C., Industrial Biotransformations, Wiley-VCH, **2000**.
- Link, H., Kochanowski, K., Sauer, U., Systematic identification of allosteric protein-metabolite interactions that control enzyme activity in vivo *Nature Biotechnology* **2013**, *31*, 357-+.
- Linster, C. L., Van Schaftingen, E., Vitamin C - Biosynthesis, recycling and degradation in mammals *Febs Journal* **2007**, *274*, 1-22.
- Loenen, W. A. M., S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochemical Society Transactions* **2006**, *34*, 330-333.
- Loke, M. L., Jespersen, S., Vreeken, R., Halling-Sorensen, B., Tjornelund, J., Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2003**, *783*, 11-23.
- Lopez-Gallego, F., Schmidt-Dannert, C., Multi-enzymatic synthesis *Curr Opin Chem Biol* **2010**, *14*, 174-183.

- Lykkeberg, A. K., Halling-Sorensen, B., Cornett, C., Tjornelund, J., Hansen, S. H., Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC-MS-MS *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, *34*, 325-332.
- Ma, H. W., Zeng, A. P., The connectivity structure, giant strong component and centrality of metabolic networks *Bioinformatics* **2003**, *19*, 1423-1430.
- Mack, M., Grill, S., Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *71*, 265-275.
- Maia, P. P., Amaya-Farfan, J., Rath, S., Reyes Reyes, F. G., Simultaneous determination of streptomycin and oxytetracycline in agricultural antimicrobials by CZE after an experimental design *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *43*, 450-456.
- Malik, M., Ganguli, A., Ghosh, M., Modeling of permeabilization process in *Pseudomonas putida* G7 for enhanced limonin bioconversion *Applied Microbiology and Biotechnology* **2012**, *95*, 223-231.
- Martin, L. M., Ruiz, C. A., Andres, M., Catalan, J., Permeabilization of *Trigonopsis variabilis* for Enhanced D-Amino Acid Oxidase Activity *Chemical Engineering Communications* **2011**, *198*, 516-529.
- Matos, J. R., Raushel, F. M., Wong, C. H., S-Adenosylmethionine - Studies on Chemical and Enzymatic Synthesis *Biotechnology and Applied Biochemistry* **1987**, *9*, 39-52.
- McCord, J. M., Day, E. D., Superoxide Dependent Production of Hydroxyl Radical Catalyzed by Iron-EDTA Complex *Febs Letters* **1978**, *86*, 139-142.
- McMurry, L. M., Oethinger, M., Levy, S. B., Triclosan targets lipid synthesis *Nature* **1998**, *394*, 531-532.
- Medema, M. H., Alam, M. T., Breitling, R., Takano, E., The future of industrial antibiotic production: from random mutagenesis to synthetic biology *Bioengineered bugs* **2011**, *2*, 230-233.
- Medema, M. H., Breitling, R., Bovenberg, R., Takano, E., Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms *Nature Reviews Microbiology* **2011**, *9*, 131-137.
- Medema, M. H., Breitling, R., Takano, E., Synthetic Biology in *Streptomyces* Bacteria in *Methods in Enzymology, Vol 497: Synthetic Biology, Methods for Part/Device Characterization and Chassis Engineering, Pt A, Vol. 497* (Ed.: C. Voigt), **2011**, pp. 485-502.
- Meister, A., Anderson, M. E., GLUTATHIONE *Annual Review of Biochemistry* **1983**, *52*, 711-760.
- Mendel, R. R., Hansch, R., Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants *Journal of Experimental Botany* **2002**, *53*, 1689-1698.
- Meng, L., Li, M., Yang, S. H., Kim, T.-J., Suh, J.-W., Intracellular ATP Levels Affect Secondary Metabolite Production in *Streptomyces* spp *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2011**, *75*, 1576-1581.
- Michal, G., Schomburg, D., *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd Edition ed., Wiley, **2012**.
- Michalek, M., Gelhaus, C., Hecht, O., Podschun, R., Schroder, J. M., Leippe, M., Grotzinger, J., The human antimicrobial protein psoriasin acts by permeabilization of bacterial membranes *Developmental and Comparative Immunology* **2009**, *33*, 740-746.
- Minton, A. P., How can biochemical reactions within cells differ from those in test tubes? *Journal of Cell Science* **2006**, *119*, 2863-2869.
- Miozzari, G. F., Niederberger, P., Hütter, R., Permeabilization of microorganisms by Triton X-100 *Analytical Biochemistry* **1978**, *90*, 220-233.

- Moe, O. A., Haeusler, P. A., Dieter, L., Rittle, K. J., Shepler, L. S., Paszkowski, A. L., Catalytic Properties of Escherichia coli Polyphosphate Kinase - An Enzyme for ATP Regeneration *Biotechnology and Applied Biochemistry* **1992**, *15*, 125-133.
- Monti, D., Ferrandi, E. E., Zanellato, I., Hua, L., Polentini, F., Carrea, G., Riva, S., One-Pot Multienzymatic Synthesis of 12-Ketoursodeoxycholic Acid: Subtle Cofactor Specificities Rule the Reaction Equilibria of Five Biocatalysts Working in a Row *Advanced Synthesis & Catalysis* **2009**, *351*, 1303-1311.
- Moore, J. C., Bornscheuer, U. T., Editorial overview: Biocatalysis and biotransformation: Riding the third wave of biocatalysis *Current Opinion in Chemical Biology* **2014**, *19*, V-VI.
- Moses, T., Pollier, J., Thevelein, J. M., Goossens, A., Bioengineering of plant (tri)terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology in vivo and in vitro *New Phytologist* **2013**, *200*, 27-43.
- Motomura, K., Hirota, R., Okada, M., Ikeda, T., Ishida, T., Kuroda, A., A New Subfamily of Polyphosphate Kinase 2 (Class III PPK2) Catalyzes both Nucleoside Monophosphate Phosphorylation and Nucleoside Diphosphate Phosphorylation *Applied and Environmental Microbiology* **2014**, *80*, 2602-2608.
- Myung, S., You, C., Zhang, Y. H. P., Recyclable cellulose-containing magnetic nanoparticles: immobilization of cellulose-binding module-tagged proteins and a synthetic metabolon featuring substrate channeling *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1*, 4419-4427.
- Nacke, C., Schrader, J., Liposome based solubilisation of carotenoid substrates for enzymatic conversion in aqueous media *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2011**, *71*, 133-138.
- Nacke, C., Schrader, J., Micelle based delivery of carotenoid substrates for enzymatic conversion in aqueous media *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2012**, *77*, 67-73.
- Nahalka, J., Gemeiner, P., Bucko, M., Wang, P. G., Bioenergy beads: A tool for regeneration of ATP/NTP in biocatalytic synthesis *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology* **2006**, *34*, 515-521.
- Nahálka, J., Liu, Z., Gemeiner, P., Wang, P. G., Nucleoside triphosphates production using recombinant Escherichia coli entrapped in calcium pectate gel *Biotechnology Letters* **2002**, *24*, 925-930.
- Negishi, M., Pedersen, L. G., Petrotchenko, E., Shevtsov, S., Gorokhov, A., Kakuta, Y., Pedersen, L. C., Structure and function of sulfotransferases *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2001**, *390*, 149-157.
- Nestl, B. M., Nebel, B. A., Hauer, B., Recent progress in industrial biocatalysis *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, *15*, 187-193.
- Neuner, A., Heinzle, E., Mixed glucose and lactate uptake by Corynebacterium glutamicum through metabolic engineering *Biotechnology Journal* **2011**, *6*, 318-329.
- Ni, Y., Holtmann, D., Hollmann, F., How Green is Biocatalysis? To Calculate is To Know *Chemcatcher* **2014**, *6*, 930-943.
- Ni, Y., Zhang, B., Sun, Z., Efficient Synthesis of (R)-2-Chloro-1-(3-chlorophenyl)ethanol by Permeabilized Whole-Cells of Candida ontarioensis *Chinese Journal of Catalysis* **2012**, *33*, 681-687.
- Niklas, J., Melnyk, A., Yuan, Y. B., Heinzle, E., Selective permeabilization for the high-throughput measurement of compartmented enzyme activities in mammalian cells *Analytical Biochemistry* **2011**, *416*, 218-227.
- Nocek, B., Kochinyan, S., Proudfoot, M., Brown, G., Evcokimova, E., Osipiuk, J., Edwards, A. M., Savchenko, A., Joachimiak, A., Yakunin, A. F., Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 17730-17735.
- Noguchi, T., Shiba, T., Use of Escherichia coli Polyphosphate Kinase for Oligosaccharide Synthesis *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1998**, *62*, 1594-1596.

- Noll, K. M., Rinehart, K. L., Tanner, R. S., Wolfe, R. S., Structure of Component B 7-Mercaptoheptanoylthreonine Phosphate of the Methylcoenzyme M Methylreductase System of Methanobacterium thermoautotrophicum *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, *83*, 4238-4242.
- Ochi, K., New strategies for drug discovery: Activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2013**, 245.
- Ouhabi, R., Boue-Grabot, M., Mazat, J. P., Mitochondrial ATP synthesis in permeabilized cells: Assessment of the ATP/O values in situ *Analytical Biochemistry* **1998**, *263*, 169-175.
- Owen, D. M., Williamson, D. J., Magenau, A., Gaus, K., Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution *Nature communications* **2012**, *3*, 1256.
- Park, J., Tai, J. Z., Roessner, C. A., Scott, A. I., Enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-methionine on the preparative scale *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, *4*, 2179-2185.
- Pickens, L. B., Tang, Y., Decoding and engineering tetracycline biosynthesis *Metabolic Engineering* **2009**, *11*, 69-75.
- Pickens, L. B., Tang, Y., Oxytetracycline Biosynthesis *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 27509-27515.
- Pliquett, U., Joshi, R. P., Sridhara, V., Schoenbach, K. H., High electrical field effects on cell membranes *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 275-282.
- Pollak, N., Dolle, C., Ziegler, M., The power to reduce: pyridine nucleotides - small molecules with a multitude of functions *Biochemical Journal* **2007**, *402*, 205-218.
- Powers, J.-P. S., Hancock, R. E. W., The relationship between peptide structure and antibacterial activity *Peptides* **2003**, *24*, 1681-1691.
- Proudfoot, M., Kuznetsova, E., Brown, G., Rao, N. N., Kitagawa, M., Mori, H., Savchenko, A., Yakunin, A. F., General Enzymatic Screens Identify Three New Nucleotidases in Escherichia coli *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 54687-54694.
- Proudfoot, M., Kuznetsova, E., Brown, G., Rao, N. N., Kitagawa, M., Mori, H., Savchenko, A., Yakunin, A. F., General enzymatic screens identify three new nucleotidases in Escherichia coli - Biochemical characterization of SurE, YfbR, and YjjG *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 54687-54694.
- Pulsawat, N., Kitani, S., Nihira, T., Characterization of biosynthetic gene cluster for the production of virginiamycin M, a streptogramin type A antibiotic, in Streptomyces virginiae *Gene* **2007**, *393*, 31-42.
- Rangarajan, E. S., Nadeau, G., Li, Y., Wagner, J., Hung, M.-N., Schrag, J. D., Cygler, M., Matte, A., The structure of the exopolyphosphatase (PPX) from Escherichia coli O157 : H7 suggests a binding mode for long polyphosphate chains *Journal of Molecular Biology* **2006**, *359*, 1249-1260.
- Reed, J. L., Famili, I., Thiele, I., Palsson, B. O., Towards multidimensional genome annotation *Nature Reviews Genetics* **2006**, *7*.
- Relyea, H. A., Vrtis, J. M., Woodyer, R., Rimkus, S. A., van der Donk, W. A., Inhibition and pH dependence of phosphite dehydrogenase *Biochemistry* **2005**, *44*, 6640-6649.
- Ren, Q., Chen, K., Paulsen, I. T., TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels *Nucleic Acids Research* **2007**, *35*.
- Resnick, S. M., Zehnder, A. J. B., In vitro ATP regeneration from polyphosphate and AMP by polyphosphate: AMP phosphotransferase and adenylate kinase from Acinetobacter johnsonii 210A *Applied and Environmental Microbiology* **2000**, *66*, 2045-2051.
- Richter, F., Leaver-Fay, A., Khare, S. D., Bjelic, S., Baker, D., De Novo Enzyme Design Using Rosetta3 *Plos One* **2011**, *6*.

- Rundback, F., Fidanoska, M., Adlercreutz, P., Coupling of permeabilized cells of *Gluconobacter oxydans* and *Ralstonia eutropha* for asymmetric ketone reduction using H<sub>2</sub> as reductant *Journal of Biotechnology* **2012**, *157*, 154-158.
- Rutter, G. A., Denton, R. M., Effects of Insulin and Guanosine 5'-Gamma-Thio-Triphosphate on Fatty-Acid Synthesis and Lipolysis Within Electroporated Fat-Cells *Biochemical Journal* **1992**, *281*, 431-435.
- Ryan, W., Parulekar, S. J., Immobilization of *Escherichia coli* JM103 PUC8 in Kappa-Carrageenan Coupled with Recombinant Protein Release by Insitu Cell-Membrane Permeabilization *Biotechnology Progress* **1991**, *7*, 99-110.
- Saier, M. H., Jr., Yen, M. R., Noto, K., Tamang, D. G., Elkan, C., The Transporter Classification Database: recent advances *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*.
- Salisbury, S. A., Forrest, H. S., Cruse, W. B. T., Kennard, O., Novel Coenzyme from Bacterial Primary Alcohol Dehydrogenases *Nature* **1979**, *280*, 843-844.
- Santacoloma, P. A., Sin, G., Gernaey, K. V., Woodley, J. M., Multienzyme-Catalyzed Processes: Next-Generation Biocatalysis *Organic Process Research & Development* **2011**, *15*, 203-212.
- Scheer, M., Grote, A., Chang, A., Schomburg, I., Munaretto, C., Rother, M., Soehngen, C., Stelzer, M., Thiele, J., Schomburg, D., BRENDA, the enzyme information system in 2011 *Nucleic Acids Research* **2011**, *39*.
- Schellenberger, J., Park, J. O., Conrad, T. M., Palsson, B. O., BiGG: a Biochemical Genetic and Genomic knowledgebase of large scale metabolic reconstructions *Bmc Bioinformatics* **2010**, *11*.
- Schlichting, I., Cryle, M. J., Macromolecular complexes involving cytochrome P450 enzymes *Febs Journal* **2009**, *276*, 21-22.
- Schneider, K., Dorscheid, S., Witte, K., Giffhorn, F., Heinzle, E., Controlled feeding of hydrogen peroxide as oxygen source improves production of 5-ketofructose From L-sorbose using engineered pyranose 2-oxidase from *Peniophora gigantea* *Biotechnology and Bioengineering* **2012**, *109*, 2941-2945.
- Schultheisz, H. L., Szymczyna, B. R., Scott, L. G., Williamson, J. R., Pathway engineered enzymatic de novo purine nucleotide synthesis *Acs Chemical Biology* **2008**, *3*, 499-511.
- Schultz, A. W., Oh, D. C., Carney, J. R., Williamson, R. T., Udvary, D. W., Jensen, P. R., Gould, S. J., Fenical, W., Moore, B. S., Biosynthesis and structures of cyclomarins and cyclomarazines, prenylated cyclic peptides of marine actinobacterial origin *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 4507-4516.
- Sestak, S., Farkas, V., In situ assays of fungal enzymes in cells permeabilized by osmotic shock *Analytical Biochemistry* **2001**, *292*, 34-39.
- Shen, B., Du, L. C., Sanchez, C., Edwards, D. J., Chen, M., Murrell, J. M., Cloning and characterization of the bleomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 *Journal of Natural Products* **2002**, *65*, 422-431.
- Shiba, T., Tsutsumi, K., Ishige, K., Noguchi, T., Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: Their novel biological functions and applications *Biochemistry-Moscow* **2000**, *65*, 315-323.
- Shimizu, S., Komaki, R., Tani, Y., Yamada, H., A High-Yield Method for the Preparative Synthesis of Coenzyme A by Combination of Chemical and Enzymatic Reactions *Febs Letters* **1983**, *151*, 303-306.
- Shiomi, N., Fukuda, H., Morikawa, H., Fukuda, Y., Kimura, A., Cloning of a Gene for S-Adenosylmethionine Synthesis in *Saccharomyces-Cerevisiae* *Applied Microbiology and Biotechnology* **1988**, *29*, 302-304.
- Siegel, J. B., Zanghellini, A., Lovick, H. M., Kiss, G., Lambert, A. R., Clair, J. L. S., Gallaher, J. L., Hilvert, D., Gelb, M. H., Stoddard, B. L., Houk, K. N., Michael, F. E., Baker, D., Computational Design of an Enzyme Catalyst for a Stereoselective Bimolecular Diels-Alder Reaction *Science* **2010**, *329*, 309-313.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S., The bacterial cell envelope *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2010**, *2*, a000414.

- Smola, N., Urleb, U., Qualitative and quantitative analysis of oxytetracycline by near-infrared spectroscopy *Analytica Chimica Acta* **2000**, *410*, 203-210.
- Smyrniotakis, C. G., Archontaki, H. A., C-18 columns for the simultaneous determination of oxytetracycline and its related substances by reversed-phase high performance liquid chromatography and UV detection *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *43*, 506-514.
- Soballe, B., Poole, R. K., Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management *Microbiology-Uk* **1999**, *145*, 1817-1830.
- Soh, K. C., Miskovic, L., Hatzimanikatis, V., From network models to network responses: integration of thermodynamic and kinetic properties of yeast genome-scale metabolic networks *Fems Yeast Research* **2012**, *12*.
- Sperry, W. M., Webb, M., A Revision of the Schoenheimer-Sperry Method for Cholesterol Determination *Journal of Biological Chemistry* **1950**, *187*, 97-106.
- Stevens, D. C., Conway, K. R., Pearce, N., Villegas-Penaranda, L. R., Garza, A. G., Boddy, C. N., Alternative Sigma Factor Over-Expression Enables Heterologous Expression of a Type II Polyketide Biosynthetic Pathway in *Escherichia coli* *Plos One* **2013**, *8*.
- Stevens, D. C., Henry, M. R., Murphy, K. A., Boddy, C. N., Heterologous Expression of the Oxytetracycline Biosynthetic Pathway in *Myxococcus xanthus* *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, *76*, 2681-2683.
- Struck, A.-W., Thompson, M. L., Wong, L. S., Micklefield, J., S-Adenosyl-Methionine-Dependent Methyltransferases: Highly Versatile Enzymes in Biocatalysis, Biosynthesis and Other Biotechnological Applications *Chembiochem* **2012**, *13*, 2642-2655.
- Tandon, S., Horowitz, P. M., Detergent-Assisted Refolding of Guanidinium Chloride-Denatured Rhodanese - The Effects of the Concentration and Type of Detergent *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 4486-4491.
- Tang, G. L., Cheng, Y. Q., Shen, B., Leinamycin biosynthesis revealing unprecedented architectural complexity for a hybrid polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 33-45.
- Taylor, C. D., Wolfe, R. S., Structure and Methylation of Coenzyme M (HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) *Journal of Biological Chemistry* **1974**, *249*, 4879-4885.
- Thedei, G., Leitao, D. P. S., Bolean, M., Paulino, T. P., Spadaro, A. C. C., Ciancaglini, P., Toluene permeabilization differentially affects F- and P-type ATPase activities present in the plasma membrane of *Streptococcus mutans* *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2008**, *41*, 1047-1053.
- Thiele, I., Palsson, B. O., A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction *Nature Protocols* **2010**, *5*.
- Thony, B., Auerbach, G., Blau, N., Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions *Biochemical Journal* **2000**, *347*, 1-16.
- Tokuda, H., Matsuyama, S., Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E-coli* *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **2004**, *1693*, 5-13.
- Tomita, H., Imanaka, T., Atomi, H., Identification and characterization of an archaeal ketopantoate reductase and its involvement in regulation of coenzyme A biosynthesis *Molecular Microbiology* **2013**, *90*, 307-321.
- Tomita, H., Yokooji, Y., Ishibashi, T., Imanaka, T., Atomi, H., Biochemical Characterization of Pantoate Kinase, a Novel Enzyme Necessary for Coenzyme A Biosynthesis in the Archaea *Journal of Bacteriology* **2012**, *194*, 5434-5443.
- Treitz, G., Maria, G., Giffhorn, F., Heinzle, E., Kinetic model discrimination via step-by-step experimental and computational procedure in the enzymatic oxidation of D-glucose *Journal of Biotechnology* **2001**, *85*, 271-287.

- Trodler, P., Pleiss, J., Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents *Bmc Structural Biology* **2008**, *8*.
- Tryfona, T., Bustard, M. T., Enhancement of biomolecule transport by electroporation: A review of theory and practical application to transformation of *Corynebacterium glutamicum* *Biotechnology and Bioengineering* **2006**, *93*, 413-423.
- Tryfona, T., Bustard, M. T., Impact of pulsed electric fields on *Corynebacterium glutamicum* cell membrane permeabilization *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2008**, *105*, 375-382.
- Tzeng, C. M., Kornberg, A., The multiple activities of polyphosphate kinase of *Escherichia coli* and their subunit structure determined by radiation target analysis *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 3977-3983.
- Upadhy, R., Nagajyothi, Bhat, S. G., Stabilization of D-amino acid oxidase and catalase in permeabilized *Rhodotorula gracilis* cells and its application for the preparation of alpha-ketoacids *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, *68*, 430-436.
- Uppada, V., Bhaduri, S., Noronha, S. B., Cofactor regeneration - an important aspect of biocatalysis *Current Science* **2014**, *106*, 946-957.
- Vaara, M., Agents That Increase the Permeability of the Outer-Membrane *Microbiological Reviews* **1992**, *56*, 395-411.
- van Kan, E. J. M., Demel, R. A., Breukink, E., van der Bent, A., de Kruijff, B., Clavanin Permeabilizes Target Membranes via Two Distinctly Different pH-Dependent Mechanisms† *Biochemistry* **2002**, *41*, 7529-7539.
- Vorholt, J. A., Thauer, R. K., The active species of 'CO<sub>2</sub>' utilized by formylmethanofuran dehydrogenase from methanogenic Archaea *European Journal of Biochemistry* **1997**, *248*, 919-924.
- Walsh, C. T., Brien, R. V. O., Khosla, C., Nonproteinogenic Amino Acid Building Blocks for Nonribosomal Peptide and Hybrid Polyketide Scaffolds *Angewandte Chemie-International Edition* **2013**, *52*, 7098-7124.
- Weaver, L. J., Sousa, M. M. L., Wang, G., Baidoo, E., Petzold, C. J., Keasling, J. D., A Kinetic-Based Approach to Understanding Heterologous Mevalonate Pathway Function in *E. Coli* *Biotechnology and Bioengineering* **2015**, *112*, 111-119.
- Weber, K., Kuter, D. J., Reversible Denaturation of Enzymes by Sodium Dodecyl Sulfate *Journal of Biological Chemistry* **1971**, *246*, 4504-&.
- Weinig, S., Mahmud, T., Muller, R., Markerless mutations in the myxothiazol biosynthetic gene cluster: A delicate megasynthetase with a superfluous nonribosomal peptide synthetase domain *Chemistry & Biology* **2003**, *10*, 953-960.
- Weissman, K. J., Mueller, R., Protein-protein interactions in multienzyme megasynthetases *Chembiochem* **2008**, *9*, 826-848.
- Wessjohann, L., Vogt, T., Julia, K., Robert, K., Prenyl- und Methyltransferasen in Natur- und Synthese. *Biospektrum* **2012**, *18*, 22-25.
- White, S. H., Wimley, W. C., Selsted, M. E., Structure, function, and membrane integration of defensins *Current Opinion in Structural Biology* **1995**, *5*, 521-527.
- Wijayanti, N., Katz, N., Immenschuh, S., Biology of heme in health and disease *Current Medicinal Chemistry* **2004**, *11*, 981-986.
- Willibald, B., Boves, H., Holler, E., Preparative Synthesis of Beta-L-Malyl-Coenzyme A Assisted by Malyl-Coenzyme-A Synthetase from *Pseudomonas AM1* *Analytical Biochemistry* **1995**, *227*, 363-367.
- Wilson, D. J., Shi, C., Teitelbaum, A. M., Gulick, A. M., Aldrich, C. C., Characterization of AusA: A Dimodular Nonribosomal Peptide Synthetase Responsible for the Production of Aureusimine Pyrazinones *Biochemistry* **2013**, *52*, 926-937.
- Wittig, U., Kania, R., Golebiewski, M., Rey, M., Shi, L., Jong, L., Algae, E., Weidemann, A., Sauer-Danzwith, H., Mir, S., Krebs, O., Bittkowski, M., Wetsch, E., Rojas, I., Mueller, W., SABIO-RK-database for biochemical reaction kinetics *Nucleic Acids Research* **2012**, *40*, D790-D796.

- Wohlgemuth, R., Interfacing biocatalysis and organic synthesis *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2007**, *82*, 1055-1062.
- Wohlgemuth, R., Biocatalysis - key to sustainable industrial chemistry *Current Opinion in Biotechnology* **2010**, *21*, 713-724.
- Wohlgemuth, R., Molecular and Engineering Perspectives of the Biocatalysis Interface to Chemical Synthesis *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **2011**, *25*, 125-134.
- Womack, M. D., Kendall, D. A., Macdonald, R. C., Dtergent Effects on Enzyme Activity and Solubilization of Lipid Bilayer-Membranes *Biochimica Et Biophysica Acta* **1983**, *733*, 210-215.
- Wong, F. T., Khosla, C., Combinatorial biosynthesis of polyketides - a perspective *Current Opinion in Chemical Biology* **2012**, *16*, 117-123.
- Woodyer, R., Johannes, T., van der Donk, W., Zhao, H. M., Protein engineering of phosphite dehydrogenase for NAD(P)H regeneration *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2005**, *229*, U229-U229.
- Woodyer, R., van der Donk, W. A., Zhao, H. M., Relaxing the nicotinamide cofactor specificity of phosphite dehydrogenase by rational design *Biochemistry* **2003**, *42*, 11604-11614.
- Woodyer, R., van der Donk, W. A., Zhao, H. M., Optimizing a biocatalyst for improved NAD(P)H regeneration: Directed evolution of phosphite dehydrogenase *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2006**, *9*, 237-245.
- Woodyer, R., Wheatley, J. L., Relyea, H. A., Rimkus, S., van der Donk, W. A., Site-directed mutagenesis of active site residues of phosphite dehydrogenase *Biochemistry* **2005**, *44*, 4765-4774.
- Woodyer, R., Zhao, H. M., van der Donk, W. A., Mechanistic investigation of a highly active phosphite dehydrogenase mutant and its application for NADPH regeneration *Febs Journal* **2005**, *272*, 3816-3827.
- Woodyer, R. D., Wymer, N. J., Racine, F. M., Khan, S. N., Saha, B. C., Efficient production of L-ribose with a recombinant *Escherichia coli* biocatalyst *Applied and Environmental Microbiology* **2008**, *74*, 2967-2975.
- Wu, L., Mashego, M. R., van Dam, J. C., Proell, A. M., Vinke, J. L., Ras, C., van Winden, W. A., van Gulik, W. M., Heijnen, J. J., Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly C-13-labeled cell extracts as internal standards *Analytical Biochemistry* **2005**, *336*, 164-171.
- Wu, M.-C., Law, B., Wilkinson, B., Micklefield, J., Bioengineering natural product biosynthetic pathways for therapeutic applications *Current Opinion in Biotechnology* **2012**, *23*, 931-940.
- Yang, J., Guo, L., Biosynthesis of beta-carotene in engineered *E. coli* using the MEP and MVA pathways *Microbial Cell Factories* **2014**, *13*.
- Ye, X., Honda, K., Sakai, T., Okano, K., Omasa, T., Hirota, R., Kuroda, A., Ohtake, H., Synthetic metabolic engineering-a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway *Microbial Cell Factories* **2012**, *11*.
- You, C., Myung, S., Zhang, Y. H. P., Facilitated Substrate Channeling in a Self-Assembled Trifunctional Enzyme Complex *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, *51*, 8787-8790.
- You, C., Zhang, Y. H. P., Cell-Free Biosystems for Biomanufacturing *Future Trends in Biotechnology* **2013**, *131*, 89-119.
- You, C., Zhang, Y. H. P., Self-Assembly of Synthetic Metabolons through Synthetic Protein Scaffolds: One-Step Purification, Co-immobilization, and Substrate Channeling *ACS Synthetic Biology* **2013**, *2*, 102-110.
- You, C., Zhang, Y. H. P., Synthetic metabolons (enzyme complexes) facilitated substrate channeling *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2013**, *245*.
- You, C., Zhang, Y. H. P., Annexation of a High-Activity Enzyme in a Synthetic Three-Enzyme Complex Greatly Decreases the Degree of Substrate Channeling *Acs Synthetic Biology* **2014**, *3*, 380-386.

- Yuan, Y., Heinzle, E., Permeabilization of *Corynebacterium glutamicum* for NAD(P)H-dependent intracellular enzyme activity measurement *Comptes Rendus Chimie* **2009**, *12*, 1154-1162.
- Yuryev, R., Liese, A., Biocatalysis: The Outcast *Chemcatchem* **2010**, *2*, 103-107.
- Zaragoza, A., Aranda, F. J., Espuny, M. J., Teruel, J. A., Marques, A., Manresa, A., Ortiz, A., Mechanism of Membrane Permeabilization by a Bacterial Trehalose Lipid Biosurfactant Produced by *Rhodococcus* sp *Langmuir* **2009**, *25*, 7892-7898.
- Zha, W. J., Rubin-Pitel, S. B., Shao, Z. Y., Zhao, H. M., Improving cellular malonyl-CoA level in *Escherichia coli* via metabolic engineering *Metabolic Engineering* **2009**, *11*, 192-198.
- Zhan, J., Biosynthesis of bacterial aromatic polyketides *Curr Top Med Chem* **2009**, *9*, 1958-1610.
- Zhang, H., Witholt, B., Li, Z., Efficient NADPH recycling in enantioselective bioreduction of a ketone with permeabilized cells of a microorganism containing a ketoreductase and a glucose 6-phosphate dehydrogenase *Advanced Synthesis & Catalysis* **2006**, *348*, 429-433.
- Zhang, J., Witholt, B., Li, Z., Coupling of permeabilized microorganisms for efficient enantioselective reduction of ketone with cofactor recycling *Chemical Communications* **2006**, 398-400.
- Zhang, L. L., Monitoring of tetracycline and oxytetracycline antibiotics in milk by HPLC *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2003**, *226*, U66-U66.
- Zhang, W., O'Connor, K., Wang, D. I. C., Li, Z., Bioreduction with Efficient Recycling of NADPH by Coupled Permeabilized Microorganisms *Applied and Environmental Microbiology* **2009**, *75*, 687-694.
- Zhang, Y. H. P., Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications *Biotechnology Advances* **2011**, *29*, 715-725.
- Zhao, H. M., Woodyer, R., Johannes, T., Protein engineering of phosphite dehydrogenase for the development of a novel NAD(P)H regeneration system *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2004**, *227*, U130-U130.
- Zhu, Y., Huang, W. J., Lee, S. S. K., Xu, W. Q., Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis *Embo Reports* **2005**, *6*, 681-687.
- Zomorodi, A. R., Suthers, P. F., Ranganathan, S., Maranas, C. D., Mathematical optimization applications in metabolic networks *Metabolic Engineering* **2012**, *14*.

## 7. Anhang

### 7.1 Hochauflösende Massenanalyse zur Identifizierung von Dihydro-Oxytetracyclin

Da Dihydro-Oxytetracyclin in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, ist eine weitere Charakterisierung zur Identifizierung nötig. Da eine vollständige Charakterisierung und Strukturaufklärung (NMR, IR) größere Mengen des isolierten Produkts benötigen (> 4 mg) und diese auf dieser Stufe des experimentellen Setups (0.9 µg/L OTC, H<sub>2</sub>OTC und H<sub>4</sub>OTC kombiniert) großskaliger Ansätze bedarf, wurde Dihydro-Oxytetracyclin mit hochauflösender FT-ICR Massenanalyse charakterisiert.

Zur hochauflösenden MALDI-FTICR-MS Analyse wurde eine externe, lineare Massenkalisierung mit einem kommerziellen Oxytetracyclin-Standard (Sigma-Aldrich, >99%) durchgeführt. Entsprechend der theoretischen Massen, aufgelistet in Tabelle 12, wurden 3 monoisotopische Peaks des Standards zur Kalibrierung des FTICR-Signals verwendet, was zu hochauflösenden m/z Daten führt.

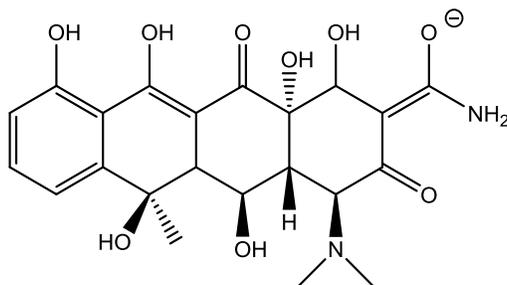
**Tabelle 12:** Ionen und theoretische Massen zur Kalibrierung der FT-ICR Massendaten im Negativmodus.

Ion	m/z	z
[M-H <sub>2</sub> O]	441.129793	-1
[M-NH <sub>3</sub> ]	442.113809	-1
Oxytetracycline	459.140358	-1

Die Proben aus der Oxytetracyclin-Synthese wurden entsprechend mit MALDI-FTICR-MS vermessen und die H<sub>2</sub>OTC zugeordneten Massenpeaks hochauflösend analysiert. In Tabelle 13 sind die gemessenen Massen aufgelistet, welche in Tabelle 14 mit der theoretischen Masse für das einfach negativ geladene, monoisotopische Dihydro-Oxytetracyclin (Schema 12) verglichen werden. Massenabweichungen < 4 ppm können als Bestätigung der Summenformel C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub><sup>-</sup> genutzt werden. Eine hohe Massenabweichung in der Probe bei 21 h kann durch die geringere Intensität des Signals erklärt werden.

**Tabelle 13:** MALDI-FTICR-MS hochaufgelöste Daten für Massen bei  $m/z = 461,15$  gemessen in Proben der OTC-Synthese.

Probe	$m/z$	Intensität	Resonanzfrequenz [Hz]
5min	461.15698	2516925	73607
1h	461.15742	6851083	73575
15h	461.15717	1763063	78344
21h	461.16793	470832	64779
38h	461.15695	4240308	73296



**Schema 12:** Strukturvorschlag für ein einfach negativ geladenes Dihydro-Oxytetracyclin-Ion.  
Summenformel:  $C_{22}H_{25}N_2O_9^-$ , monoisotopische Masse: 461.15655.

**Tabelle 14:** Massendifferenz in ppm von Massen bei  $m/z = 461,1$  im Vergleich zur theoretischen monoisotopischen Masse von  $H_2OTC^-$ .

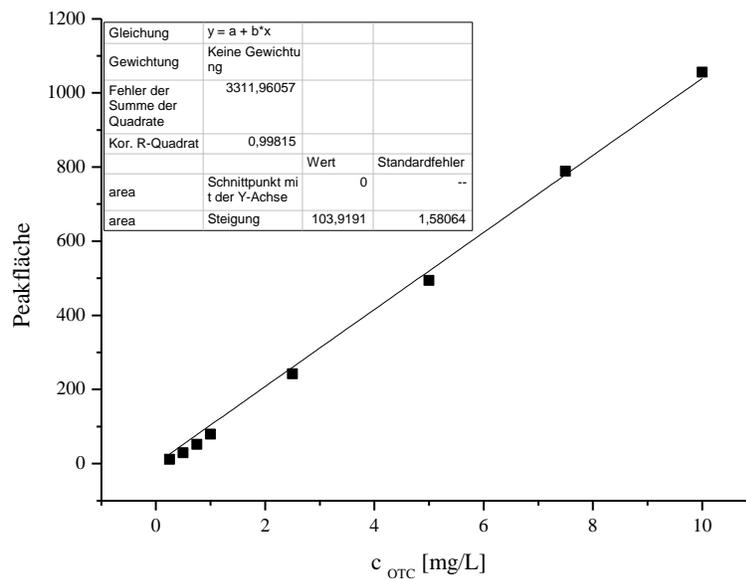
Sample	$m/z$		$\Delta$ ppm
	experimentell	theoretisch	
5min	461.15698	461.15655	0.93
1h	461.15742	461.15655	1.88
15h	461.15717	461.15655	1.34
21h	461.16793	461.15655	24.67
38h	461.15695	461.15655	0.86

Die FTICR-MS Daten zeigen weiter, dass keine signifikanten Mengen an Tetrahydro-Oxytetracyclin in den Proben von 5 min bis 15 h, sowie 38 h vorhanden sind. Die Probe bei 21 h lieferte ein Signal bei  $m/z = 463.1667$ , welches eine Massendifferenz von 11.87 ppm zur theoretischen Masse von  $H_4OTC^-$  ( $m/z = 463.17220$ ) aufweist. Die entsprechende Summenformel  $C_{22}H_{27}N_2O_9^-$  kann daher nicht zweifelsfrei bestätigt werden.

## 7.2 Erstellung der Kalibrierkurve zur Quantifizierung von Oxytetracyclin

**Tabelle 15:** Daten der Kalibrierung zur Analyse von Oxytetracyclin mit UPLC (siehe Kapitel 0).

C <sub>OTC Standard</sub>	t <sub>R</sub> [min]	Peakfläche	Höhe [mAu]	Start [min]	Ende [min]
10 mg/L	7,055	1055,509	20,497	6,451	10,556
7,5 mg/L	7,049	788,437	15,526	6,482	11,060
5 mg/L	7,045	494,141	9,989	6,513	11,014
2,5 mg/L	7,048	241,817	4,649	6,452	11,029
1 mg/L	7,042	79,570	1,550	6,466	11,028
0,75 mg/L	7,036	51,985	1,072	6,513	11,060
0,5 mg/L	7,038	29,350	0,602	6,558	10,983
0,25 mg/L	7,045	11,318	0,219	6,574	10,436

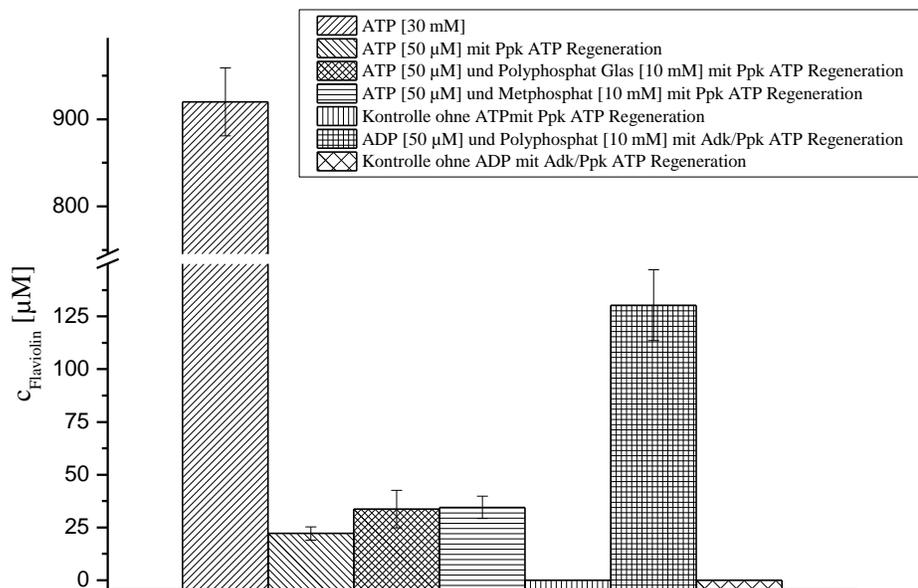


**Abbildung 15:** Lineare Regression über die Peakfläche in Abhängigkeit der Konzentration eines Oxytetracyclin Standards (Sigma Aldrich) zur Erstellung einer Kalibrierfunktion für UPLC-Analyse von Oxytetracyclin.

**Tabelle 16:** Endkonzentration von Oxytetracyclin und Dihydro-Oxytetracyclin und stöchiometrische Mengen der benötigten Substrate.

Verbindung	OTC-Konzentration und stöchiometrische Mengen benötigter Substrate [nM]
OTC/H <sub>2</sub> OTC	1.95
ATP	44.96
NADPH	3.91
SAM (Methionin)	5.86
Acetat	19,55

### 7.3 Unterstützende Informationen zur Versorgung mit ATP und NADPH



**Abbildung 16:** Flaviolinkonzentration in Reaktionen mit unterschiedlichen Methoden zur Versorgung mit ATP (vergleiche Tabelle 6).

Anhand der gemessenen Nitritkonzentrationen nach einer Stunde und einem Tag in Ansätzen, bei welchen NADPH zur Reduktion von Nitrat genutzt wird (Tabelle 18), lässt sich eine Aktivität der untersuchten Biokatalysatoren bestimmen (Tabelle 17). Diese kann noch verbessert werden.

**Tabelle 17:** Aktivität der NADPH Generierung von permeabilisierten und unbehandelten Zellen in Tris-HCl Puffer (0,1 M) mit 4 g/L Natrium Phosphit.

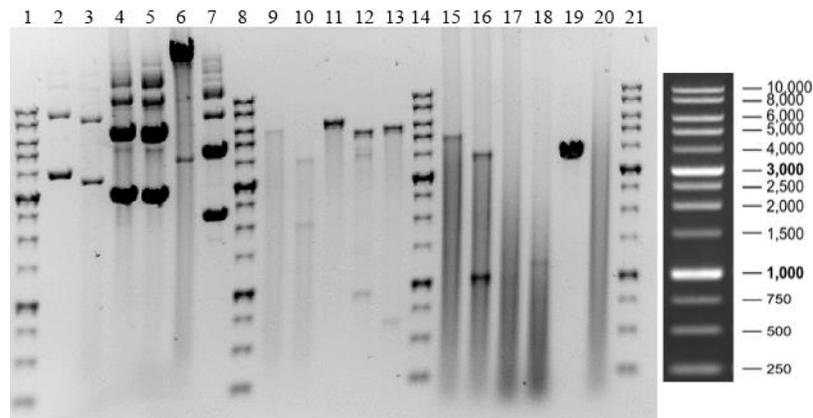
	Aktivität der Biokatalysatoren [ $\frac{nmol_{NADPH}}{g_{cells} \times h}$ ]		
	NADPH	NADP <sup>+</sup>	Ohne NADP(H)
E. coli BAPI pRSF-ptdH (permeabilisiert)	-0,65	12,52	15,10
E. coli BWZ 3 pRSF-ptdH (permeabilisiert)	47,29	51,68	71,87
E. coli BWZ 3 (permeabilisiert)	-5,03	9,42	10,06
E coli BWZ 3 (native)	1,94	2,52	1,29

**Tabelle 18:** Durchschnittlich enthaltene Nitritkonzentrationen in enzymatischen Reduktionen von Nitrat via Nitrat Reduktase (Reaktionsansätze enthielten 50 g/L permeabilisierte Zellen, 4 g/L Natriumphosphit und 5 mM Natriumnitrat).

		$C_{NADPH}$	$C_{NADP^+}$	$C_{Nitrit}$			$C_{NADPH}$	$C_{NADP^+}$	$C_{Nitrit}$
		[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]			[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]
<i>E. coli</i> BAPI pRSF-ptdH (permeabilisiert)	1 Stunde	50	-	48,9	<i>E. coli</i> BWZ3 (permeabilisiert)	1 Stunde	50	-	47,9
		25	-	30,3			25	-	29,3
		-	45,2	2			-	45,2	1
		-	22,6	2			-	22,6	1
		-	-	2			-	-	1
	1 Tag	50	-	47,9	<i>E. coli</i> BWZ3 (nativ)	1 Tag	50	-	46,9
		25	-	30,3			25	-	22,5
		-	45,2	11,7			-	45,2	8,8
		-	22,6	11,7			-	22,6	7,8
		-	-	13,7			-	-	8,8
<i>E. coli</i> BWZ 3 pRSF-ptdH (permeabilisiert)	1 Stunde	50	-	53,8	<i>E. coli</i> BWZ3 (permeabilisiert)	1 Stunde	50	-	46,9
		25	-	27,4			25	-	25,4
		-	45,2	2			-	45,2	12,7
		-	22,6	1			-	22,6	4,9
		-	-	4,9			-	-	0
	1 Tag	50	-	87	<i>E. coli</i> BWZ3 (nativ)	1 Tag	50	-	47,9
		25	-	67,5			25	-	27,4
		-	45,2	55,7			-	45,2	14,7
		-	22,6	27,4			-	22,6	6,8
		-	-	60,6			-	-	1

## 7.4 Agarosegel-Elektrophorese der Plasmidkonstrukte

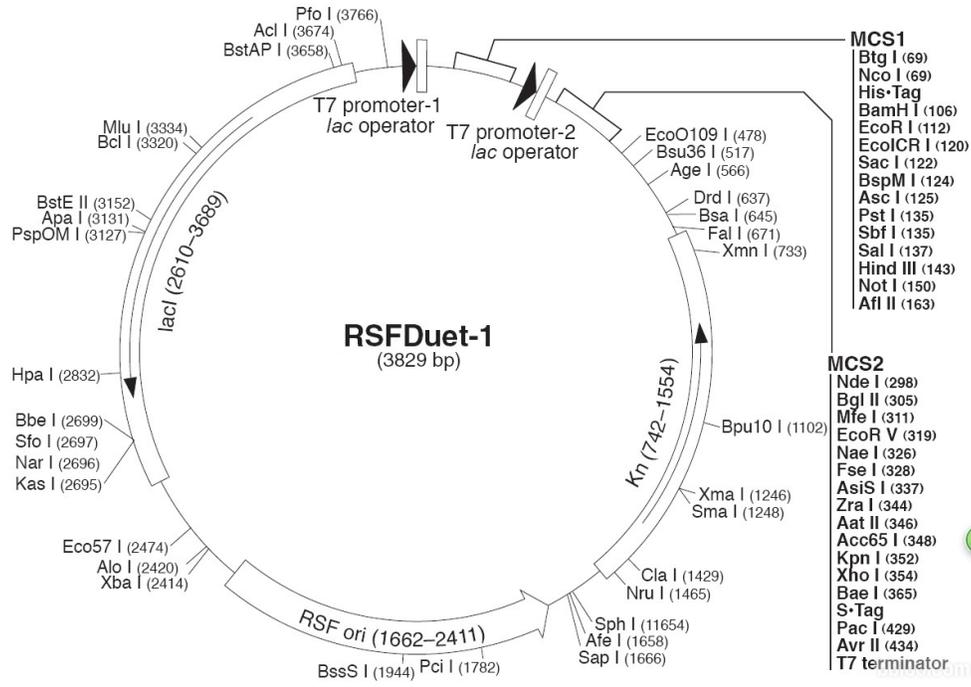
Die Expressionsvektoren zur gezielten Steigerung der intrazellulären Menge eines oder mehrerer Syntheseproteine wurden mit Standardmethoden in *E. coli* BWZ3 eingeschleust wobei die Enzymexpression durch den auf dem Vektorplasmid vorhandenen *lac*-Repressor gesteuert werden kann. Die Zellen wurden in Medium mit Resistenzmarker bis zu einer  $OD_{660\text{ nm}}$  von 1,8 kultiviert. Die Zelldichte wurde dabei so gewählt, dass die Kultur sich am Ende der exponentiellen Wachstumsphase befindet. Diese Phase erleichtert die Permeabilisierung, da die Zellwand die eingesetzten Detergenzien aufgrund des schnellen Wachstums besser aufnimmt. Die Expression der Enzyme wird daraufhin durch IPTG induziert, welches an den *lac*-Repressor bindet und die Transkription dahinter lokalisierter Gene ermöglicht. Abbildung 17 zeigt die Plasmidkonstrukte, welche in dieser Arbeit entwickelt wurden.



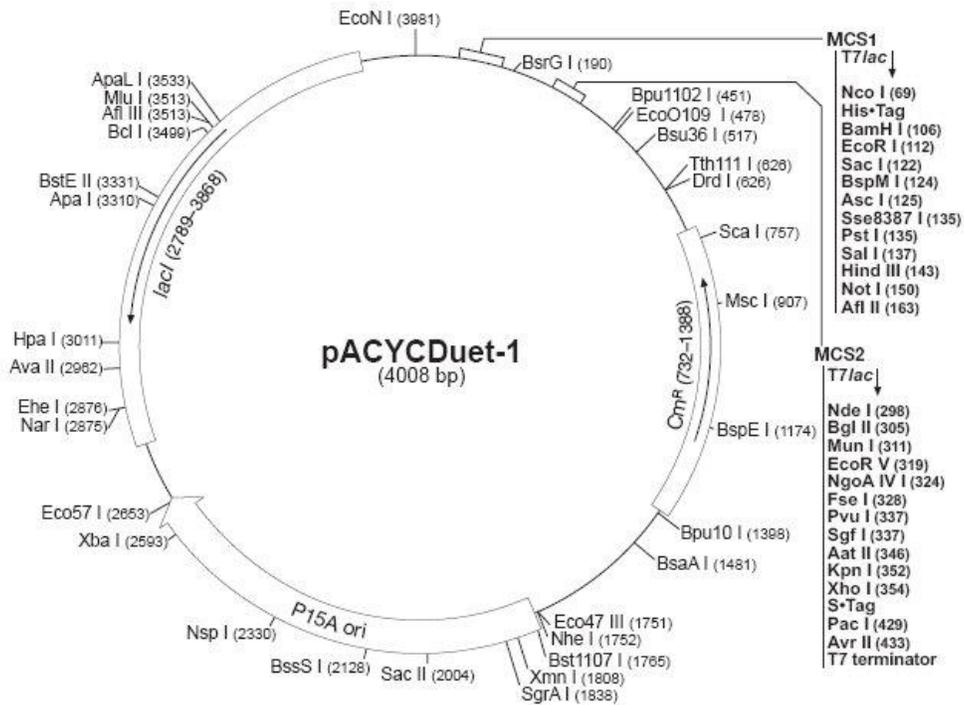
**Abbildung 17:** Plasmidkonstrukte: 1) Standard, 2) pRSF-*adk/ppk*, 3) pACYC-*acs*, 4) pRSF-*metK*, 5) pRSF-*ptdH*, 6) pMRH08 und pDCS02, 7) pRSFduet-1, 8) Standard, 9) pACYC-*acs* verdaut mit NcoI, 10) pACYC-*acs* verdaut mit NcoI und HindIII, 11) pRSF-*adk/ppk* verdaut mit NcoI, 12) pRSF-*adk/ppk* verdaut mit NcoI und BamHI, 13) pRSF-*adk/ppk* verdaut mit NdeI und EcoRV, 14) Standard, 15) pRSF-*ptdH* verdaut mit BamHI, 16) pRSF-*ptdH* verdaut mit BamHI und HindIII 17) pRSF-*metK* verdaut mit SacI, 18) pRSF-*metK* verdaut mit SacI und HindIII, 19) pRSFduet-1 verdaut mit BamHI, 20) pMRH08/pDCS02 verdaut mit BamHI, 21) Standard.

## 7.5 Vektorkarten

### *pRSFDuet-1*



### *pACYCDuet-1*



**pET-21a(+)**

