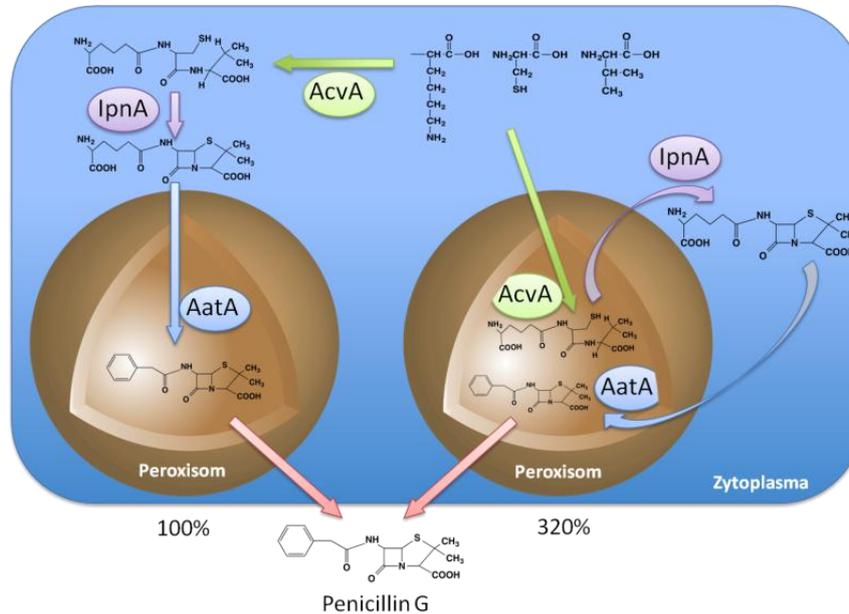


Steigerung der Penicillin- und Riboflavinproduktion in *Aspergillus nidulans* durch Translokation von Biosyntheseenzymen



Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie – Universitätsbereich

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Biol. Andreas Herr
aus
Heilbronn

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky
Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer
Korreferent: Prof. Dr. Matthias Mack
Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2015

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2011 bis Dezember 2014 am Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Mikrobiologie des Karlsruher Institut für Technologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer durchgeführt.

Inhalt

Zusammenfassung	1
Allgemeine Einleitung	1
Stoffwechsel von Pilzen	1
Primärmetabolismus	2
Sekundärmetabolismus	3
Pilze in der Biotechnologie	4
<i>Aspergillus nidulans</i> - ein Modellorganismus	5
Metabolic Engineering	6
Ziele der Arbeit	10
Teil I: Steigerung der Penicillin-Produktion durch peroxisomale Lokalisation von AcvA	12
Einleitung	12
Entdeckung von Penicillin	12
Wirkungsweise von Penicillin	13
Penicillin Gen-Cluster	15
Biosynthese von Penicillin	16
Peroxisom als "biotechnologisches Kompartiment"	17
Zielsetzung	19
Ergebnisse	20
Untersuchung der Bildung von Penicillin in <i>A. nidulans</i>	20
Lokalisation von AcvA in Peroxisomen erhöht die Penicillin-Produktion	21
Steigerung der Peroxisomenzahl in <i>A. nidulans</i> erhöht die Penicillin-Produktion und die Wachstumsrate	25
Überexpression der Penicillin-Gene erhöht die Penicillin-Produktion	27
Kombination aus Überexpression und Veränderung der subzellularen Lage	29
Diskussion	31
Teil II: Das CAAX-Motiv - Ein Werkzeug zur Stammoptimierung	35
Einleitung	35
Entdeckung und wirtschaftliche Bedeutung von Riboflavin	35
Biosynthese von Riboflavin	37
Enzyme der Riboflavin-Biosynthese in <i>A. nidulans</i>	40
Zellmembranen als biotechnologische Oberfläche	41
Ergebnisse	43
CAAX-Motiv von TeaR	43
Berechnung der möglichen Anzahl membrangebundener Proteine in <i>A. nidulans</i>	44
Strukturvorhersage der Enzyme der Riboflavin-Biosynthese in <i>A. nidulans</i>	45
Lokalisation der Riboflavin-Biosyntheseenzyme	47
Verankerung der Enzyme Rib3, Rib4 und Rib5 in der Membran	48
Untersuchung der Bildung von Riboflavin	49
Riboflavin-Produktion ist unabhängig von der eingesetzten C-Quelle	51
Überexpression von <i>rib3</i> , <i>rib4</i> und <i>rib5</i> steigert die Riboflavinproduktion	52
Membranlokalisierung von Rib4 hat einen Einfluss auf die Riboflavinproduktion	54
Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Kohlenstoffquelle	55
CAAX-Motiv übt keinen Einfluss auf die Aktivität von Rib4 und Rib5 aus	56

Diskussion	58
Material & Methoden	66
Allgemein	66
Stämme, Plasmide und Kulturbedingungen	66
Molekularbiologische Methoden	71
Mikroskopische Methoden	80
Zu Teil I	81
Penicillin-Messung.....	81
RNA-Isolierung.....	82
Quantitative Real Time PCR.....	83
Markierung von <i>acvA</i>	83
Markierung von <i>ipnA</i>	84
Kokolisierung der Enzyme der Penicillin-Biosynthese mit einem peroxisomalen Marker	85
Steigerung der Peroxisomenzahl.....	85
Überexpression der Penicillingene	85
Zu Teil II	87
Markierung der Riboflavin-Biosyntheseenzyme Rib1 und Rib3 mit und ohne CAAX-Motiv durch GFP oder RFP mittels Hefe-Rekombination	87
Markierung der Riboflavin-Biosyntheseenzyme Rib2, Rib4, Rib5 und Rib7 mit und ohne CAAX-Motiv durch GFP oder RFP	91
Überexpression von Rib3, Rib4 und Rib5 mit und ohne CAAX-Motiv	92
Riboflavin-Assay	93
HPLC-Messung.....	94
Enzymassay für Riboflavin-Synthase (Rib5).....	95
Literaturverzeichnis	96
Publikationsliste	113
Curriculum vitae Andreas Herr	114
Danksagung	116
Anhang.....	117

Zusammenfassung

Mikroorganismen haben eine sehr lange Tradition in der Lebensmittelherstellung. Mit ihnen werden Käse, alkoholische Getränke wie Bier, Wein oder Sake und auch Essig oder Sauerkraut hergestellt. In der Biotechnologie werden sie dazu eingesetzt, Produkte wie Zitronensäure, Antibiotika, Enzyme, Aminosäuren und vieles mehr herzustellen. In der weißen Biotechnologie ist das fortwährende Ziel, Mikroorganismen für eine höhere Produktion von Primär- und Sekundärmetaboliten zu optimieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Produktionssteigerung von Primär- und Sekundärmetaboliten durch Nutzung intrazellulärer Strukturen erforscht. In einer eukaryotischen Zelle sind einige Strukturen wie Organellen, das Zytoskelett oder die Zellmembran vorhanden, an die Enzyme eines Biosyntheseweges gekoppelt werden können. Durch die Verlagerung von Enzymen sollte der Substratfluss verringert und somit die Produktion gesteigert werden. Die Untersuchungen wurden an *Aspergillus nidulans* vorgenommen, einem filamentös wachsenden Askomyzeten und gut untersuchten Modellorganismus. *A. nidulans* ist außerdem in der Lage Riboflavin und Penicillin zu synthetisieren.

Nur drei Enzyme werden benötigt, um Penicillin aus den drei Aminosäuren L- α -Aminoadipinsäure, L-Cystein und L-Valin zu bilden. Die ersten beiden Schritte der Synthese, die durch AcvA und IpnA katalysiert werden, laufen im Zytoplasma ab, wohingegen der letzte Schritt der Penicillin-Synthese der AatA katalysiert wird in den Peroxisomen abläuft. Daher war der erste Ansatz dieser Arbeit alle Enzyme der Penicillin-Biosynthese in den Peroxisomen zu vereinen. Es wurde demnach überprüft, ob eine peroxisomale Lage von AcvA und IpnA (oder beide) eine Erhöhung des Penicillin-Titers ermöglichte. Die Verlagerung von AcvA führte zu einer 3,2-fachen Steigerung der Penicillin-Produktion verglichen zum Wildtyp, wohingegen die Verlagerung von IpnA zu einem kompletten Verlust der Produktion führte. Durch eine Überexpression der Gene *acvA*, *ipnA* und *aatA* konnte die 1,4-, 2,8- und 3,1-fache Penicillin-Produktion erreicht werden. Durch Kombinationen der überexprimierten Gene konnten bis zu 6-mal mehr Penicillin produziert werden. Durch eine Kombination aus peroxisomaler Lage und gleichzeitiger Überexpression von AcvA konnte 5-mal mehr Penicillin detektiert werden und durch eine Verdopplung der Peroxisomenanzahl 2,3-mal mehr.

Für die Riboflavin-Biosynthese werden in *A. nidulans* sechs Enzyme benötigt: Rib1, Rib2, Rib3, Rib4, Rib5 und Rib7. Diese Enzyme synthetisieren Riboflavin im Zytoplasma ausgehend von zwei Molekülen Ribulose-5-phosphat und einem Molekül GTP. Das zweite Ziel dieser Arbeit war eine Produktionssteigerung von Riboflavin durch Nutzung der Zytoplasmamembran als biotechnologische Oberfläche. Dazu sollten die Enzyme der Riboflavin-Biosynthese aus dem Zytoplasma in der Membran verankert werden. Die Fusion des C-terminalen CAAX-Motives von TeaR, welches ebenfalls

membranständig ist, erzielte bei den Enzymen Rib3, Rib4 und Rib5 eine Verankerung in der Membran. Durch die Überexpression der Gene *rib3*, *rib4* und *rib5* und Kombinationen daraus konnten bis zu 1,78-mal mehr Riboflavin, FMN und FAD im Vergleich zum Wildtyp und bis 1,96-mal mehr im Vergleich zu nicht-induzierenden Bedingungen erzielt werden. Durch einzelne Membranverankerungen der Enzyme Rib3, Rib4 und Rib5 oder Kombinationen daraus konnte die Produktion im Vergleich zum Wildtyp um das 2-fache gesteigert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Penicillin- und Riboflavin-Biosynthese durch viele Ansätze optimiert werden können. Die Veränderung der Lage von Enzymen oder die Verankerung von Enzymen in der Zytoplasmamembran sind zwei davon. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zellinterne Strukturen zur Umgehung von Engpässen und zu einer Steigerung der Produktion von Primär- und Sekundärmetaboliten genutzt werden können.

Allgemeine Einleitung

Die Biotechnologie gliedert sich in drei große Gruppen. Die rote Biotechnologie umfasst medizinische, die grüne Biotechnologie landwirtschaftliche und die weiße Biotechnologie industrielle Aspekte. Das Ziel der weißen Biotechnologie ist die Kombination klassischer und moderner Verfahren, in denen biologische Systeme oder Komponenten davon für die Produktion von Stoffen genutzt werden. Die Vorteile biotechnologischer Verfahren im Gegensatz zu vergleichbaren chemischen Verfahren sind meist eine erhöhte Produktivität, verbesserte Qualität und die Einsparung fossiler Rohstoffe. In der mikrobiellen Biotechnologie werden Bakterien und Pilze gleichermaßen eingesetzt. Pilze werden dabei unter anderem zur Produktion von Nahrungsmitteln, Futtermitteln oder Stoffwechselprodukten wie Antibiotika, Enzymen oder Steroiden eingesetzt. Vor allem die weiße (mit Mikroorganismen arbeitende) Biotechnologie hat sich zu einem der bedeutendsten Industriezweige des 21. Jahrhunderts entwickelt.

Stoffwechsel von Pilzen

Der Stoffwechsel umfasst alle Reaktionen eines Organismus. Dabei kann zwischen primärem und sekundärem Metabolismus unterschieden werden. Der Primärmetabolismus sichert das Überleben und das Wachstum, wohingegen der Sekundärmetabolismus nicht für das Überleben notwendig ist. Trotzdem können Primär- und Sekundärstoffwechsel nicht komplett getrennt voneinander betrachtet werden, da häufig Produkte des Primärstoffwechsels als Ausgangsprodukte für den Sekundärstoffwechsel dienen (Abbildung 1).

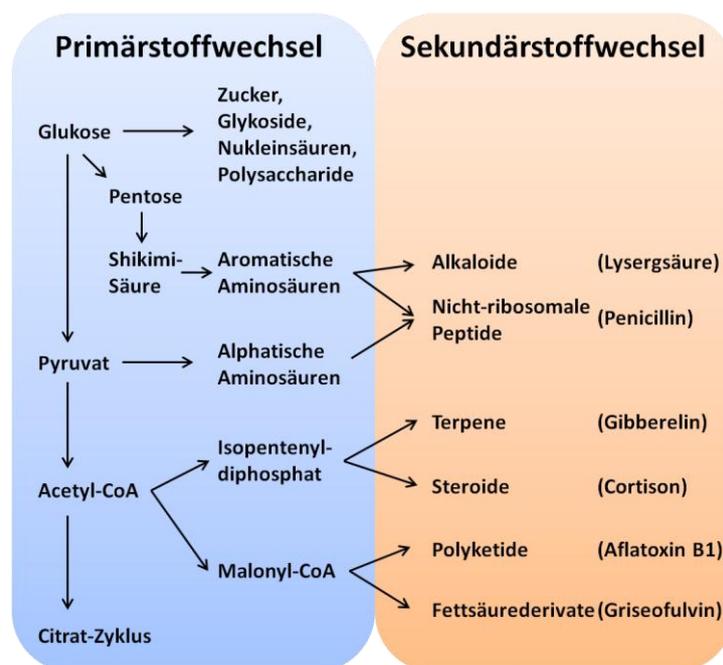


Abbildung 1: Verbindung zwischen dem Primär- und dem Sekundärstoffwechsel. Einige Produkte des Primärmetabolismus dienen als Ausgangsstoffe für den Sekundärmetabolismus.

Primärmetabolismus

Der Primärmetabolismus umfasst unter anderem den Abbau komplexer Moleküle (Proteine, Kohlenhydrate und Fette) für die Bereitstellung von Nährstoffen und notwendigen Einheiten zum Aufbau der Zellmasse. Die Prozesse zum Abbau dieser unterschiedlichen Komponenten finden an verschiedenen Orten innerhalb der Zelle statt, sodass auch Transportprozesse eine wichtige Rolle spielen (Kück U., 2009). Die Glykolyse kann nur Einfachzucker verwerten. Pilze sind aufgrund ihrer vielfältigen Enzyme in der Lage eine Vielzahl unterschiedlicher Kohlenhydrate (beispielsweise Zellulose, Lignin oder Stärke) in ihre Zucker-Einheiten zu spalten. Durch diese Fähigkeit ist es Pilzen möglich auf sehr vielen verschiedenen Substraten zu wachsen. Die Glykolyse, die vor allem im Zytoplasma aber auch in den Peroxisomen abläuft (Freitag *et al.*, 2012), umfasst zehn Schritte. Sie kann grob in zwei Phasen aufgeteilt werden. Aus Glukose entsteht so ATP, der häufigste Energieträger einer Zelle, Pyruvat und Reduktionsäquivalente, die in späteren Prozessen ebenfalls zur Energiegewinnung genutzt werden können. Das Pyruvat wird in die Mitochondrien transportiert und dort für den Eintritt in den Citrat-Zyklus vorbereitet. Dieser hat die Aufgabe das Pyruvat, das zuvor zu Acetyl-Koenzym A umgebaut wird, durch Abspaltung von CO₂ weiter zu verstoffwechseln und zusätzliche Energie in Form von ATP, GTP und Reaktionsäquivalenten zu generieren. Zudem sind noch viele andere Prozesse wie beispielsweise der Glyoxylat-Zyklus, der in spezialisierten Peroxisomen (Glyoxysomen) abläuft, für das Überleben einer Zelle notwendig. An diesen Vorgängen sind viele Enzyme aus Pilzen beteiligt, die auch in der Industrie von Bedeutung sind. Meist handelt es sich dabei um Enzyme, die von den Pilzen sekretiert werden um in dem umliegenden Medium komplexe Moleküle abzubauen. Die in Tabelle 1 aufgeführten Enzyme werden in den verschiedensten Bereichen angewandt, wie etwa in der Lebensmittel-, Textil-, Papier- und Waschmittelindustrie (Kück U., 2009; Meyer, 2008).

Tabelle 1: Beispiele biotechnologisch relevanter Enzyme aus Pilzen. (Meyer, 2008; Olempska-Beer *et al.*, 2006; Polizeli *et al.*, 2005).

Enzym	Organismus
α-Amylase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Chymosin	<i>Aspergillus niger</i>
Zellulase	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i>
Zellobiohydrolase	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i>
Glukoamylase	<i>Aspergillus phoenicis</i> , <i>Rhizopus delemar</i>
Glukoseoxidase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Laccasen	<i>Trametes versicolor</i>
Lipasen	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Pektinlyase	<i>Trichoderma reesei</i>
Proteasen	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Rhizopus delemar</i>
Phytase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Rennin	<i>Mucor miehei</i>
Xylanasen	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma konignii</i> , <i>Aspergillus niger</i>

Sekundärmetabolismus

Im Gegensatz zum Primärmetabolismus, der bei allen Pilzarten in etwa gleich abläuft und dessen Produkte für das Überleben essentiell sind, ist der Sekundärmetabolismus bei fast allen Pilzarten unterschiedlich. Ein für jede Art spezifischer Enzymmix ist verantwortlich für eine Vielzahl unterschiedlicher Endprodukte, welche als Sekundärmetabolite bezeichnet werden. Ihre Biosynthese ist immer die Folge eines nicht essentiellen Stoffwechsels. Dabei spielen eine Reihe von Faktoren wie zum Beispiel die Substratzusammensetzung, die Zusammensetzung der Atmosphäre, die Temperatur und der pH-Wert eine wichtige Rolle. Außerdem korreliert die Bildung dieser Stoffe oft mit bestimmten Stadien der morphologischen Differenzierung und der Wachstumsphase (Keller *et al.*, 2005; Kück U., 2009).

Sekundärmetabolite besitzen gewöhnlich ein geringes Molekulargewicht, weisen eine hohe chemische Vielfalt und Komplexität auf und sind charakteristisch für den produzierenden Stamm, die Art oder die Gattung. Produkte des Sekundärmetabolismus in Pilzen sind beispielsweise Mykotoxine wie Aflatoxin, oder auch Pharmazeutika wie zum Beispiel Penicillin. Viele Sekundärmetabolite sind aufgrund ihrer vielfältigen Wirkungen für den Menschen von großem Interesse. Als herausragendes Beispiel können hier die Antibiotika genannt werden, deren bakterizide Wirkung dem produzierenden Organismus im Kampf um verfügbare Ressourcen dient. Allerdings ist der biologische Zweck für den produzierenden Pilz nicht immer wie am Beispiel der Antibiotika eindeutig ersichtlich und die natürlichen Produktionsbedingungen sind oftmals unbekannt. Zudem besteht die Theorie, dass sekundäre Stoffwechselprodukte als Botenstoffe zur Steuerung biologischer Prozesse intra- und interspezifisch dienen können (Brakhage, 2013).

Die Entdeckung von Penicillin im Jahre 1928 (Fleming, 1929) trug maßgeblich zum Start umfangreicher Programme pharmazeutischer Unternehmen bei, welche die Entdeckung neuer Sekundärmetabolite zum Ziel hatten. Dies hatte zur Folge, dass in den Jahren zwischen 1993 und 2001 etwa 1500 neue Sekundärmetabolite aus Pilzen isoliert wurden. Diese wiesen zum Teil antibakterielle, antivirale oder zytostatische (Tumor-suppressive) Aktivitäten auf. Die Einteilung der sekundären Stoffwechselprodukte der Pilze erfolgt vor allem unter dem Aspekt, welche Vorläufermoleküle des Primärmetabolismus zum Einsatz kommen und welche Enzyme des Sekundärstoffwechsels an der Biosynthese beteiligt sind. Es werden vier chemische Gruppen unterschieden, die Polyketide und Fettsäurederivate, die nicht-ribosomalen Peptide, die Isoprenoide und die Alkaloide (Abbildung 1) (Andersen *et al.*, 2013).

Pilze in der Biotechnologie

Pilze sind ubiquitär verbreitet und haben sich im Laufe ihrer Entwicklung an diverse Lebensräume angepasst. Im Zuge dessen fand eine Anpassung durch die Entwicklung unterschiedlicher Stoffwechselwege für die verschiedensten Aufgaben statt. Zudem besitzen sie die Fähigkeit auf einfachen und damit sehr günstigen Substraten zu wachsen. Diese und weitere Eigenschaften nutzt die moderne Biotechnologie um die steigende Nachfrage an Primär- und Sekundärmetaboliten zu decken. Die Fülle reicht hier von einfachen organischen Säuren bis hin zu komplexen sekundären Metaboliten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ausgewählte Primär- und Sekundärmetabolite, die in Pilzen biotechnologisch hergestellt werden. Zusammengefasst aus folgenden Reviews und Veröffentlichungen: (Adrio & Demain, 2003; Archer, 2000; Bennett, 1998; Leathers, 2003; Linder *et al.*, 2005; Willke & Vorlop, 2001).

Metabolit	Organismus
Zitronensäure	<i>Aspergillus niger</i>
Itaconsäure	<i>Aspergillus terreus</i>
Kojisäure	<i>Aspergillus oryzae</i>
Skleroglukan	<i>Sclerotium rolfsii</i>
Pullulan	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Riboflavin	<i>Ashbya gossypii</i>
Zephalosporin	<i>Acremonium chrysogenum</i>
Zyklosporin	<i>Tolypocladium nivenum</i>
Mutterkornalkaloide	<i>Claviceps purpurea</i>
Griseofulvin	<i>Penicillium griseofulvum</i>
Lovastatin	<i>Monascus ruber, Aspergillus terreus</i>
Penicillin	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Taxol	<i>Taxomyces andrenae</i>
Zeranol	<i>Fusarium graminearum</i>
Panthothensäure	<i>Fusarium oxysporum</i>
Hydrophobin	<i>Trichoderma reesei</i>
Biomasse	<i>Agaricus bisporus</i>

Die Eigenschaft von filamentösen Pilzen eine hohe Anzahl an Proteinen herzustellen und ins umliegende Medium zu sezernieren, macht sie besonders attraktiv zur Herstellung endogener und heterologer Proteine. Endogene und rekombinante Enzyme werden beispielsweise mit den Gattungen *Aspergillus*, *Trichoderma*, oder *Penicillium* produziert (Kolasa *et al.*, 2014; Ottenheim *et al.*, 2014; Rawat *et al.*, 2015) (Tabelle 1). Zusätzlich zu Enzymen produzieren filamentöse Pilze ein breites Spektrum an Sekundärmetaboliten. Einige davon sind für den Menschen von besonderer Bedeutung und werden daher biotechnologisch produziert. Nennenswert sind vor allem Penicillin (Antibiotikum), Zyklosporin A (Immunsuppressiva), Lovastatin (Mittel zur Behandlung eines hohen Cholesterinspiegels), Taxol (wird im Kampf gegen Krebs eingesetzt) und Griseofulvin (ein Fungizid)

(Meyer, 2008) (Tabelle 2). Zudem werden Pilze zur Herstellung von Exopolysacchariden wie Pullulan (Leathers, 2003) oder Hydrophobinen (Degenkolb *et al.*, 2008; Morris & Sunde, 2013) genutzt.

Obwohl dieser Aufzählung noch einige Komponenten hinzugefügt werden können, lässt sich erkennen, dass filamentöse Pilze durch die hohe Vielfalt an produzierten Metaboliten für die Biotechnologie von herausragender Bedeutung sind.

***Aspergillus nidulans* - ein Modellorganismus**

Zur Erstellung dieser Arbeit wurde *A. nidulans* verwendet. *A. nidulans* ist ein filamentös wachsender und ubiquitär vorkommender Askomyzet. Seine Lebensweise und Eigenschaften qualifizieren ihn für die Beantwortung einer Reihe wissenschaftlicher Fragestellungen. Dieses sehr wertvolle Modellsystem ist sehr gut zugänglich, was bedeutet, dass viele molekularbiologische Methoden bereits etabliert sind und ein großes Potential für die klassische Genetik vorhanden ist (Todd *et al.*, 2007). *A. nidulans* ist in der Lage eine große Anzahl an Sekundärmetaboliten zu bilden. Viele Sekundärmetabolite sind bei Pilzen in sogenannten Genclustern angeordnet. Das bedeutet, dass die Gene, die sie kodieren, in einem definierten Abschnitt im Genom nebeneinander liegen. Pilze sind, soweit bekannt, die einzigen Eukaryoten, die solche Gencluster besitzen. In allen anderen erforschten Eukaryoten sind die Gene für Biosynthesewege über das Genom verteilt (Brown *et al.*, 1996; Hoffmeister & Keller, 2007). Durch die Sequenzierung des Genoms von *A. nidulans* (Galagan *et al.*, 2005) konnten über 40 Biosynthesewege für Sekundärmetabolite gefunden werden. Allerdings waren weniger als zehn davon zu diesem Zeitpunkt entdeckt. Durch bioinformatische Analysen des Genoms von *A. nidulans* lässt sich vermuten, dass 27 Polyketidsynthasen, 14 nicht-ribosomale Peptidsynthasen, sechs Fettsäuresynthasen und eine Sequiterpenzyklase vorhanden sind (Lo, 2008). In dieser Arbeit liegen die Stoffe Riboflavin (Primärstoffwechsel) und Penicillin (Sekundärstoffwechsel) im Fokus. Nach der Erforschung und Etablierung neuer Methoden in *A. nidulans* kann ein nächster Schritt die Anwendung in Industriestämmen sein. Aufgrund seiner nahen Verwandtschaft zu industriell genutzten Organismen (Abbildung 2), ist dies mit hoher Wahrscheinlichkeit möglich.

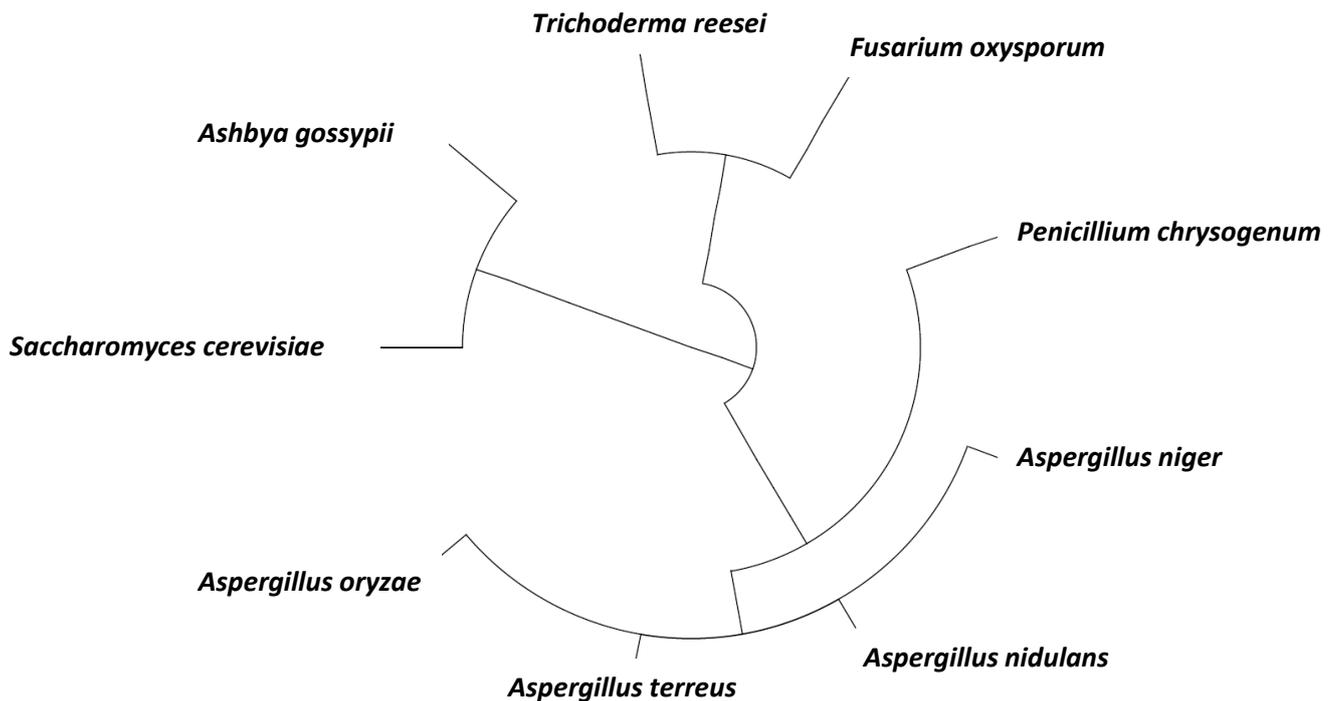


Abbildung 2: Phylogenetische Beziehungen der nächsten Verwandten von *A. nidulans*. Alle angeführten Stämme finden in der Biotechnologie Anwendung. Die Tabellen 1 und 2 geben einen Überblick über das von diesen und anderen Pilzen produzierte Produktspektrum.

Metabolic Engineering

Im Zeitalter der klassischen Biotechnologie, die sich Mitte des 20. Jahrhunderts mit der Aufklärung von Stoffwechselwegen beschäftigte, wurden Verbesserungen von Produktionsstämmen meist durch zufällige Mutationen und anschließende Selektion auf die gewünschte Eigenschaft erzielt. In der heutigen Zeit ist es das Ziel von Forschern weltweit Produktionsstämmen mit Hilfe gezielter Manipulationen auf genetischer Ebene herzustellen. Diese Verfahrensweise wird allgemein als "Metabolic Engineering" bezeichnet. Als finales Ziel wird dabei die "gläserne Zelle" angestrebt, in der alle Stoffwechselprozesse nach Belieben angepasst und geändert werden können.

Somit stellt "Metabolic Engineering" die Optimierung genetischer und regulatorischer Prozesse in einer Zelle dar mit dem Hauptziel die Produktion einer oder mehrerer Substanzen zu erhöhen. Ein weiteres Ziel kann dabei auch die Reduktion von Nebenprodukten sein, da diese zu einer Minderung des Produktionsertrages führen können. Um einen Prozess zu optimieren und damit die Produktion eines bestimmten Stoffes zu erhöhen, müssen mehrere Schritte durchlaufen werden (Abbildung 3).

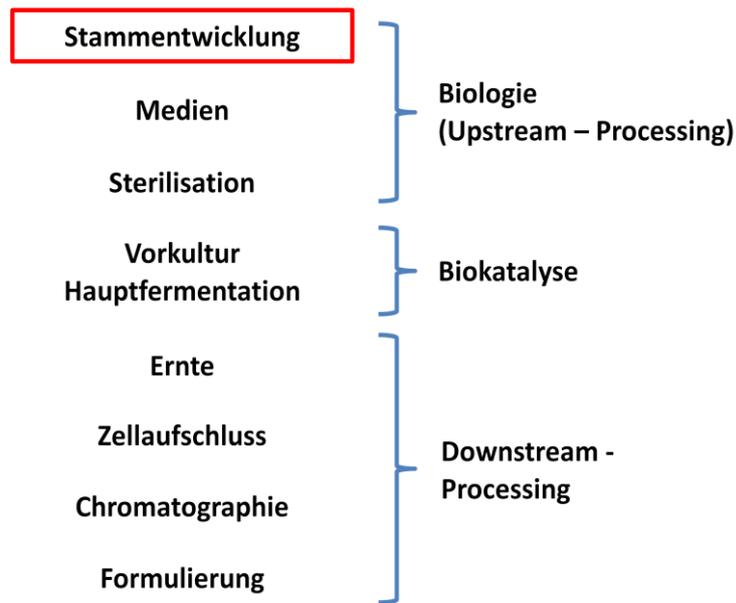


Abbildung 3: Die wichtigsten Arbeitsschritte der Bioverfahrenstechnik und die drei wesentlichen Bereiche "Biologie (Upstream -Processing)", "Biokatalyse" und "Downstream-Processing". Diese Arbeit bezieht sich auf den allerersten Schritt, die Stammentwicklung.

In der Prozessoptimierung werden drei Hauptschritte unterschieden. Die reine Biologie ("Upstream-Processing") beinhaltet als ersten Schritt die Stammentwicklung. In diesem Schritt ist die komplette Genetik und Zelloptimierung zusammengefasst. Des Weiteren müssen die richtigen Kultivierungsmedien für den verwendeten Organismus und den gewünschten Stoff und eine Möglichkeit zur Sterilisation gefunden werden. Der nächste Schritt, die Biokatalyse, behandelt die Bedingungen für die Vorkultur und die eigentliche Fermentation. Das "Downstream-Processing" umfasst vier weitere Schritte. Das Ernten der Kultur, die Isolierung des gewünschten Stoffes, die Chromatographie zur Analyse der Reinheit und zum Schluss die Formulierung der genetischen Veränderungen des hergestellten Stammes und des ganzen Prozesses (Abbildung 3). Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf den ersten Schritt des "Metabolic Engineering", die Stammentwicklung.

Den richtigen Organismus für die Produktion zu finden, ist im Allgemeinen ein langwieriges experimentelles Unterfangen, nicht zuletzt aufgrund der Vielzahl möglicher Kandidaten. Im Laufe der Zeit wurden bestimmte Kriterien definiert, welche es erleichtern sollen, den am besten geeigneten Organismus zu identifizieren. Als erstes müssen alle Ressourcen vorhanden sein. Damit ist gemeint, dass der auserwählte Organismus alle Vorstufen und Kofaktoren, die für die Produktsynthese notwendig sind, herstellen kann um Engpässe während der Produktion zu vermeiden. Dies setzt vor allem ein geeignetes Enzymspektrum voraus. Um herauszufinden, welcher Organismus geeignet ist, kommen genomweite Metabolismusanalysen mit Hilfe von Computerprogrammen zum Einsatz (Goel *et al.*, 2012; Milne *et al.*, 2009). Solche automatisierte Methoden sind zum Beispiel "SEED" (Henry *et al.*, 2010) oder "Path2Models" (Buchel *et al.*, 2013).

Ein zweites wünschenswertes Kriterium ist die Fähigkeit zur Proteinsekretion. Wenn der gewünschte Stoff ins umliegende Medium abgegeben werden kann, fällt der zeitintensive und kostspielige Prozess des Zellaufschlusses weg. Daher wird einerseits nach Organismen gesucht, welche verbesserte Sekretionseigenschaften besitzen (Mattanovich *et al.*, 2012) und gleichzeitig an einer Prozessentwicklung gearbeitet welche es möglich machen soll, gewünschte Stoffe direkt nach der Synthese ins umliegende Medium abzugeben. Einen solchen Ansatz stellt z.B. die "Peroxicretion" dar (Sagt *et al.*, 2009). Hier werden SNARE-Proteine (Engl. Abkürzung für: soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor), die ursprünglich vom Golgi Apparat stammen, benutzt, um bestimmte Organellen, die Peroxisomen, für den Sekretionsweg zu markieren. Die SNARE-Proteine werden mittels eines Membranankers in die Zellmembran der Peroxisomen integriert und lassen somit einen neuen Sekretionsweg entstehen. Die gewünschten Produkte (Enzyme oder andere Proteine) werden dann mit einer peroxisomalen Zielsequenz versehen. Dadurch werden sie in die Peroxisomen transportiert, diese wiederum durch die integrierten "SNARE"-Proteine automatisch sekretiert und das gewünschte Produkt ins umliegende Medium abgegeben.

Ein dritter wichtiger Aspekt, der bei der Wahl des richtigen Produktionsorganismus zu beachten ist, ist die Toxizität der Produkte oder Intermediate, da einige davon das Wachstum des Wirtsorganismus hemmen können. Dieser muss also dazu fähig sein, die entstandenen Stoffe abzubauen (Jarboe *et al.*, 2013; Royce *et al.*, 2013). Beispielsweise wurde die Alkoholtoleranz von *Clostridium sp.* und *Escherichia coli* um das achtfache erhöht, um zu verhindern, dass sich die Membranfluidität erhöht und damit das Membranpotential verloren geht (Brown *et al.*, 2011; Huffer *et al.*, 2011; Tomas *et al.*, 2003).

Als viertes wichtiges Kriterium, das den idealen Produktionsstamm auszeichnet, ist die Fähigkeit Proteine in der korrekten Konformation falten zu können um deren Funktion zu konservieren. Die Expression von aktiven heterologen Enzymen ist von einer Reihe von Faktoren abhängig. Dazu gehört das korrekte Ablesen des Transkriptes, die Verfügbarkeit von notwendigen Chaperonen und geeigneten post-translationalen Modifikationen (Bernal *et al.*, 2014; Hartl *et al.*, 2011; Osterlehner *et al.*, 2011). Es existiert eine Vielzahl an gut untersuchten Organismen die für die Produktion in Frage kommen. Für einige davon wurden mittlerweile gute Werkzeuge entwickelt um genetische Manipulationen vorzunehmen. Ein gut zugänglicher Organismus ist also unabdingbar für Metabolic Engineering (Fisher *et al.*, 2014).

Es gibt mehrere klassische Ansätze um ein Zellprodukt zu manipulieren. Möglich sind Eingriffe auf allen drei Ebenen (DNA, RNA und Protein). Um diese Manipulationen durchzuführen zu können, wurden verschiedene experimentelle Möglichkeiten entwickelt. Sehr oft werden Überexpressionen des kompletten Syntheseweges oder Teilen davon verwendet. Mit dieser Methode werden oftmals

gute Ergebnisse erzielt (Duan *et al.*, 2010; Herr & Fischer, 2014; Marx *et al.*, 2008). Allerdings kann dieser Ansatz, alleine angewendet, zu Komplikationen führen. Die Anzahl der Enzyme ist, auf der Grundlage von Substraten und Reaktionsgeschwindigkeiten, durch die Evolution optimiert worden. Durch Überexpression kann ein Ungleichgewicht eintreten und damit das Zellwachstum oder andere wichtige Prozesse gestört werden (Li *et al.*, 2014). Diesem Problem wird mit einer zusätzlichen Zufuhr an Substraten entgegengewirkt. Ein weiterer Ansatz um den Syntheseweg innerhalb einer Zelle zu beeinflussen, ist die Herstellung sogenannter Gen-"Knock-Outs" oder "Deletionen", bei der einzelne oder mehrere Gene gezielt deaktiviert werden. Dabei sind meist konkurrierende Synthesewege das Ziel, die durch das Abfangen einer Zwischenstufe oder weiterer Verstoffwechslung des Endproduktes zu einer Abnahme der Ausbeute führen. Die Deletion eines Gens ist eine gut etablierte und weit verbreitete Methode (Heap *et al.*, 2012; St-Pierre *et al.*, 2013; Szewczyk *et al.*, 2006). Natürlich kann die Deletion eines Gens auch eine Instabilität des Stoffwechsels auslösen und damit beispielsweise die Wachstumsrate negativ beeinflussen. Eine Verringerung der Genaktivität durch RNA-Regulierung kann eine solche Instabilität ausgleichen. Diese Technik umfasst kleine regulatorische RNA-Moleküle ("small RNA"; sRNA), die sich an gerade entstehende RNA binden und damit die Translation blockieren oder die RNA für den Abbau markieren (Na *et al.*, 2013).

Die Überexpression von Genen kann im schlimmsten Fall zu einem kompletten Verlust der Enzymaktivität führen, was auf eine Limitierung des Substrates zurückzuführen ist. Die Bildung von Engpässen kann durch den Einsatz spezifischer Promotoren umgangen werden (Dahl *et al.*, 2013). Gleichzeitig kann mit dieser Methode einer Ansammlung toxischer Intermediate entgegengewirkt werden. Bei einem Operon, wie es in Prokaryoten zu finden ist, werden mehrere Gene durch denselben Promotor reguliert. Trotzdem ist es möglich, Unterschiede in der Genaktivität zu erzeugen indem die Stabilität der mRNA durch einen Eingriff in die Ribosomenbindestellen verändert wird (Pfleger *et al.*, 2006; Salis *et al.*, 2009). Zusätzlich können spezielle Strukturen der mRNA verändert und somit die Synthese eines Stoffes direkt beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation von *ribC* (Flavokinase/ FAD-Synthetase) in *Bacillus subtilis* dazu führt, dass die Produktion von FMN und FAD aus Riboflavin stark abnimmt und es dadurch zu einer Anhäufung von Riboflavin kommt (Coquard *et al.*, 1997). Zudem spielt der Transport über die Zellmembran eine wichtige Rolle bei der Verfügbarkeit des benötigten Substrates und hat dadurch einen Einfluss auf das herzustellende Produkt. Überexpression und Mutation von Membrantransporterproteinen zeigten beispielsweise einen 70%igen Anstieg des Isoprenoidtiters in *E. coli* und eine 70%ige Zunahme von Xylose in *Saccharomyces cerevisiae* (Wang *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2012).

Durch die angeführten Methoden ist es möglich einen Stoffwechselprozess zu beeinflussen, der natürlich in einem Organismus vorkommt (Otero *et al.*, 2013), oder einen der Zelle fremden

Stoffwechselweg einzubringen und somit ein neues und fremdes Produkt zu synthetisieren (Choi *et al.*, 2011).

Neben den Ansätzen *in vivo*, bei denen die Stoffsynthese innerhalb der lebenden Zelle untersucht wird, werden auch *in vitro*-Ansätze (außerhalb eines lebenden Organismus) geprüft. Ein Argument für *in vitro* Ansätze ist vor allem die Kostensenkung durch die Ersparnis von eingesetzten Substanzen (vor allem Kohlenstoffquellen) für Wachstum, Erhaltung des Lebens oder die Synthese von Nebenprodukten in einer lebenden Zelle. Für das Design von *in vitro*-Ansätzen müssen mehrere Aspekte berücksichtigt werden. Zum einen die Rekonstruktion des Biosyntheseweges; Enzyme müssen gewählt, für den Einsatz *in vitro* verändert und produziert werden. Zudem werden eine maximale Prozessoptimierung, ein optimiertes Prozessdesign und eine ausgewogene ATP- und NAD(P)-Balance, vorausgesetzt. Zusätzliche Faktoren sind involvierten Koenzyme, sowie die Thermodynamik, die Reaktionsgleichgewichte, die Produktaufreinigung und vieles mehr (Zhang, 2014).

Moderne Ansätze versuchen im Gegensatz zu den klassischen *in vivo* und *in vitro* Verfahren neue Wege für eine höhere Produktion zu finden. So wurden zum Beispiel Proteingerüste verwendet um drei Enzyme eines Mehrschrittprozesses physisch aneinander zu binden (You *et al.*, 2012). Dieser Enzymkomplex hatte eine höhere Reaktionsrate als ein Mix aus den drei freien Enzymen bei gleicher Enzymkonzentration. Es konnten also kinetische Limitierungen umgangen werden.

Ziele der Arbeit

Das moderne Zeitalter der industriellen Produktion und des genetischen Fortschrittes eröffnet eine Vielzahl neuer Möglichkeiten. Viele Stoffe, wie auch Riboflavin, werden nicht mehr chemisch, sondern mithilfe von Mikroorganismen hergestellt (BASF, 1996). In diesem Fall hat sich das biologische Verfahren im Laufe der Zeit als das Effizientere von beiden herausgestellt. Dieses Beispiel veranschaulicht, dass zusätzlich zu den klassischen Methoden der *in vivo* und *in vitro* Verfahren, neue Ansätze gesucht werden um eine Produktionssteigerung zu erzielen. Eine weitere Optimierung der Produktion ist das immer fortwährende Ziel.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Theorie geprüft, ob eine gesteigerte Produktion durch die Nutzung der zelleigenen Strukturen zur Veränderung der Lage von Biosyntheseenzymen erreicht werden kann. Die meisten Strukturen, die sich in einer eukaryotischen Zelle befinden, sind biotechnologisch relevant. Organellen (hier besonders Mitochondrien, Vakuolen und Peroxisomen), Zellmembranen, das Zytoskelett und nicht zuletzt das Zytoplasma selbst bieten verschiedene Möglichkeiten die Position von Enzymen zu modellieren (Abbildung 4).

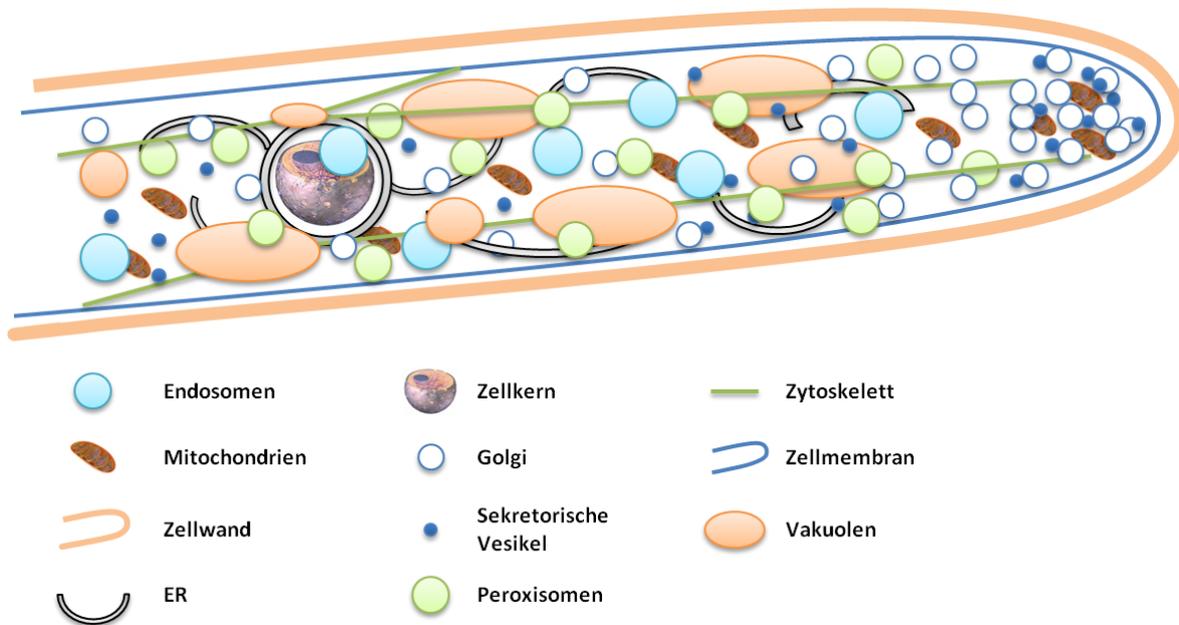


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Pilzhyphe. Gezeigt sind die subzellulären Strukturen in einer Pilzhyphe. Die Größe der einzelnen Bestandteile kann vom Schema abweichen. Auch die Anzahl der vorhandenen Strukturen ändert sich in einer Hyphe ständig. Nach (Steinberg & Schuster, 2011).

Die Kompartimentierung ist eines der Grundprinzipien einer eukaryotischen Zelle. Sehr vereinfacht ausgedrückt helfen die Kompartimente der Zelle Stoffwechselwege voneinander zu trennen. Zudem bieten sie die Möglichkeit, Enzyme eines Stoffwechselweges zu vereinen und dadurch eine neue Umgebung zu schaffen.

In dieser Arbeit wurden zwei Möglichkeiten untersucht, um die Lage von Biosyntheseenzymen zu verändern. Zum einen wurden Peroxisomen verwendet um alle Enzyme eines Stoffwechselweges in einem sehr kleinen Raum zu vereinen. Dadurch kann das neue Milieu oder auch die räumliche Nähe der Enzyme zu einer Steigerung der Produktion führen (Teil I). Zum anderen wurden Membranen und hier vor allem die Zytoplasmamembran als "biotechnologische Oberfläche" verwendet. Auf diese Weise werden Enzyme, die sich normalerweise in einem dreidimensionalen Raum bewegen auf einer Oberfläche vereint, in der sie sich nur noch zweidimensional bewegen können. Da die Enzyme ursprünglich im Zytoplasma vorlagen, verändert sich durch das Einfügen in die Zellmembran das Reaktionsmilieu nicht. Auch hier kann entweder die Veränderung der Lage der Enzyme selber oder eine Verringerung des Substratflusses eine Steigerung der Produktion erwirken.

Für die Analyse der beiden Methoden wurde für jeden Ansatz ein Stoffwechselprodukt gewählt, welches einfach zu detektieren ist und eine möglichst geringe Anzahl an Biosyntheseenzymen für seine Produktion benötigt. Zur Untersuchung der Kompartimentierung in Peroxisomen wurde Penicillin ausgesucht. Für die Lokalisation eines Stoffwechselweges in der Zellmembran wurde ein Stoff ausgesucht, bei dem alle Enzyme ursprünglich im Zytoplasma vorliegen (Riboflavin).

Teil I: Steigerung der Penicillin-Produktion durch peroxisomale Lokalisation von AcvA

Einleitung

Um die Auswirkungen einer Kompartimentierung in Peroxisomen zu untersuchen, wurde für diese Arbeit Penicillin ausgewählt. Penicillin ist ein wichtiges Antibiotikum und seine Entdeckung stellt einen Meilenstein in der menschlichen Geschichte dar (Diggins, 1999). Viele bakterielle Infektionen, die bis dahin oft den Tod der Patienten zur Folge hatten oder sogar in Pandemien endeten, konnten mit Penicillin geheilt werden. Von der ersten Beschreibung der Inhibierung von Bakterienwachstum durch *Penicillium notatum* bis zu den ersten klinischen Studien und der Entschlüsselung der Wirkungsweise des Antibiotikums vergingen allerdings Jahrzehnte (Demain & Fang, 2000).

Entdeckung von Penicillin

Bereits 1870 erkannten Wissenschaftler, dass Mikroorganismen einen direkten Einfluss aufeinander haben. Fünfzig Jahre lang wurden Präparate aus Mikroorganismen für den Einsatz in der Medizin getestet. Allerdings zeigten die meisten dieser Präparate toxische Nebenwirkungen oder waren *in vivo* inaktiv (Demain & Fang, 2000). Das goldene Zeitalter der Antibiotika begann 1928 mit der Entdeckung von Penicillin durch Alexander Fleming (Fleming, 1929). Er machte die Entdeckung, dass *Penicillium notatum* das Wachstum des Bakteriums *Staphylococcus aureus* hemmt. Diese zufällige Entdeckung blieb fast 10 Jahre lang nur ein Kuriosum. 1939 gelang es Wissenschaftlern Penicillin zu extrahieren und zu reinigen (Demain & Fang, 2000). 1940 konnte die starke antibiotische Wirkung, sowie die gute Verträglichkeit für Säugetiere (Ratten) demonstriert werden (Clark, 1985). Am 12. Februar 1941 wurde der erste Patient mit Penicillin behandelt (ThomsonScientific, 2007). Damals waren die von *Penicillium* produzierten Mengen so gering, dass es ein Jahr dauerte um die benötigte Menge für klinische Studien zu produzieren (Florey, 1949). Im Jahr 1941 wurde das amerikanische Militär auf Penicillin aufmerksam nachdem Howard Walter Florey und Ernst Boris Chain in die USA gereist waren um dort Werbung für das Antibiotikum zu machen. Der Zweite Weltkrieg forderte zu dieser Zeit viele Todesopfer durch Infektionen. Im Jahr 1942 wurde mit der industriellen Penicillin-Produktion begonnen.

Ursprünglich wurde Penicillin in Oberflächenkulturen produziert, d.h. der produzierende Pilz bildete einen Film auf dem flüssigen Wachstumsmedium. Die Ausbeute durch diese Form der Anzucht waren allerdings sehr gering. Die Anzucht in flüssigen Schüttelkulturen unter Zugabe von "Corn-Steep-Liquor" (Maisquellwasser) und Laktose als Nährstoffquellen setzte sich in den darauffolgenden Jahren zunehmend durch. Intensivierte Stammsuche und genetische Selektion führte 1951 zur

Nutzung von *Penicillium chrysogenum* NRRL ("ARS Culture Collection"; <http://nrrel.ncaur.usda.gov>). Die ersten genetischen Studien konzentrierten sich auf das Herstellen von neuen, besseren, Stämmen und die Analyse ihrer Eigenschaften. So gelang es innerhalb von nur zwei Jahren die Penicillin-Produktion um das Hundertfache zu steigern. Im Jahr 1942 konnten bereits 60 µg/mL Penicillin mit Hilfe von *P. chrysogenum* hergestellt werden (Demain & Fang, 2000). Durch weitere genetische Veränderungen konnten zunächst 150 mg/mL, dann 330 mg/mL erreicht werden. Durch Kooperationen universitärer und industrieller Forschungseinrichtungen gelang es schließlich 1943 an der Universität von Wisconsin einen Stamm mit einer Produktion von 550 mg/mL Penicillin herzustellen (Demain & Fang, 2000). Der damals entwickelte Stamm ist der direkte Vorgänger von vielen der heutigen Industriestämme. Die "Wisconsin-Familie" der Überproduzenten konnte weiter optimiert werden und erzielte eine Ausbeute von bis zu 1800 mg/mL (Demain & Fang, 2000). Zuletzt konnte sich das Unternehmen DSM (Dutch State Mines/De Staats Mijnen) als weltgrößter Penicillinhersteller etablieren. Das Unternehmen mit Hauptsitz in Heerlen, Niederlande, besitzt im Rahmen von "Joint Ventures" Produktionsstandorte in China, wohingegen die Sandoz GmbH in Kundl (Österreich) heute den größten Produktionsstandort für Penicillin in der westlichen Welt betreibt. Die Produktionsmengen durch *P. chrysogenum* liegen mittlerweile bei über 70 g/L und die verwendeten Bioreaktoren sind bis zu 200 m³ groß (Sahm *et al.*, 2012).

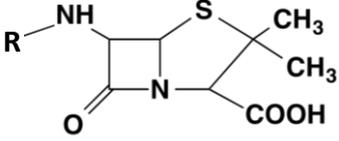
Wirkungsweise von Penicillin

Penicilline sind potente Inhibitoren der bakteriellen Zellwandsynthese (Park & Strominger, 1957). Ein wichtiger Schritt dieser Synthese ist eine Transpeptidierungsreaktion, die zur Vernetzung zweier glykangebundener Peptidketten führt um die Zellwand zu stabilisieren. Das dafür verantwortliche Enzym (D-Alanin-Transpeptidase) bindet irreversibel an das Grundgerüst der Penicilline, den beta-Laktam-Ring. Dieses und weitere Enzyme werden deshalb Penicillin-Bindeproteine (PBPs) genannt (Sauvage *et al.*, 2008; Tipper & Strominger, 1965). Die Zellwand wird weiterhin gebildet aber nicht mehr vernetzt. Der Antibiotikum-PBP-Komplex stimuliert zusätzlich die Freisetzung von Autolysinen, welche die bestehende Zellwand verdauen. Die Peptidoglykanschicht wird porös und die Zellen lysieren durch den hohen inneren Druck. Die Folge ist, dass sich die Bakterien nicht mehr teilen können und mit der Zeit absterben. Insbesondere betroffen sind davon Gram-positive Bakterien, da sie eine dicke Peptidoglykanschicht besitzen. Zudem kommt es im Zuge der fortlaufenden Zellwanderinger neuerung zu toxischen Abbauprodukten (Cho *et al.*, 2014).

Mikroorganismen können verschiedene Formen von Penicillin produzieren, die sich in der Struktur der Seitenketten (N-Acylrest) unterscheiden. Durch die sogenannte "Vorläufer-dirigierte Biosynthese" in der industriellen Penicillinproduktion entsteht üblicherweise ein Gemisch aus natürlichen und biosynthetischen Penicillinen. Hierfür werden synthetische Penicillinvorstufen der

Kultur beigefügt um neue Derivate entstehen zu lassen. Beispielsweise wurde durch die Zugabe von Phenoxyessigsäure zu Fermentationskulturen von *P. chrysogenum* das in der Natur nicht vorkommende Phenoxymethylpenicillin produziert.

Tabelle 3: Beispiele für natürliche, biosynthetische und semisynthetische Penicilline (Sahm *et al.*, 2012).

Penicilline	 Grundgerüst: 6-Aminopenicillinsäure	
	R	
natürliche Penicilline	Phenyl-CH ₂ -CO-	Penicillin G
	H ₃ C-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CO-	Penicillin F
	H ₃ C-(CH ₂) ₆ -CO-	Penicillin K
biosynthetische Penicilline	Phenyl-O-CH ₂ -CO-	Penicillin V
	CH ₂ =CH-CH ₂ -S-CH ₂ -CO-	Penicillin O
semisynthetische Penicilline	Phenyl-CH(NH ₂)-CO-	Ampicillin
	4-OH-Phenyl-CH(NH ₂)-CO-	Amoxicillin

Von den Penicillin-Biosyntheseproteinen wird allerdings nicht jede beliebige Vorläufer-Carbonsäure akzeptiert. Die Vielfalt an Variationen ist somit eingeschränkt. Zusätzlich existieren halbsynthetische (semisynthetische) Penicilline. Diese werden durch eine chemische Modifikation des Penicillin-Grundgerüsts (6-Aminopenicillinsäure) erzeugt. Hierzu wird erst ein Gemisch an natürlichen Penicillinen aus der Kulturbrühe isoliert und die unterschiedlichen N-Acyl-Seitenketten enzymatisch (Penicillin-Acylase; gewonnen aus *E. coli*) abgespalten. Die freie Aminogruppe kann nun chemisch mit neuen Acylsubstituenten umgesetzt werden (Sahm *et al.*, 2012) (Tabelle 3).

Eine Einteilung der Beta-Laktam-Antibiotika erfolgt danach, ob sie hydrophobe oder hydrophile Seitengruppen tragen. Als hydrophob bezeichnet man zum Beispiel Benzylpenicillin (Penicillin G) und Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V). Sie besitzen nicht-polare Seitengruppen, werden nur von filamentösen Pilzen hergestellt und ihr Wirkungsspektrum umfasst Gram-positive Bakterien. Als hydrophil werden unter anderem Penicillin N, Cephalosporin oder auch Cephamycine eingeteilt. Diese werden von filamentösen Pilzen, Aktinomyzeten und einzelligen Bakterien hergestellt. Alle hydrophilen beta-Laktame enthalten die polare Seitengruppe D- α -Aminoacidat (D-Aaa) (Ozcengiz & Demain, 2013). Da die natürlich vorkommenden Penicilline hauptsächlich auf Gram-positive Bakterien wirken, wird für Penicillin-Versuche der grampositive *Geobacillus stearothermophilus* als Indikator verwendet.

Penicillin Gen-Cluster

In Pilzen, wie auch in Bakterien, sind die Penicillin-Biosynthesegene *acvA*, *ipnA* und *aatA* direkt nebeneinander im Genom angeordnet (Aharonowitz *et al.*, 1992; Barredo *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu Bakterien werden sie in Pilzen allerdings einzeln transkribiert. Die Gene besitzen somit alle einen eigenen Promotor (Brakhage & Caruso, 2004). *AcvA* (AN2621) ist 11313 bp lang, 3'-5' orientiert und kodiert die ACV-Synthetase. *IpnA* (AN2622, 996 bp; Isopenicillin-N-Synthase) und *aatA* (AN2623, 1241 bp; Acyl-CoA:IPN-Acyltransferase) sind beide 5'-3' orientiert. Das Cluster liegt auf Chromosom IV (Cerqueira *et al.*, 2014). Um eine peroxisomale Lokalisation der Penicillin-Biosynthese-Enzyme zu erreichen, wurden die entsprechenden Gene C-terminal mit der peroxisomalen Zielsequenz 1 (PTS1) markiert (Abbildung 5). Die Formation der Gene einer Biosynthese in einem Cluster hat sich in der Evolution als ökologischer Vorteil erwiesen (Martin & Liras, 1989). Jedoch ist das "clustern" von Genen den Pilzen als einzigen Eukaryoten vorbehalten.



Abbildung 5: Schematische Darstellung des Penicillin Gen-Clusters in *A. nidulans*. Es besteht aus drei Genen auf Chromosom IV: *acvA* (AN2621), *ipnA* (AN2622) und *aatA* (AN2623). Das größte Gen ist *acvA* mit 11313 Basenpaaren (bp), während *ipnA* 996 bp und *aatA* 1241 bp lang sind. Die peroxisomale Lokalisation der Enzyme *AcvA* und *IpnA* wurde durch eine C-terminale Markierung von *acvA* und *ipnA* mit dem peroxisomalen Zielsignal 1 (PTS1) erreicht. *AatA* befindet sich von Natur aus in Peroxisomen.

Wie schon erwähnt besitzen alle Gene der Penicillin-Biosynthese in *A. nidulans* ihren eigenen Promotor. Deletionsanalysen zeigten, dass zwischen den Genen *acvA* und *ipnA* mehrere *cis*-Elemente existieren. Zudem überlappen die Promotoren der beiden Gene physisch und verwenden dieselben *cis*-Elemente (Bergh *et al.*, 1996; Perez-Esteban *et al.*, 1993). Durch biochemische Versuche wie EMSA (electrophoretic mobility shift assay) wurde das Motiv TTAGTAA, das in der Promotorregion von *acvA* liegt, identifiziert. Dieses bildet die Bindestelle eines bis dato nicht bekannten Transkriptionsaktivators und ist notwendig für eine hohe Expression des Gens (Kosalkova *et al.*, 2000). Die Stärke der Promotoren aller Penicillin-Gene ist sehr unterschiedlich. Die Expression von *acvA* in *A. nidulans* ist viel schwächer als die von *ipnA*. Auch *aatA* hat eine niedrigere Expression als *ipnA* (Brakhage *et al.*, 1992; Litzka *et al.*, 1995).

Biosynthese von Penicillin

Um den weltweiten Verbrauch von Penicillin abdecken zu können, wurden im Jahr 2000 über 60.000 Tonnen produziert (Thykaer & Nielsen, 2003). 2003 erreichte der Markt für beta-Laktame ein Volumen von 15 Milliarden Dollar (Elander, 2003). Um diese enorme Menge an Penicillin produzieren zu können, beinhaltet der Fermentationsprozess im Normalfall drei vorab geschaltete Animpfphasen bevor der Produktionsprozess eingeleitet wird. Der Gehalt an gelöstem Stickstoff in der Kulturbrühe ist insbesondere zu Wachstumsspitzen ein kritischer Parameter, da es sich um einen hoch aeroben Prozess handelt. Während des Wachstums ist die Penicillin-Produktion gering. Sie steigt in der stationären Phase stark an und wird durch "Fed-Batch-Verfahren" hoch gehalten. Durch kontinuierliche Zuckerrückführung wird der pH-Wert reguliert. Dieser liegt zwischen 6,4 und 6,8 während der Fermentation. Weitere Parameter sind Temperatur, Kohlendioxid- und Ammonium-Gehalt. Um die Fermentation besser zu steuern, werden meist Seitenkettenvorläufer (Tabelle 3) der Nährlösung zugesetzt, sodass statt eines Gemisches nur ein erwünschtes Penicillin-Derivat produziert wird. Da Penicillin sekretiert wird, muss es später aus dem Medium extrahiert werden. Hierzu werden die Zellen filtriert und das Kulturfiltrat mit Amyl-, Butyl- oder Isobutylacetat angesäuert. Nach Anreicherung wird es im Lösungsmittel in einer alkalischen Lösung zurück extrahiert. Durch Zugabe von Kaliumacetat kann das Antibiotikum schließlich ausgefällt und als kristallines Kaliumsalz isoliert werden (Sahm *et al.*, 2012).

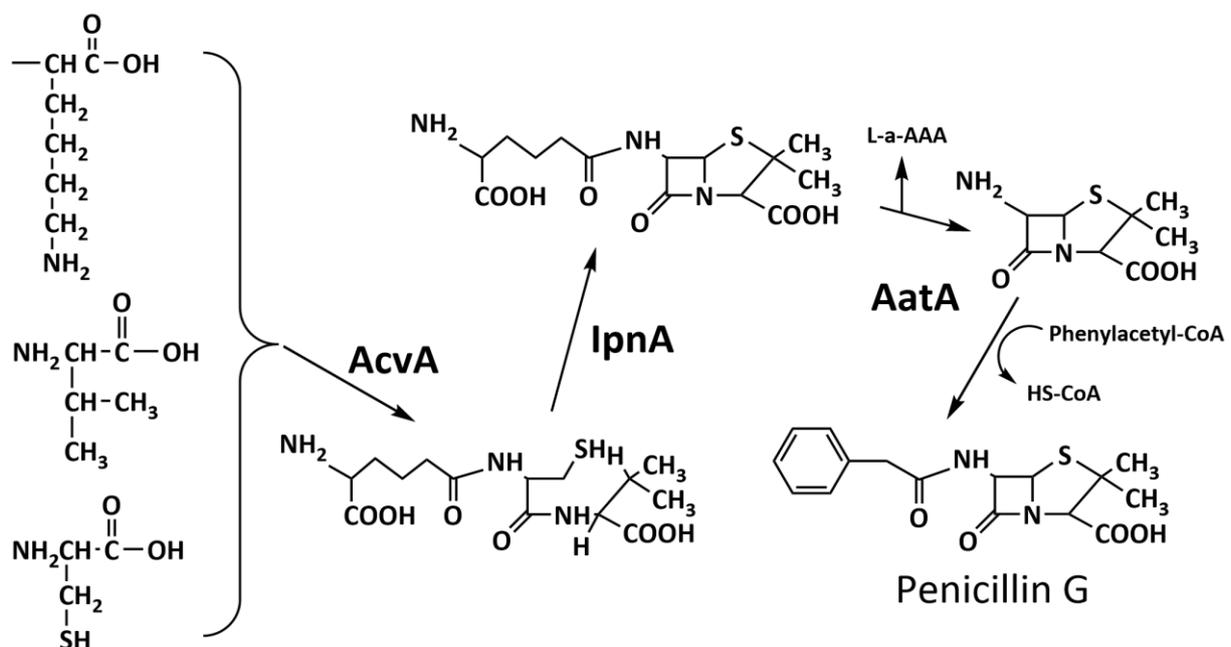


Abbildung 6: Die Biosynthese von Penicillin G in *A. nidulans*. Drei Enzyme sind für die Biosynthese von Penicillin notwendig. AcvA (ACV-Synthetase), eine NRPS ("Non-ribosomale Peptid Synthetase"), kondensiert die drei Aminosäuren L- α -Aminoadipinsäure, L-Cystein und D-Valin zu einem Tripeptid. Anschließend erfolgt ein oxidativer Ringschluss durch IpnA (Isopenicillin-N-Synthase). AatA ist eine bifunktionale Acyl-CoA:IPN-Acyltransferase, die letztendlich über die Zwischenstufe 6-Aminopenicillinsäure die Bildung von Penicillin G katalysiert (Brakhage *et al.*, 2004).

Auf molekularer Ebene sind drei Schritte für die Synthese von Penicillin notwendig. Der erste Schritt ist die nicht-ribosomale Kondensation der drei Aminosäuren L- α -Aminoadipinsäure, L-Cystein und L-Valin zu einem Tripeptid (ACV). L-Valin muss zuerst zu D-Valin epimerisiert werden. Beides wird durch die ACV-Synthetase (AcvA; nicht-ribosomale Peptidsynthetase) katalysiert (Arnstein & Morris, 1960; Kleinkauf & Von Dohren, 1996). Anschließend erfolgt ein oxidativer Ringschluss zum bicyklischen System. Dieser wird durch die Isopenicillin-N-Synthase (IpnA) katalysiert. Dabei entsteht ein viergliedriger beta-Laktamring, der mit einem fünfgliedrigen Thiazolidinring fusioniert ist (Fawcett *et al.*, 1975; Fawcett *et al.*, 1976; Konomi *et al.*, 1979; O'Sullivan *et al.*, 1979; White *et al.*, 1982). Dieser ist charakteristisch für alle Penicilline. Im letzten Schritt der Penicillin-Biosynthese wird die hydrophile Seitenkette des beta-Laktamrings gegen hydrophobe Acyl-CoA Derivate ausgetauscht, wie zum Beispiel gegen Phenylacetyl-CoA zur Produktion von Penicillin G. Dieser eigentlich aus zwei Teilschritten bestehende Prozess (Acyltransferreaktion) wird durch das bifunktionale Enzym Acyl-CoA:IPN-Acyltransferase mit der Zwischenstufe 6-Aminopenicillinsäure katalysiert (Abbildung 6) (Alvarez *et al.*, 1987; Alvarez *et al.*, 1993; Brakhage, 1998; Brunner *et al.*, 1968; Gatenbeck & Brunsberg, 1968; Luengo *et al.*, 1986; Pruess & Johnson, 1967; Spencer & Maung, 1970).

Peroxisom als "biotechnologisches Kompartiment"

Peroxisomen eignen sich sehr gut als "biotechnologische Kompartimente", denn sie sind morphologisch einfache Organellen, die von einer einzigen Membran umgeben sind. Sie kommen in allen Eukaryoten vor und besitzen keine eigene DNA (Girzalsky *et al.*, 2009; Heiland & Erdmann, 2005; Islinger *et al.*, 2010; Platta & Erdmann, 2007; Schrader & Fahimi, 2008). Peroxisomen besitzen eine Vielzahl von Funktionen abhängig von Art, Zelltyp, Umwelt- oder Entwicklungsbedingungen. Außerdem spielen sich einige Schritte des Primär- oder Sekundärmetabolismus in den Peroxisomen ab. Somit sind Ausgangsstoffe wie Aminosäuren, Koenzym A oder ATP, die für die Synthese von Sekundärmetaboliten wichtig sind, immer vorhanden (Stehlik *et al.*, 2014). Jedes Protein kann durch eine einfache Modifikation automatisch in die Peroxisomen transportiert werden. Dafür wird, wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, die peroxisomale Zielsequenz 1 (PTS1) an den C-Terminus des Proteins geheftet. Dadurch wird das Protein als peroxisomal erkannt. Dieses Tripeptid hat immer die Aminosäurekombination S/A/C-K/R/H-L/M (Gould *et al.*, 1989; Swinkels *et al.*, 1991). In *S. cerevisiae* wurde der Transport aus dem Zytoplasma ins Peroxisom weitgehend erforscht. Dort spielen die Pex ("peroxisome biogenesis") Proteine eine wichtige Rolle. Der im Zytoplasma vorhandene Rezeptor Pex5 erkennt Proteine mit PTS1 als für den Import ins Peroxisom markiert (Dammai & Subramani, 2001). Danach bindet der Rezeptor-Kargo-Komplex an den Docking-Komplex (Pex13, Pex14, Pex17) in der peroxisomalen Membran (Azevedo & Schliebs, 2006; Niederhoff *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2003; Schell-Steven *et al.*, 2005). Das Kargo wird in die Peroxisomenmatrix

entlassen und der Rezeptor wieder verwertet. Das geschieht mittels einer Pex8-abhängigen Translokation (Agne *et al.*, 2003) und einer Assoziation mit dem "RING-Finger-Komplex" (Pex2, Pex10, Pex12) (Platta *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2008). Pex5 wird anschließend durch Pex4 mono-ubiquitiniert, das durch Pex22 an die Membran gebunden ist (Williams *et al.*, 2007). Um einen erneuten Import zu ermöglichen verhelfen Pex1 und Pex6, die durch Pex15 in der peroxisomalen Membran verankert sind, Pex5 dazu wieder in das Zytoplasma zu gelangen (Miyata & Fujiki, 2005; Platta *et al.*, 2005). Zusammengefasst in (Hasan *et al.*, 2013; Wolf *et al.*, 2010) (Abbildung 7). Der Importmechanismus unterscheidet sich von dem anderer Organellen, da auch vollständig gefaltete und oligomere Proteine in das Peroxisom hinein transportiert werden können (Glover *et al.*, 1994; McNew & Goodman, 1994; Walton *et al.*, 1995).

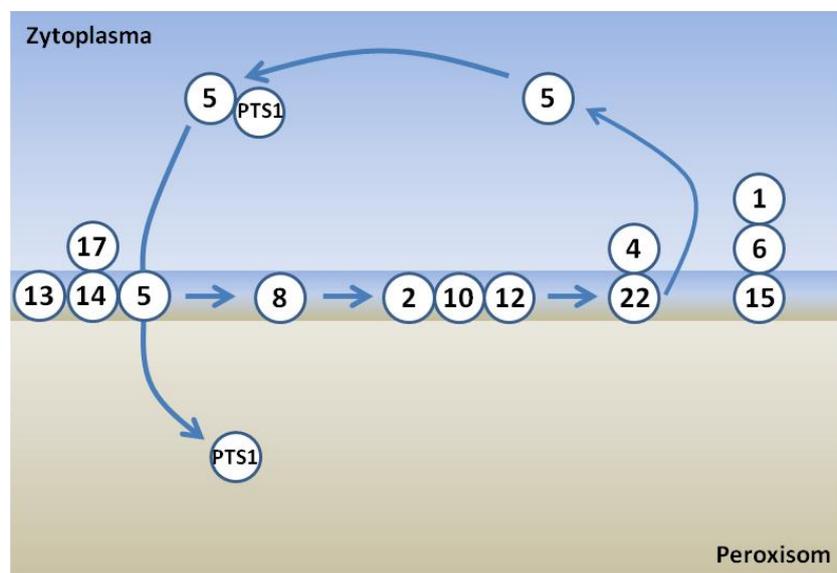


Abbildung 7: Komponenten der peroxisomalen Importmaschinerie in *S. cerevisiae*. Der PTS1-Rezeptor Pex5 erkennt das Zielprotein im Zytoplasma und bindet an Pex14, ein Protein des Docking-Komplexes (Pex13, Pex14 und Pex17), der in der peroxisomalen Membran sitzt. Danach wird das Kargo in die Peroxisomenmatrix entlassen und Pex5 wieder verwertet. Das geschieht durch eine Translokation mit Hilfe von Pex8 und dem RING-Finger-Komplex, bestehend aus Pex2, Pex10 und Pex12. Der anschließenden Mono-Ubiquitinierung durch Pex4 folgt die Entlassung von Pex5 durch Pex1 und Pex6 wieder zurück in das Zytoplasma. Pex22 verankert Pex4 und Pex15 verankert Pex1 und Pex6 in der peroxisomalen Membran. Modifiziert nach (Wolf *et al.*, 2010). Gezeigt sind die in dieser Arbeit relevanten PTS1-Importkomponenten.

Der pH-Wert von Peroxisomen unterscheidet sich je nach Organismus und Zelltyp. In humanen Fibroblasten beträgt der pH-Wert im Inneren der Peroxisomen beispielsweise $8,2 \pm 0,3$ (Dansen *et al.*, 2000). In *S. cerevisiae* hingegen beträgt der pH-Wert 7,1 (Nicolay *et al.*, 1987). In allen Fällen entsteht aufgrund der in den Peroxisomen ablaufenden β -Oxidation Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dieses wird mit Hilfe von Katalasen abgebaut (Poirier *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wird meist ein sehr hoher pH-Wert für Peroxisomen angenommen. Dem muss allerdings so nicht sein, sodass auch nicht-peroxisomale Enzyme in diesem Milieu aktiv sein können.

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es neue Wege zur Optimierung von Biosynthesewegen zu finden. Die Kompartimente einer Zelle bilden eine interessante Alternative gegenüber klassischen Verfahren wie Überexpression und ungerichteter Mutagenese, indem sie zusätzlich die Diffusion von Intermediaten verringern und dadurch die lokale Enzymkonzentration erhöhen (Stehlik *et al.*, 2014). Viele Parameter, die die Biosynthese von Penicillin beeinflussen können, sind bereits erforscht worden. Dazu gehören die Kohlenstoffquelle, die Stickstoffquelle, die Interaktion mit anderen Organismen, der pH-Wert sowie das Licht und die dazu gehörenden regulatorischen Einheiten (Atoui *et al.*, 2010; Brakhage, 2013; Kato *et al.*, 2003; Litzka *et al.*, 1999; Nutzmann *et al.*, 2011; Nutzmann *et al.*, 2013; Ozcengiz & Demain, 2013). Ein Abbau toxischer Intermediate durch Glyoxylase I und II übte in Versuchen einen positiven Einfluss auf die Penicillin-Produktion aus (Scheckhuber *et al.*, 2013). Trotz weitreichender Kenntnisse auf dem Gebiet der Transkription und der epigenetischen Kontrolle des Penicillin-Biosynthese-Clusters gibt es bislang wenige Ergebnisse darüber, ob die Kompartimentierung der Biosyntheseenzyme einen Einfluss auf die Transkription der kodierenden Enzyme hat (Roze *et al.*, 2011; van de Kamp *et al.*, 1999). Die Penicillin-Biosynthese beginnt im Zytoplasma und endet in den Peroxisomen (Garcia-Estrada *et al.*, 2008; Meijer *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 1992; Sprote *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurden Peroxisomen für diese Arbeit ausgewählt, mit dem Ziel alle Enzyme der Penicillin-Biosynthese auf engem Raum zu vereinen und den Substratfluss damit so gering wie möglich zu halten. Die Verlagerung von Enzymen in einen kleineren dreidimensionalen Raum (Peroxisom) wurde dabei mittels C-terminaler Markierung der Gene mit einem peroxisomalen Zielsignal (PTS1) untersucht.

Ergebnisse

In diesem Kapitel wurde die Produktionssteigerung durch Kompartimentierung mittels Verlagerung der Penicillin-Biosyntheseenzyme aus dem Zytoplasma in die Peroxisomen untersucht. Dazu wurde als erstes eine Messung für das produzierte Penicillin etabliert (nach (Brakhage *et al.*, 1992)). Durch dieses Verfahren konnte die Überexpression der Penicillin-Gene einzeln oder in Kombination mit peroxisomaler Lokalisation und höherer Peroxisomenzahl auf ihre Penicillin-Produktion überprüft werden.

Untersuchung der Bildung von Penicillin in *A. nidulans*

Um die Menge an produziertem Penicillin in gentechnisch veränderten Stämmen und dem Wildtyp von *A. nidulans* messen zu können, wurden die Kulturen zwei Tage bei 26°C in PPM (Penicillin-Produktionsmedium) mit 200 rpm schüttelnd inkubiert (Brakhage *et al.*, 1992). Zur Induktion des *alcA*-Promotors wurde dem Medium Threonin zugesetzt, welches als Induktor dient. Nach der Ernte der Proben wurde die Trockenmasse des Myzels gemessen und der Überstand für Hemmhofversuche mit *Geobacillus stearothermophilus* als Indikatororganismus verwendet um die Penicillin-Konzentration mit Hilfe einer Standardkurve zu ermitteln.

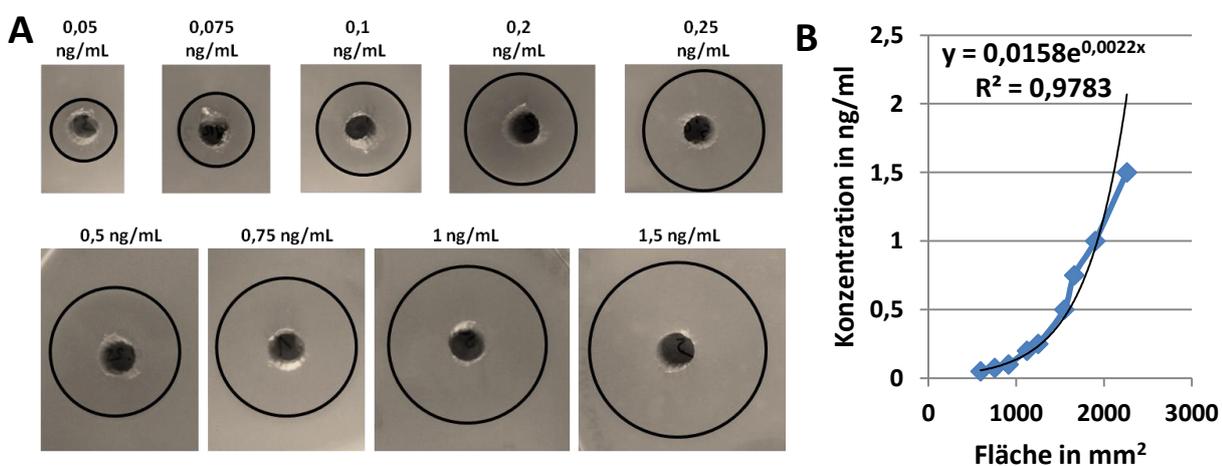


Abbildung 8: Bioassay zur Bestimmung von Penicillin-Konzentrationen. (A) Hemmhöfe einer Testreihe für die Ermittlung der Penicillin-Standardkurve. Verschiedene Konzentrationen Penicillin wurden in gleicher Weise wie die Proben der getesteten Stämme mit *Geobacillus stearothermophilus* als Indikatororganismus gemessen und die Durchmesser der Hemmhöfe notiert. (B) Zur Erstellung der Standardkurve wurden die Flächen der Hemmhöfe in Millimetern den bekannten Penicillin-Konzentrationen gegenübergestellt. Dadurch ergab sich eine Formel, mit der die Penicillin-Konzentration der Proben ermittelt werden konnte.

Um die Standardkurve zu erstellen, wurde für neun verschiedene Penicillin-Konzentrationen (0,05 - 1,5 ng/mL) ein Hemmhofversuch durchgeführt (Abbildung 8A). Hierzu wurde der Durchmesser der Hemmhöfe in fünf voneinander unabhängigen Versuchen für die jeweils bekannten Penicillin-Konzentrationen gemessen, die Fläche errechnet und der Mittelwert daraus gebildet. Dieser ergab zusammen mit den jeweiligen Konzentrationen die abgebildete Standardkurve (Abbildung 8B). Die

sich daraus ergebende Formel wurde anschließend zur Berechnung der Penicillin-Konzentrationen mittels Hemmhofstest verwendet.

Für jede Penicillin-Messung wurden je zwei technische Replikate angefertigt. Die Hemmhofdurchmesser wurden ermittelt und der Wert durch die Trockenmasse des Myzels geteilt. Dadurch wurden mögliche Schwankungen der Wachstumsgeschwindigkeiten der Stämme berücksichtigt. Um die Konzentration zu errechnen, wurde dieser Wert in die Standardkurve eingesetzt und der Mittelwert der zwei Replikate berechnet. Bei jeder Messung diente der Wildtyp-Stamm SJR2 als Kontrolle. Somit konnte die prozentuale Produktion im Vergleich zum Wildtyp für jede Messung errechnet werden. Alle Stämme in dieser Arbeit, die zur Penicillin-Produktion verwendet wurden, existieren in drei biologischen Replikaten aus unabhängigen Transformationen. Die Mittelwerte aller Messungen der Replikate (siehe Tabelle 9, Material und Methoden) wurden gezeigt. Für jedes Experiment wurde erfolgreich ein Penicillinase-Versuch durchgeführt. Penicillinase spaltet Penicillin, sodass es seine Wirkung verliert. Da nach Zugabe von Penicillinase keine Hemmhöfe zu erkennen waren, konnte ein entstandener Hemmhof nur durch Penicillin ausgelöst werden.

Lokalisation von AcvA in Peroxisomen erhöht die Penicillin-Produktion

Die drei Enzyme AcvA, IpnA und AatA sind die Hauptkomponenten der Penicillin-Produktion in *A. nidulans*. AatA, das letzte Enzym des Biosynthesewegs (Abbildung 5 und Abbildung 6), ist ein peroxisomales Enzym. Nach der aufgestellten Theorie sollte die Verlagerung eines der anderen beiden Enzyme aus dem Zytoplasma in die Peroxisomen eine Produktionssteigerung bewirken. Zuerst wurde diese Hypothese mit dem ersten Enzym der Synthese (AcvA) überprüft. Um die Verlagerung von AcvA aus dem Zytoplasma in die Peroxisomen zu bewirken wurde eine peroxisomale Zielsequenz (PTS1) an das Protein fusioniert (pAH04) und die endogene Kopie von *acvA* in dem Stamm SJR2 durch die fusionierte Version ausgetauscht (SAH07) (Abbildung 9A). Der Stamm SJR2 wurde verwendet da er das *veA* Wildtypallel enthält und *veA* ein bedeutender Bestandteil der Regulation der Penicillin-Produktion und anderer Sekundärmetabolite ist (Calvo, 2008; Kato *et al.*, 2003). Die homologe Integration des Konstruktes wurde mittels diagnostischer PCR nachgewiesen und die korrekte Sequenz von PTS1 durch eine Sequenzierung im Anschluss überprüft. Als Alternative zum Austausch des Gens wurde die PTS1-Sequenz an ein 1kb Fragment des 3'-Endes von *acvA* fusioniert (Abbildung 9B). Auch hier wurde die homologe Integration sowie die Sequenz überprüft. Dieses Konstrukt wurde in SJR2 transformiert und ergab den Stamm SAH14. Integration des Konstrukts führt zu einer Verdoppelung des 1 kb Fragments, einer Expression der PTS1-markierten Version des Gens mittels

des natürlichen Promotors und keiner Expression der unvollständigen Version wenn der Stamm auf Glukose angezüchtet wurde. Induktion mit Threonin führte zur Produktion einer inaktiven Form.

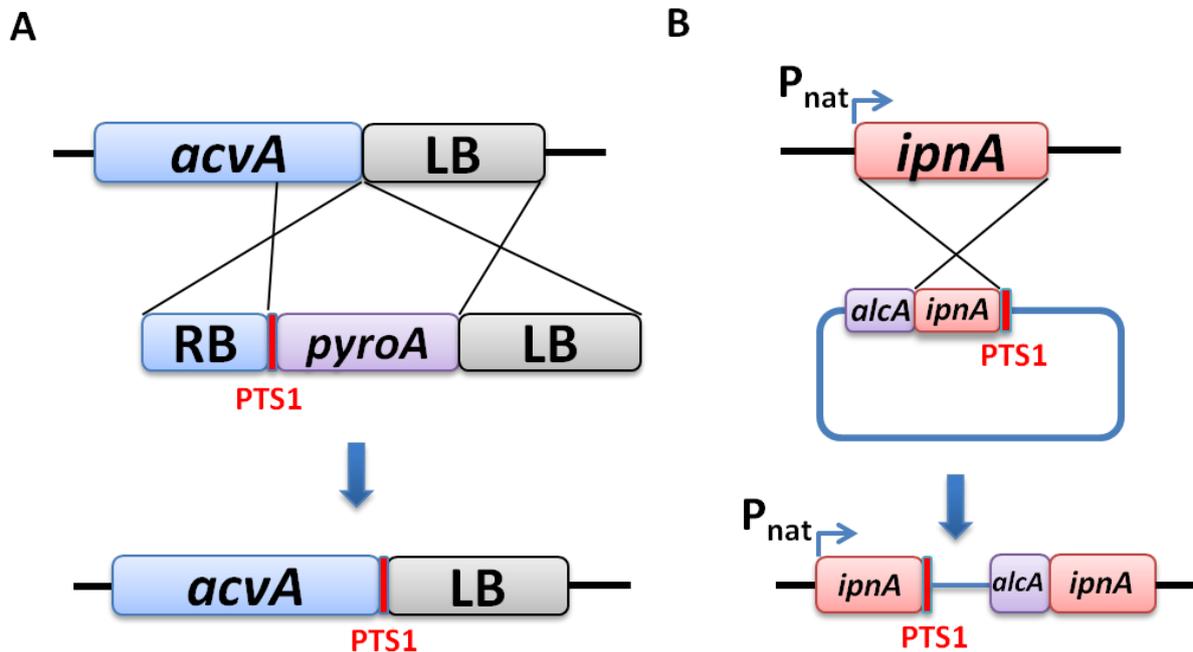


Abbildung 9: Strategien für die peroxisomale Lokalisation von AcvA und IpnA. Es wurden entweder (A) Fusions-Konstrukte oder (B) zirkuläre Plasmide verwendet, um Gene mit PTS1 zu markieren. In beiden Fällen bleiben die Gene unter der Kontrolle des natürlichen Promotors. Wenn *acvA* mittels eines zirkulären Plasmids markiert wurde, blieb nur eine unvollständige Version des Gens unter der Kontrolle des *alCA*-Promotors übrig. Diese hatte keine Funktion. Im Fall von *ipnA* war eine zusätzliche Kopie des Gens unter der Kontrolle des *alCA*-Promotors vorhanden.

Die beiden beschriebenen Stämme SAH07 und SAH14 zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede der Penicillin-Produktion, aber eine 3,2-fach höhere Produktion verglichen mit dem Wildtyp.

Um zu überprüfen, ob die Verlagerung von IpnA in die Peroxisomen eine Steigerung der Penicillin-Produktion bewirkt, wurde, wie bei AcvA, eine PTS1-Sequenz C-terminal an *ipnA* fusioniert (SAH06). Die entstandenen Stämme produzierten kein Penicillin. Der gleiche Effekt war zu erkennen, wenn alle drei Enzyme der Penicillin-Biosynthese in den Peroxisomen vereint waren (SAH38) (Abbildung 10B). Wenn jedoch IpnA zusätzlich im Zytoplasma vorhanden war (*A. nidulans* SAH08) wurde eine 4-fach erhöhte Penicillin-Produktion im Vergleich zum Wildtyp festgestellt.

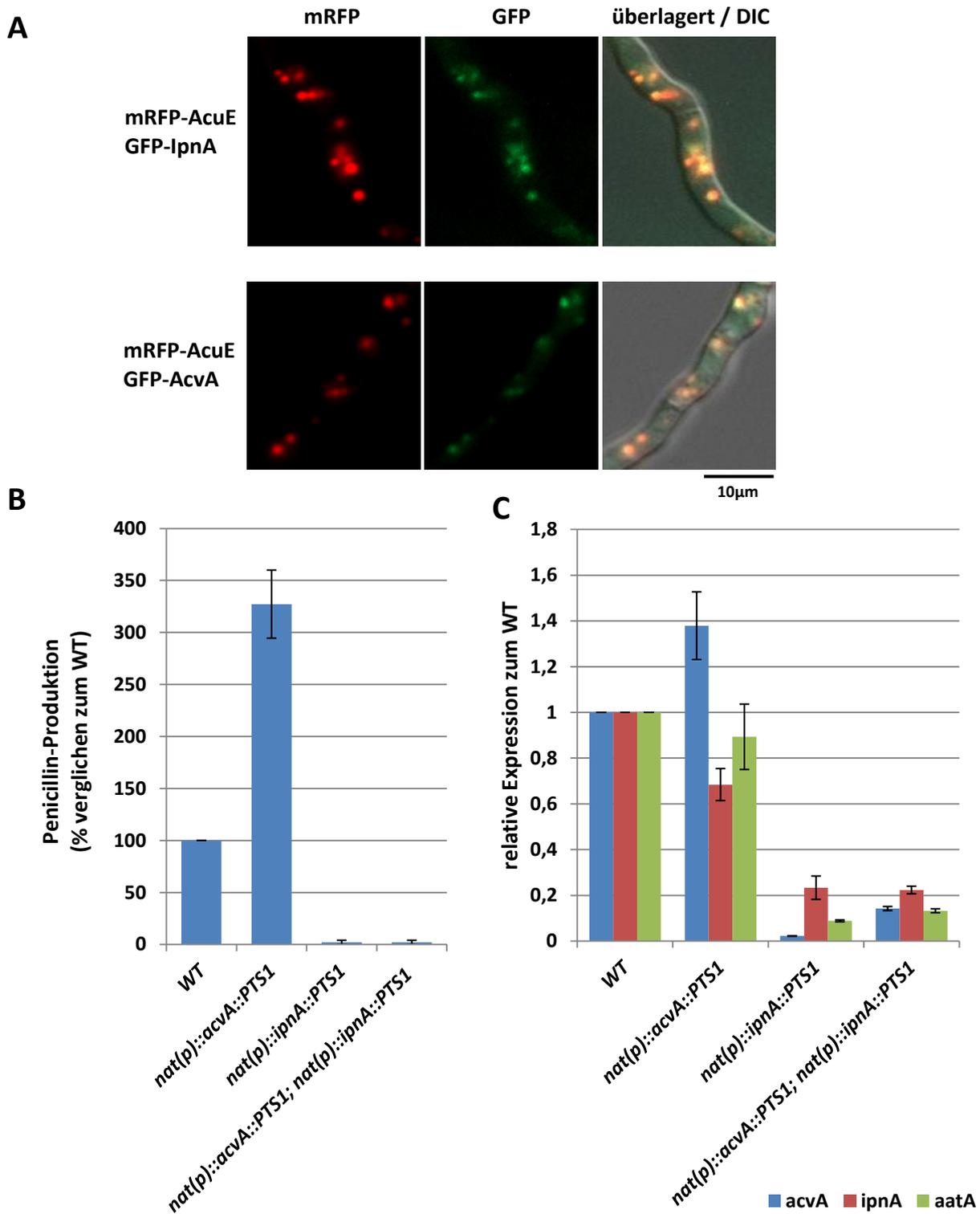


Abbildung 10: Die Lokalisation von AcvA in Peroxisomen führt zu einer gesteigerten Penicillin-Produktion. (A) Die Menge des produzierten Penicillins wurde nach 48 Stunden Wachstum in PPM detektiert. Gezeigt sind die Durchschnitte der drei biologischen Replikate jedes Stammes und die Standard-Abweichung. Folgende Stämme wurden verglichen: WT (SJR2), mit PTS1 markiertes AcvA (SAH07 und SAH14), mit PTS1 markiertes IpnA (SAH06) und die Kombination der beiden (SAH38). (B) Kolokalisation von AcvA und IpnA mit AcuE. AcvA oder IpnA wurde mit GFP markiert, AcuE mit mRFP. Die Stämme wurden auf Objektträgern bei 28°C über Nacht inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Alle Gene wurden mit Hilfe des *alcA*-Promotors exprimiert. (C) Real-Time Analyse der in (B) beschriebenen Stämme unter Produktionsbedingungen. Gemessen wurde die Expression der Gene *acvA*, *ipnA* und *aatA* nach 48 Stunden Inkubation in PPM, Ernte der Proben wie im Penicillin-Assay beschrieben und Isolation der RNA. Die Expression ist im Verhältnis zu jener im WT (Wert auf 1 gesetzt) dargestellt. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei biologischen und jeweils zwei technischen Replikaten sind dargestellt.

Um die peroxisomale Lokalisation der Enzyme zu bestätigen, wurden Koloalisationsstudien mit der Acetat-Malat-Synthase *AcuE* durchgeführt. *AcuE* ist ein peroxisomales Protein und ein gut etablierter Marker für Peroxisome (Sandeman *et al.*, 1991; Zekert *et al.*, 2010).

Um *AcvA* mit GFP zu markieren und es unter die Kontrolle des *alcA*-Promotors zu stellen, wurde ein 1 kb Fragment des 5'-Endes von *acvA* in das Plasmid pMCB17apx eingefügt (pAH21). Die homologe Integration des Konstrukts in *A. nidulans* hatte zur Folge, dass das 1 kb Fragment verdoppelt wurde und der komplette offene Leserahmen von GFP markiertem *AcvA*-PTS1 unter der Kontrolle des endogenen Promotors war. Das Plasmid pAH21 wurde zusammen mit pYZ12 (*AcuE*-mRFP) in SAH14 transformiert. Der daraus entstandene Stamm wurde SAH34 genannt. Auf die gleiche Weise wurde *IpnA* mit GFP markiert (pAH27) und in SJR2 transformiert (SAH23). In diesen Stamm wurde wiederum pYZ12 transformiert (SAH33). Die korrekte Expression von GFP und mRFP wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. *A. nidulans* SAH33 (*AcuE*-mRFP, *IpnA*-GFP) wie *A. nidulans* SAH34 (*AcuE*-mRFP, *AcvA*-GFP) zeigten eine nahezu 100%ige Koloalisierung von *IpnA* und *AcvA* mit *AcuE* (Abbildung 10A).

Die Auswirkungen auf die Expression der Gene wurde mittels Real Time PCR ermittelt. Es war zu erkennen, dass die Penicillin-Gene *acvA*, *ipnA* und *aatA* in SAH07 / SAH14 (*acvA* und *aatA* im Peroxisom) etwa gleich exprimiert waren wie in SJR2 (Wildtyp). Im Vergleich zum Wildtyp hatte *acvA* eine etwa 1,4-fach höhere Expression, *ipnA* war 0,7-fach höher exprimiert und *aatA* 0,9-fach höher exprimiert. Bei den Stämmen SAH06 (*ipnA* und *aatA* im Peroxisom) und SAH38 (*acvA*, *ipnA* und *aatA* im Peroxisom) war eine stark verminderte Expression der Gene im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. *AcvA* wurde in SAH06 0,02-fach niedriger als im Wildtyp exprimiert. Die Gene *ipnA* und *aatA* in SAH06, sowie alle drei Gene in SAH38 hatten eine fünf- bis zehnfach niedrigere Expression (Abbildung 10C).

Steigerung der Peroxisomenzahl in *A. nidulans* erhöht die Penicillin-Produktion und die Wachstumsrate

Die Lokalisation von AcvA in den Peroxisomen erhöht die Penicillin-Produktion in *A. nidulans*. In früheren Arbeiten wurde zudem gezeigt, dass eine erhöhte Anzahl an Peroxisomen durch Überexpression von peroxisomalem *pexK* in *P. chrysogenum* die Penicillin-Produktion erhöhte (Kiel *et al.*, 2005). Deshalb wurde untersucht, ob ein solcher Effekt auch in *A. nidulans* erkennbar ist.

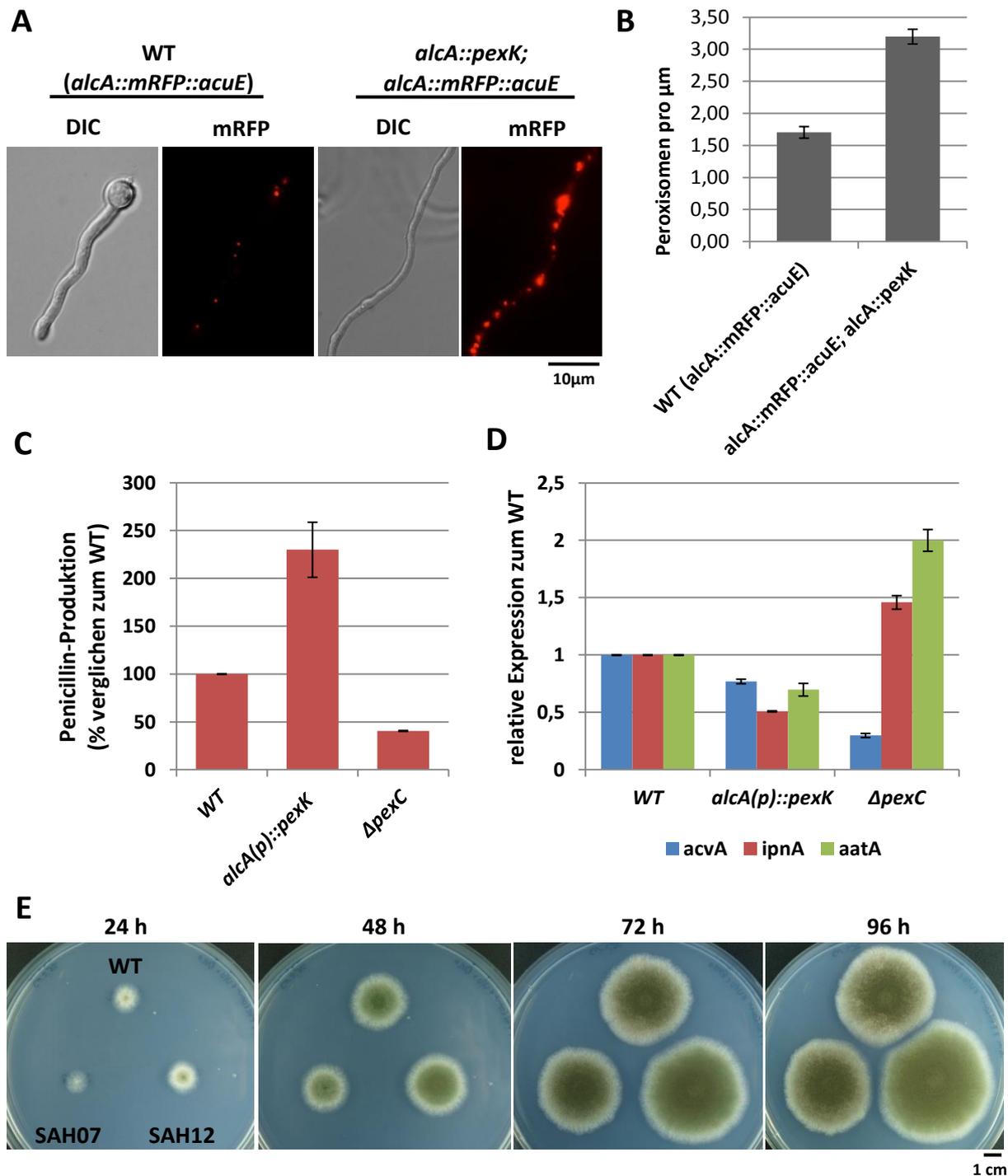


Abbildung 11: Eine Steigerung der Peroxisomenzahl hat einen positiven Einfluss auf die Penicillin-Produktion und die Wachstumsrate. (A,B) Visualisierung von Peroxisomen mittels mRFP markiertem AcvE im Wildtyp (SAH10) und einem Stamm mit überexprimiertem *pexK* (SAH11). (A) Die Stämme wurden bei 28°C über Nacht in Mikroskopiemedium mit Threonin kultiviert um den *alcA*-Promotor zu induzieren. (B) Quantifizierung der Peroxisomen pro µm Hyphenlänge. Die

Anzahl der gezählten Peroxisomen wurde durch die Länge der Hyphe in μm geteilt. Dargestellt ist der Mittelwert von 50 Hypphen und die Standardabweichung. (C) Messung der Penicillin-Produktion nach 48 Stunden Wachstum in PPM. Gezeigt sind folgende Stämme: WT (SJR2 / TN02A3); SJR2 mit überexprimiertem *pexK*; TN02A3 mit deletiertem *pexC*. Für die Berechnung wurde der jeweils für die Transformation verwendete Wildtyp als Vergleich herangezogen. Jeder Balken stellt den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten dar. (D) Real-Time Analysen der Stämme SJR2, SAH12 und SAH03 unter Produktionsbedingungen. Die Expressionen der Gene *acvA*, *ipnA* und *aatA* wurde nach 48 Stunden Inkubation in PPM gemessen. Die Expression wurde ermittelt im Verhältnis zur jeweiligen Expression des Gens im WT (Wert auf 1 gesetzt). Die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei biologischen und jeweils zwei technischen Replikaten sind dargestellt. (E) Wachstum des Stammes SAH12 im Vergleich zum Wildtyp und zu SAH07 (*nat(p)::acvA::PTS1*) auf Minimalmedium mit Threonin bei 28°C über vier Tage. Nach jeweils 24 Stunden Wachstum wurde ein Bild gemacht.

Zur Bestimmung der Anzahl von Peroxisomen im Wildtyp wurde, wie zuvor beschrieben, AcuE (peroxisomale Acetat-Malat-Synthase) mit mRFP markiert und mit Hilfe des *alcA*-Promotors überexprimiert (*A. nidulans* SAH10). Die zusätzliche Überexpression von *pexK* fand ebenfalls unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors statt (*A. nidulans* SAH11). Auch hier wurden die Peroxisomen mittels mRFP markierter AcuE sichtbar gemacht (Abbildung 11A). Die Anzahl der Peroxisomen pro μm Hypphenlänge wurde mittels Fluoreszenzmikroskop bestimmt und ausgewertet. SAH11 (Überexpression von *pexK* und *mRFP::acuE*) besaß in etwa die doppelte Peroxisomenzahl pro μm Hyphe verglichen mit dem Kontrollstamm (Abbildung 11B). Die Penicillin-Produktion eines Stammes mit erhöhter Peroxisomenzahl (Transformation von pAH06 in SJR2; SAH12) war 2,3-fach höher verglichen mit dem Wildtyp. Interessant war außerdem die Penicillin-Produktion eines Stammes ohne Peroxisomen durch die Deletion von *pexC*, einem essentiellen Bestandteil der peroxisomalen Membran. Der Stamm SAH03 ($\Delta pexC$) produzierte 0,4 mal die Menge Penicillin wie der Kontrollstamm TN02A3. (Abbildung 11C).

In keinem der Stämme war die Expression der Penicillin-Gene direkt durch genetische Manipulationen beeinflusst worden. Ob es indirekte Auswirkungen auf die Expression gab, wurde mittels Real-Time PCR ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass SAH12 (Erhöhte Anzahl an Peroxisomen durch Überexpression von *pexK*) trotz höherer Penicillin-Produktion eine niedrigere Expression aller drei Gene (*acvA*, *ipnA* und *aatA*) zeigte (Abbildung 11D). Die Expression war bei *ipnA* am niedrigsten (0,5-fach im Vergleich zum Wildtyp), bei *acvA* und *aatA* etwa 0,7-fach im Vergleich zum Wildtyp. SAH03 (Stamm ohne Peroxisomen) zeigte eine doppelte so hohe Expression von *aatA*, eine 1,5-fache Expression von *ipnA*, jedoch eine nur 0,3-fache Expression von *acvA*.

Ein interessanter Nebeneffekt der Steigerung der Peroxisomenzahl war die Erhöhung der gemessenen Wachstumsrate. Nach 4 Tagen Wachstum auf Minimalmedium mit Threonin als Induktor bei 28°C ist eine Kolonie von SAH12 (6,5 cm im Durchmesser) etwa 1,3 mal so schnell gewachsen wie der Wildtyp (5 cm im Durchmesser) (Abbildung 11E). Im Gegensatz dazu wuchs eine Kolonie des Stammes SAH07 (*nat(p)::acvA::PTS1*) (4,5 cm im Durchmesser) etwas langsamer als der Wildtyp.

Überexpression der Penicillin-Gene erhöht die Penicillin-Produktion

Eine weitere Strategie um die Produktion von einem Sekundärmetaboliten zu steigern, ist das komplette regulatorische Gen-Cluster zu vervielfachen oder einzelne Gene aus dem Cluster überzuexprimieren. Manchmal führen auch Kombinationen aus den Strategien zu einer höheren Produktion (Weber *et al.*, 2012).

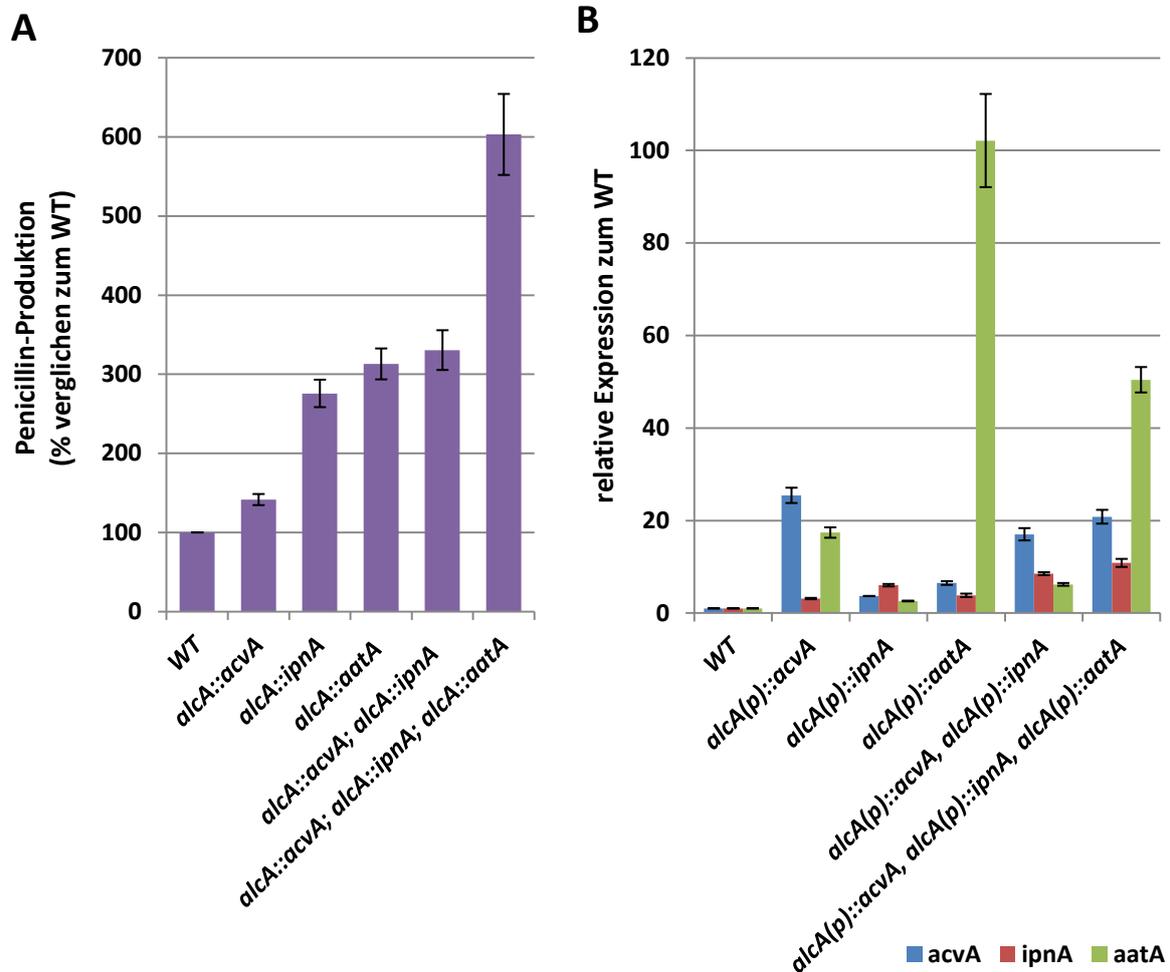


Abbildung 12: Effekt der Überexpression von Penicillin-Genen auf die Penicillin-Produktion. (A,B) Folgende Stämme wurden in Triplikaten verwendet: WT (SJR2), SAH16 (*alcA(p)::acvA*), SAH24 (*alcA(p)::ipnA*), SAH36 (*alcA(p)::aatA*), SAH25 (*alcA(p)::acvA* und *alcA(p)::ipnA*) und SAH28 (*alcA(p)::acvA* und *alcA(p)::ipnA* und *alcA(p)::aatA*). Die Stämme wurden für 48 Stunden bei 28°C in PPM inkubiert. Für die Induktion des *alcA*-Promotors wurde PPM mit Threonin verwendet. (A) Der Penicillin-Assay wurde wie beschrieben durchgeführt. (B) Real Time-Analysen unter Produktionsbedingungen. Die Expression der Gene *acvA*, *ipnA* und *aatA* wurde nach 48 Stunden Inkubation gemessen. Die Expression wurde im Verhältnis zur jeweiligen Expression des Gens im WT (Wert auf 1 gesetzt) ermittelt. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei biologischen und jeweils zwei technischen Replikaten sind dargestellt.

Für die Überexpression von *acvA* wurde ein 1 kb Fragment des 5'-Endes des Gens unter die Kontrolle des *alcA*-Promotors gestellt (*A. nidulans* SAH16). Die homologe Integration, die notwendig war damit das komplette *acvA*-Gen überexprimiert wurde (siehe oben), wurde mittels PCR bestätigt. Der Stamm hatte eine 1,4-fache Penicillin-Produktion verglichen zum Wildtyp. Die Überexpression von

ipnA mit dem *alcA*-Promotor wurde ähnlich erreicht (*A. nidulans* SAH24). Dieser Stamm hatte eine 2,8-fach gesteigerte Penicillin-Produktion verglichen mit der des Wildtyps. Die Überexpression von *aatA* (*A. nidulans* SAH36) führte zu einer 3,1-fach höheren Penicillin-Produktion. Die Werte für *ipnA* und *aatA* sind vergleichbar mit früheren Berichten (Fernandez-Canon & Penalva, 1995).

Nach der Überexpression der einzelnen Gene wurde die Überexpression aus Kombinationen der Gene verglichen. Der Stamm SAH25 (Überexpression von *acvA* und *ipnA*) produzierte 3,3 mal mehr Penicillin als der Wildtyp (Abbildung 12A). Ein Stamm der alle drei Gene (*acvA*, *ipnA* und *aatA*) der Penicillin-Biosynthese überexprimiert (SAH28) produzierte 6 mal mehr Penicillin als der Wildtyp.

Da jeder der Stämme gezielt einzelne Gene oder Kombinationen daraus überexprimierte, wurde die Expression der Gene mittels Real-Time PCR bestimmt (Abbildung 12B). SAH16 (*alcA(p)::acvA*) hatte eine 25,4-fach höhere Expression von *acvA*, jedoch auch eine 17,3-fach höhere Expression von *aatA* und eine dreifach höhere Expression von *ipnA* als der Wildtyp. SAH24 (*alcA(p)::ipnA*) hatte eine 6-fach höhere Expression von *ipnA* verglichen zum Wildtyp, sowie eine 3,6-fache Expression von *acvA* und eine 2,6-fache Expression von *aatA* verglichen zum Wildtyp. SAH36 (*alcA(p)::aatA*) zeigte eine 102-fach höhere Expression von *aatA* als der Wildtyp. *AcvA* wurde 6,5-mal höher und *ipnA* 3,8 mal höher exprimiert im Vergleich zum Wildtyp. In SAH25 (*alcA(p)::acvA*, *alcA(p)::ipnA*) wurden die Gene *acvA* 17-fach und *ipnA* 8,5-fach höher exprimiert; *aatA* wurde 6-fach höher exprimiert verglichen mit dem Wildtyp. In SAH28, in dem alle drei Gene überexprimiert wurden, zeigte *acvA* eine 20,8-fach höhere Expression, *ipnA* eine 10,8-fache Expression und *aatA* wurde 50,4-mal höher exprimiert als im Wildtyp.

Kombination aus Überexpression und Veränderung der subzellularen Lage

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression und die Verlagerung von *acvA* in die Peroxisomen zu einer gesteigerten Penicillin-Produktion führte. Um zu überprüfen, ob die Kombination der beiden Strategien die Produktion zusätzlich steigern könnte, wurde das mit PTS1 markierte *acvA* mit dem *alcA*-Promotor überexprimiert.

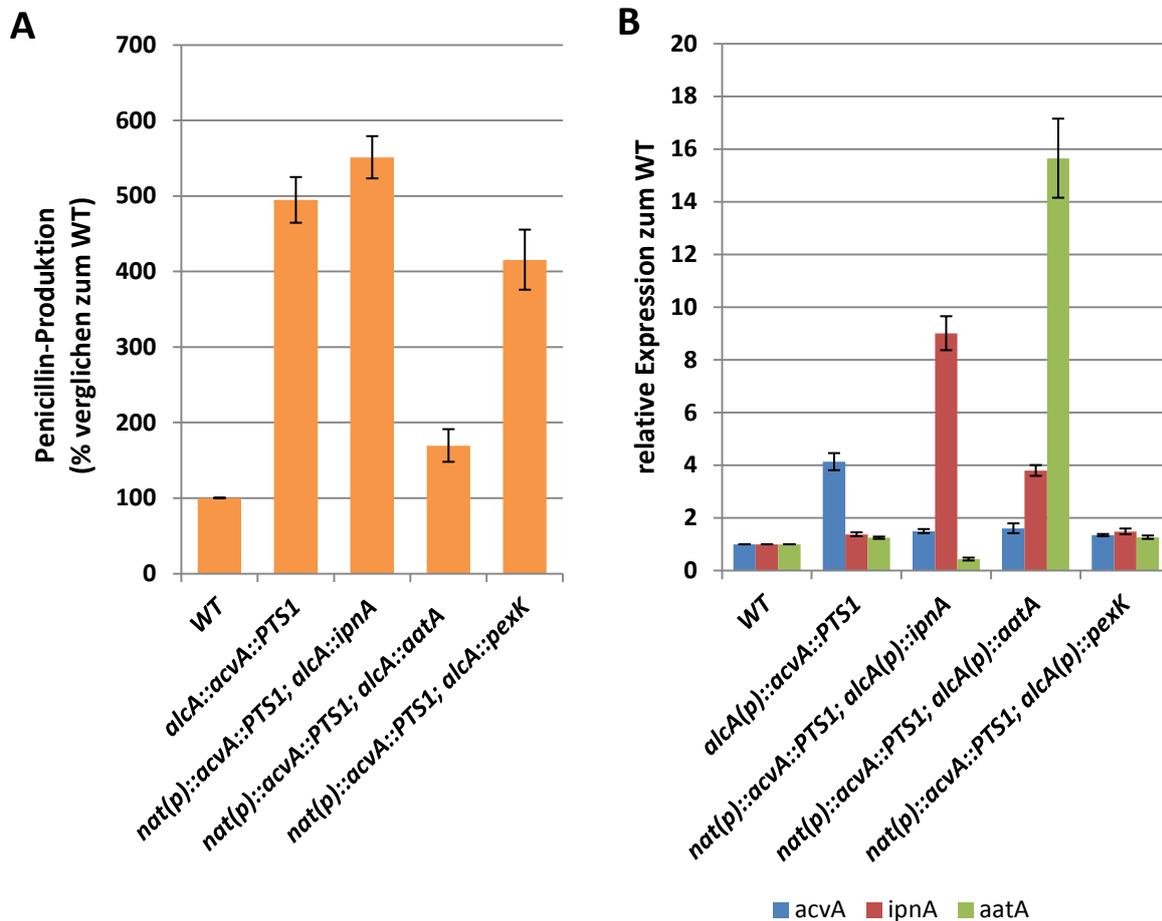


Abbildung 13: Effekt der Kombination aus Überexpression und Veränderung der subzellularen Lage der Enzyme auf die Penicillin-Produktion. (A,B) Folgende Stämme wurden verwendet: WT(SJR2), SAH37 (*alcA(p)::acvA::PTS1*), SAH19 und SAH31 (*nat(p)::acvA::PTS1* und *alcA(p)::ipnA*), SAH30 (*nat(p)::acvA::PTS1* und *alcA(p)::aatA*) und SAH13 und SAH21 (*alcA(p)::pexK* und *nat(p)::acvA::PTS1*). (A) Penicillin-Assay mit den beschriebenen Stämmen. Der Mittelwert aus je drei biologischen Replikaten wurde mit der Standardabweichung dargestellt. (D) Real-Time Analysen unter Produktionsbedingungen. Die Expression der Gene *acvA*, *ipnA* und *aatA* wurde nach 48 Stunden Inkubationszeit in PPM gemessen. Die Expression wurde ermittelt im Verhältnis zur jeweiligen Expression des Gens im WT (Wert auf 1 gesetzt). Die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei biologischen und jeweils zwei technischen Replikaten sind dargestellt.

Um das zu erreichen, wurde ein 1 kb Fragment des 5'-Endes von *acvA* amplifiziert und hinter den *alcA*-Promotor kloniert (pAH09). Dieses Konstrukt wurde in SAH14 transformiert, dem Stamm mit PTS1 markiertem *acvA*. Die homologe Integration am *acvA*-Lokus führte zu einer Verdopplung des 1 kb Fragments und zur Kontrolle des kompletten offenen Leserahmens mittels des *alcA*-Promotors. Der entstandene Stamm SAH37 hatte eine fast 5-fach höhere Penicillin-Produktion verglichen mit

dem Wildtyp, eine 3,4-fach höhere Produktion als Überexpression von *acvA* alleine und eine 1,6-fache Produktion im Vergleich zu dem Stamm mit *AcvA* in den Peroxisomen.

Als nächstes wurde die Kombination von *AcvA* in den Peroxisomen und überexprimiertem *ipnA* getestet (SAH19 und SAH31). Diese Stämme zeigten vergleichbare Werte und produzierten 5,5-mal mehr Penicillin verglichen mit dem Wildtyp (Abbildung 13A). Der Stamm SAH30 kombinierte die Verlagerung von *AcvA* in den Peroxisomen mit der Überexpression von *aatA*. Er produzierte 1,7-mal mehr Penicillin verglichen mit dem Wildtyp. Die Kombination aus einer Verlagerung von *AcvA* in die Peroxisomen und gleichzeitiger Erhöhung der Peroxisomenanzahl (SAH13, SAH21) führte zu einer 4,2-fach höheren Penicillin-Produktion im Vergleich zum Wildtyp.

Die erfolgreichen genetischen Manipulationen wurden mittels Real-Time PCR bestätigt (Abbildung 13B). In SAH37 (*alcA(p)::acvA::PTS1*) wurde *acvA* 4,1 mal höher, *ipnA* 1,3 mal höher und *aatA* 1,2-fach höher exprimiert als im Wildtyp. SAH31, in dem *ipnA* durch den *alcA*-Promotor reguliert wurde, zeigte eine 9-fache Expression von *ipnA*. *acvA* wurde 1,5-mal höher exprimiert als im Wildtyp. *AatA* zeigte nur eine 0,4-fache Expression. In SAH30 (*nat(p)::acvA::PTS1; alcA(p)::aatA*) wurde *aatA* 15,6-fach überexprimiert. *AcvA* wurde 1,6-fach und *ipnA* 3,8-fach höher exprimiert. In SAH21 (*nat(p)::acvA::PTS1; alcA(p)::pexK*), in dem eine Verlagerung von *acvA* in Kombination mit einer Erhöhten Peroxisomenanzahl vorlag, war bei allen drei Genen eine minimal höhere (1,2 - 1,4-fache) Expression als im Wildtyp zu erkennen.

Diskussion

Die Produktionssteigerung durch eine Verlagerung von Biosyntheseenzymen wurde in dieser Arbeit anhand von zwei Methoden *in vivo* untersucht. In diesem Teil sollte durch eine peroxisomale Lage der Enzyme der Penicillin-Biosynthese die Steigerung der Produktion von Penicillin erreicht werden. Eine zusätzliche Steigerung der Peroxisomenanzahl und Überexpressionen der Gene sollten den Effekt noch verstärken.

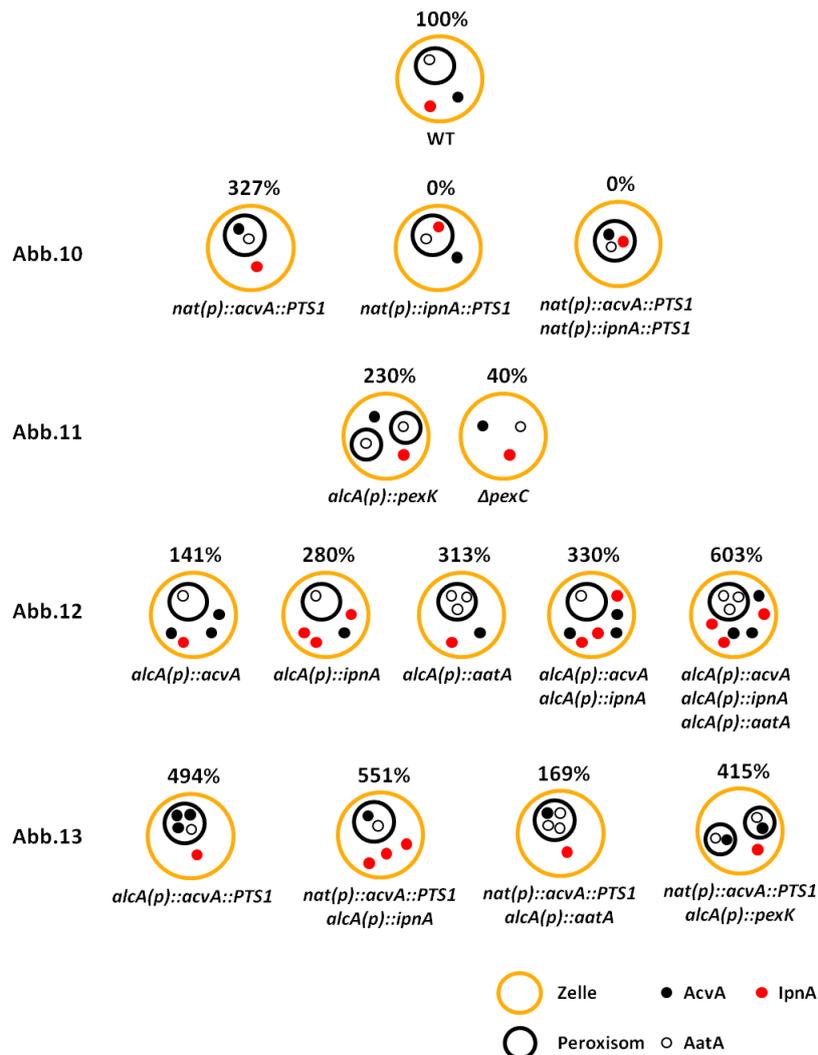


Abbildung 14: Zusammenfassung aller Penicillin-Produktionsmechanismen. Diese Übersicht stellt alle Ergebnisse der Abbildungen 10-13 gegenüber. Die Prozentzahl zeigt dabei die Penicillin-Produktion im Vergleich zum Wildtyp, wobei dieser auf 100% normiert wurde.

Die Überexpression von *pexK* führte zu einer doppelten Peroxisomenzahl, einem Anstieg der Wachstumsrate und einer 2,3-fachen Penicillin-Produktion. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Veröffentlichung zu *P. chrysogenum* überein, in der die Überexpression des Gens zu einer zweifachen Penicillin-Produktion führte (Kiel *et al.*, 2005). In Verbindung mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit kann angenommen werden, dass die Anzahl der Peroxisomen bei den verwendeten Bedingungen einen limitierenden Schritt der Penicillin-Biosynthese darstellt. Auf der anderen Seite konnte alleine

die Überproduktion von AatA die Penicillin-Produktion steigern (Fernandez-Canon & Penalva, 1995). Eine vergleichbare Situation liegt auch in industriellen Produktionsstämmen vor, in denen mehrere Penicillin Biosynthese-Cluster vorhanden sind (Weber *et al.*, 2012). Daher wäre es ein interessanter Punkt zu erfahren, ob die Anzahl der Peroxisomen in diesen industriell verwendeten Stämmen auch erhöht ist. Durch eine Deletion des Gens *pexC* fehlte ein essentieller Bestandteil in der peroxisomalen Membran, sodass keine Peroxisomen gebildet werden konnten. Die Wachstumsrate in diesem Stamm ist nur unwesentlich geringer als die des Wildtyps. Allerdings kommt es hier zu einer Reduktion der Sporenanzahl und zu einer Störung in der Kernverteilung von Hyphen (Herr, 2011). Ohne Peroxisomen konnte nur noch 40% des Penicillins produziert werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der Peroxisomen. Es kann vermutet werden, dass entweder *aatA* im Milieu des Zytoplasmas nicht seine vollständige Kapazität entfalten kann, oder die gesamten Abläufe des Organismus durch peroxisomale Stoffwechselwege, die nun im Zytoplasma ablaufen, gestört werden.

Die Verlagerung von IpnA in die Peroxisomen hatte einen kompletten Verlust der Penicillin-Produktion zur Folge. Es ist also anzunehmen, dass IpnA in den Peroxisomen nicht funktionsfähig ist. Aufgrund der Tatsache, dass die zwei Cysteinreste an Position 106 und 255 in einigen filamentösen Pilzen (Abbildung 15A) konserviert sind, kann angenommen werden, dass die dortigen Thiol-Gruppen funktionelle Aufgaben haben.

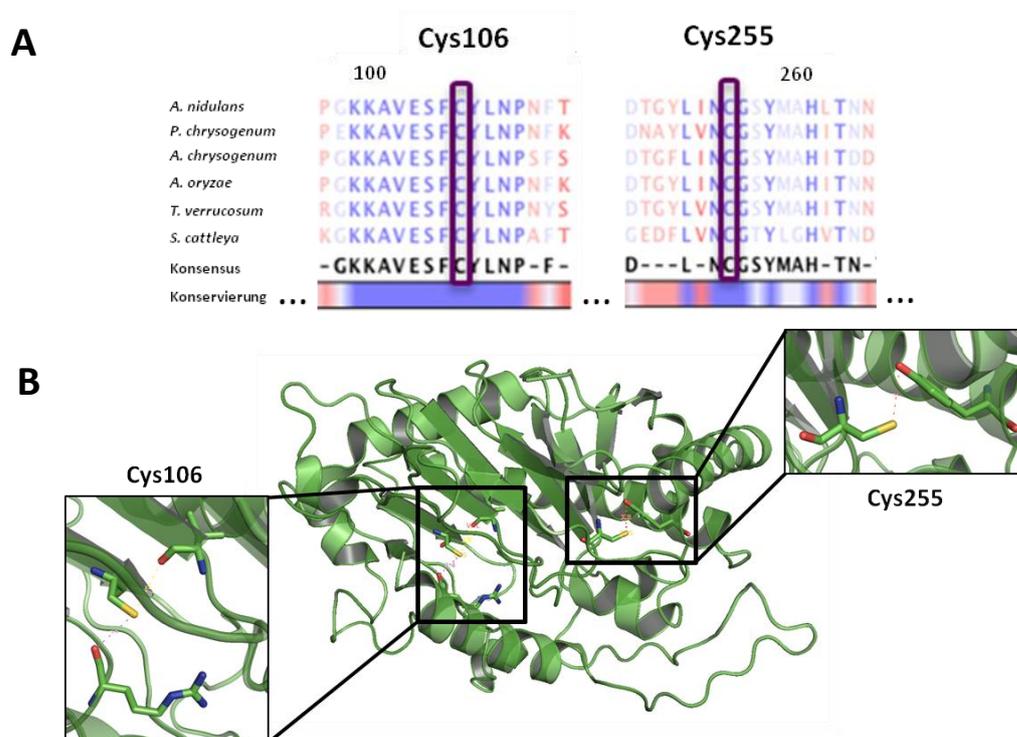


Abbildung 15: Strukturmodell der IPN-Synthase (IpnA) in *A. nidulans* und die stark konservierten Cysteine an Position 106 und 255. (A) Verglichen mit *A. nidulans* sind folgende Penicillin produzierende Pilze aufgeführt: *P. chrysogenum*, *A. chrysogenum*, *A. oryzae*, *T. verrucosum* und *S. cattleya*. Die Farbe rot zeigt dabei eine geringe Übereinstimmung und blau

eine hohe Übereinstimmung. (B) 3D-Modell des Enzyms IpnA. Hervorgehoben wurden die zwei vorhandenen Cysteine (gelb) und die Aminosäuren, mit denen sie eine Bindung eingehen. Die Grafik wurde mit dem Programm PyMol erstellt (Schrödinger, 2010). Die Struktur wurde entnommen aus der "Protein Data Bank" (PDB 1IPS).

Gezielte Mutagenese konnte die große Bedeutung dieser Cysteinreste beweisen. Im Falle einer Mutagenese des Cysteinrests an Position 106 fiel die Aktivität des Enzyms um das 20-fache ab (Samson *et al.*, 1985). In einer 3D-Analyse des Proteins ist zu erkennen, dass die Cysteinreste innerhalb des Proteins liegen und dort eine wichtige Rolle für die Stabilität des Proteins spielen. Folglich würde eine Mutagenese an dieser Stelle eine Strukturveränderung nach sich ziehen (Abbildung 15B). Aufgrund der Tatsache, dass an dieser Stelle allerdings eine eher geringe Aktivität gemessen wurde, kam man zu dem Schluss, dass die Thiol-Gruppen der Cysteinreste nicht essentiell für die Funktion des Proteins sind, allerdings trotzdem eine sehr wichtige Rolle spielen.

Die sich in Peroxisomen befindlichen Katalasen und Peroxidasen, sowie die dortigen Enzyme, welche an der beta-Oxidation von Fettsäuren und der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sind, könnten dafür verantwortlich sein, dass die SH-Gruppen im IpnA-Protein oxidiert werden und dadurch das Enzym deaktiviert wird. Zudem beinhaltet das IpnA-Enzym zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) als Kofaktor, welches ebenfalls durch Oxidation inaktiviert werden kann (Roach *et al.*, 1997). Alternativ oder zusätzlich dazu könnte die SH-Gruppe in dem Tripeptid, das durch die ACV-Synthetase (AcvA) hergestellt wird, in den Peroxisomen oxidiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das bis-ACV-Disulfid (oxidiertes Disulfid des Tripeptids) durch IpnA nicht weiter verstoffwechselt werden konnte (Aharonowitz *et al.*, 1993; Perry *et al.*, 1988; Roach *et al.*, 1997). Wenn bis-ACV wirklich in den Peroxisomen gebildet wird und nicht als Substrat für IpnA verwendet werden kann, müsste man annehmen, dass bis-ACV in das Zytoplasma exportiert wird und dort in einem anderen enzymatischen Schritt oxidiert wird. Das wurde bereits *in vitro* gezeigt (Cohen *et al.*, 1994). Es ist aber auch möglich, dass es in den Peroxisomen gar nicht zur Bildung von bis-ACV-Disulfid kommt, sondern es direkt in der reduzierten Form aus den Peroxisomen transportiert wird. Eine weitere Möglichkeit ist, dass IpnA zusätzliche Faktoren benötigt, die im Zytoplasma vorhanden sind. Zum Beispiel konnte vor kurzem gezeigt werden, dass IpnA mit Proteinen aus dem VeA-Komplex direkt interagiert (Kopke *et al.*, 2013). Eventuell sind solche Interaktionen für die Funktionalität von IpnA unabdingbar.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen zu IpnA, dessen peroxisomale Positionierung einen Verlust der Penicillin-Produktion zur Folge hatte, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Verlagerung von AcvA in die Peroxisomen zu einer erhöhten Penicillin-Produktion führt. Dieses Ergebnis zeigt, dass es AcvA nicht nur möglich ist in der oxidativen Umgebung der Peroxisomen zu funktionieren, sondern dass dort sogar eine erhöhte Aktivität vorliegt. Das Ergebnis zeigt auch, dass die drei Ausgangsstoffe der Penicillin-Synthese nicht limitierend wirken und sie daher in genügender Menge in die Peroxisomen transportiert werden sollten. Zusätzlich muss das Produkt der Reaktion, das

Tripeptid, wieder ins Zytoplasma exportiert werden. Zur Zeit ist über solche Transportprozesse wenig bekannt, sie wirken sich allerdings offenbar nicht limitierend aus. ATP (Adenosintriphosphat), welches für die Aktivierung der Aminosäuren benötigt wird, kann auch innerhalb von Peroxisomen hergestellt werden. Wie kürzlich veröffentlichte Ergebnisse zeigen, finden Teile der Glykolyse in den Peroxisomen statt (Ast *et al.*, 2013; Freitag *et al.*, 2012).

Aufgrund der Expressionsanalysen konnte bestätigt werden, dass die Gene auch unter Produktionsbedingungen überexprimiert wurden. Außerdem war zu erkennen, dass durch eine erhöhte Expression von *acvA* auch *aatA* höher exprimiert wurde. Umgekehrt, also bei Überexpression von *aatA*, war die Expression von *acvA* nur unwesentlich erhöht. Dadurch kann auch erklärt werden, warum die Penicillin-Produktion eines Stammes, in dem alle drei Gene überexprimiert waren, nicht dreimal so hoch ist wie bei einzelnen Überexpressionen. *IpnA* hat schon im Wildtyp ein hohes Expressionslevel (Brakhage *et al.*, 1992; Gomez-Pardo & Penalva, 1990; Litzka *et al.*, 1995), sodass die Überexpression nicht so markant wie bei *acvA* oder *aatA* ausfiel. Ein direkter Einfluss der PTS1 auf die Expression kann ausgeschlossen werden. Bei *acvA* hatte die Markierung keinen Einfluss auf die Expression. Der Effekt der höheren Penicillin-Produktion ist demnach ausschließlich auf die Veränderung der Position zurück zu führen. Im Falle der C-terminalen PTS1 Fusion von *ipnA* konnte kein Penicillin produziert werden und die Expression aller Penicillin-Gene fiel in den Stämmen um ein vielfaches ab. Allerdings könnte dies an der bereits erwähnten möglichen Regulation der IPN-Synthase durch Interaktion mit einem Teil des VeA-Komplexes im Zytoplasma liegen. Durch eine fehlende Regulation des VeA-Komplexes könnte das gesamte Penicillin-Cluster betroffen sein. Die Anzahl an Peroxisomen in einer Zelle zeigte ebenfalls einen Einfluss auf die Expression der Penicillin-Gene. Bei einem vollständigen Fehlen von Peroxisomen wurden tendenziell mehr Genkopien hergestellt. Im Gegensatz dazu lagen bei einer erhöhten Peroxisomenzahl weniger Genkopien vor. Um diesen Effekt zu erklären, müssen weitere Studien durchgeführt werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Verlagerung von *AcvA* in die Peroxisomen, eine Erhöhung der Anzahl an Peroxisomen, sowie die Überexpression der Biosynthese-Gene von Penicillin zu einer erhöhten Produktion führten. Die Kombination aus diesen Parametern führte zu einer zusätzlichen Produktionssteigerung, allerdings führte die Kombination aus allen drei Parametern nicht zu einem zusätzlichen positiven Effekt. Das zeigt wiederum, dass andere Schritte in diesen Stämmen limitierend wirken. Trotzdem konnte durch diese Arbeit ein weiteres Puzzlestück zur Steigerung der Produktion von Penicillin hinzugefügt werden. Es wäre interessant herauszufinden, wie sich die peroxisomale Verlagerung von *AcvA* in industriellen Produktionsstämmen von *P. chrysogenum* auswirkt.

Teil II: Das CAAX-Motiv - Ein Werkzeug zur Stammoptimierung

Einleitung

Um die Auswirkung einer Verlagerung von Enzymen in die Zytoplasmamembran zu erforschen, wurde die Riboflavinproduktion als Modell gewählt. Riboflavin (Vitamin B₂) ist ein essentieller Bestandteil des primären Stoffwechsels. Es kann von höheren Eukaryoten nicht gebildet und muss deshalb über die Nahrung aufgenommen werden. Für einen Menschen sind 2 mg pro Tag ausreichend. Da Riboflavin nicht gespeichert werden kann, wird alles überschüssig aufgenommene Riboflavin wieder ausgeschieden. Das bedeutet somit ebenfalls, dass die benötigte Menge jeden Tag mit der Nahrung aufgenommen werden muss. Täglich eine Tasse Milch reicht dazu aus. Riboflavin findet zudem als Lebensmittelfarbstoff und als Futtermittelergänzung in der Tierhaltung Anwendung. Letztere verbraucht insgesamt zwei Drittel der jährlichen Riboflavin-Produktion (Sahm *et al.*, 2012).

Entdeckung und wirtschaftliche Bedeutung von Riboflavin

Die Strukturaufklärung und chemische Darstellung von Riboflavin war bereits in den 1930er-Jahren gelungen. Mehrstufige chemische Verfahren mit den Rohstoffen Dimethylanilin, D-Glucose, später D-Ribose, Phenyl diazoniumchlorid und Barbitursäure wurden zur technischen Reife entwickelt und waren bis in die 1990er-Jahre wirtschaftlich erfolgreich (Sahm *et al.*, 2012). Die erste kommerzielle mikrobiologische Produktion wurde mit *Clostridium acetobutylicum* durchgeführt (Meade RE, 1947; Perlman, 1979). Im Jahre 1940 folgte dann *Eremothecium ashbyii* und seit 1946 wurde vor allem *Ashbya gossypii* zur Produktion verwendet (Perlman, 1979). Allerdings konnte *A. gossypii* erst um 1974 durch die Firma Merck wirklich etabliert werden. Zuvor waren einige andere Firmen daran gescheitert den biotechnologischen Prozess insoweit zu optimieren, dass er effizienter als die chemische Produktion war. Merck erreichte durch die Verwendung von *A. gossypii* eine Ausbeute von bis zu 15 g Riboflavin pro Liter (Bigelis, 1989). Im Jahr 2000 begann die Firma Roche damit ihre chemische Produktion durch eine biotechnologische mit *Bacillus subtilis* zu ersetzen. *B. subtilis* ist im Gegensatz zu *A. gossypii* (der Wildtyp produziert bei bestimmten Bedingungen bis zu 100 mg Riboflavin pro Gramm Biomasse; vermutlich als Schutz vor UV-Strahlen) kein natürlicher Überproduzent, aber ein etablierter Industrieorganismus und gentechnisch leicht manipulierbar (Stahmann *et al.*, 2000). *Bacillus* konnte vor allem durch eine Deregulierung der Purin-Synthese und einer Mutation der Flavokinase/FAD-Synthetase verbessert werden (Perkins, 1991). Die Optimierung beider Organismen war nach zehn Jahren intensiver Stammverbesserung so weit voran geschritten, dass sie die über 50 Jahre dominierende chemische Produktion vom Markt verdrängen konnte. Ein Vergleich eines chemischen mit zweier biotechnologischen Verfahren zeigte, dass die Biotechnologie 75% weniger fossile Rohstoffe für die gleiche Produktmenge Vitamin B₂ benötigte als die Chemie.

Ebenfalls stark abgenommen hatten die Emission von Schadstoffen in Luft (-50%) und Wasser (-66%). Allerdings ist der Wasserverbrauch durch die mikrobiellen Verfahren mehr als doppelt so hoch und die Belastung des Wassers mit Ammonium kann bis zu fünfmal so hoch wie im chemischen Verfahren werden. Wirtschaftlich lohnt sich die biotechnologische Produktion durch die Reduktion der Stufenzahl und günstigere Rohmaterialien. Es können damit bis zu 50% der Betriebskosten eingespart werden (Sahm *et al.*, 2012). Der weltweite Verbrauch von Riboflavin betrug 1981 1250 Tonnen pro Jahr (Lago und Kaplan, 1981). Im Jahr 2001 wurde er auf 3000 Tonnen pro Jahr geschätzt. Der Anteil des durch industrielle Fermentation hergestellten Riboflavins beträgt 2500 Tonnen im Jahr. (Stahmann *et al.*, 2000).

Viele Organismen wurden zur Produktion von Riboflavin verwendet. Die Kulturbedingungen, vor allem die Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, sowie die Kultivierungszeit und einige andere Faktoren sind, wie in jeder Prozessoptimierung, entscheidende Faktoren (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammenfassung verschiedener für die Riboflavinproduktion verwendete Mikroorganismen (Lim *et al.*, 2001).

	Stamm	Kohlenstoffquelle	Max. Riboflavin-konzentration (g/L)	Kultivierungszeit	Referenz
Bakterien	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	-	0,1	-	(Hickey, 1945)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Glukose	0,08	0.3 h	(Sauer <i>et al.</i> , 1996)
Hefen	<i>Candida flareri</i>	Glukose, Fruktose	0,6	-	(Olczyk, 1978)
	<i>Candida guilliermondii</i>	Flüssiger Brauereiabfall	0,2	3 Tage	(Contasti & Bahar, 1988)
	<i>Mycobacterium pheli</i>	Zuckerrübensirup	0,1	6 Tage	(Ghozlan, 1994)
Pilze	<i>Aspergillus terreus</i>	Zuckerrübensirup	1,0	16 Tage	(Sabry <i>et al.</i> , 1993)
	<i>Eremothecium ashbyii</i>	Glukose, Fruktose, Saccharose	0,2	-	(MacLaren, 1952)
		Glukose	1,4	-	(Hickey, 1945)
		Glukose, Saccharose	2,0	-	(Stepanov <i>et al.</i> , 1974)
		Molasse	3,3	7 Tage	(Kalingan & Liao, 2002)
	<i>Ashbya gossypii</i>	Glukose	0,4-1,0	-	(Smith, 1961)
		Sojaöl, Knochenfett	5,0	8 Tage	(Szczesniak <i>et al.</i> , 1971a)
Sojaöl		5,5	8 Tage	(Szczesniak <i>et al.</i> , 1971b)	

Im Laufe der Zeit wurden einige Organismen auf ihre Fähigkeit hin, Riboflavin zu produzieren, untersucht (Tabelle 4). Heute werden hauptsächlich *Bacillus subtilis*, *Candida famate* und *Ashbya gossypii* für die Massenproduktion von Riboflavin verwendet. *Candida* sp. sind natürliche Überproduzenten von Riboflavin. Sie erreichen Mengen von 20-30 g/L. Ein rekombinanter *Bacillus*-Stamm konnte durch Wachstum in einem Glukose-limitierten Chemostat 0,08 g/L in 0,3 Stunden produzieren. Durch die schon erwähnte Deregulierung der Purin-Synthese und einer Mutation in der Flavokinase / FAD-Synthase (RibC) von *B. subtilis* konnten Konzentrationen von bis zu 15 g/L erreicht werden. *A. gossypii* ist ein effektiver Überproduzent von Riboflavin. Etwa 30% der weltweiten Riboflavinproduktion werden mit diesem Organismus abgedeckt (Lim *et al.*, 2001).

Biosynthese von Riboflavin

Die Biosynthese von Riboflavin beginnt mit einem Molekül Guanosintriphosphat (GTP) und zwei Molekülen Ribulose-5-phosphat (Ribulose-5P) (Abbildung 16) (Bacher & Mailander, 1973; Foor & Brown, 1975). GTP-Zyklohydrolase II (Rib1) katalysiert die Freigabe von Formiat aus dem Imidazolring und die Abgabe von Pyrophosphat aus der Seitenkette des Nukleotid-Vorläufers was zu 2,5-diamino-6-ribosylamino-4 (3H)-pyrimidinon-5'-phosphat (DARPP) führt (Foor & Brown, 1975; Foor & Brown, 1980). Durch eine Reduktion (Rib7; Pyrimidin-Reduktase) der Ribose-Seitenkette ergibt sich 2,5-diamino-6-ribitylamino-4 (3H)-pyrimidinon-5'-phosphat (DARPP). Eine hydrolytische Spaltung (Rib2; Pyrimidin-Deaminase) der Aminogruppe an Position 2 ergibt 5-amino-6-ribitylamino-2,4 (1H,3H)-pyrimidinedion-5'-phosphat (ArPP) und eine Dephosphorylierung ergibt schließlich 5-amino-6-ribitylamino-2,4 (1H,3H)-pyrimidinedion (ArP). Die Reihenfolge der Deaminierung und der Seitenkettenreduktion variieren in verschiedenen taxonomischen Gruppen. In Pilzen und Archaeen findet zuerst die Seitenkettenreduktion und dann die Deaminierung statt. In Pflanzen und Eubakterien ist das genau anders herum (Bacher & Lingens, 1970; Burrows & Brown, 1978; Fischer *et al.*, 2004; Haase *et al.*, 2014; Nielsen & Bacher, 1981). In allen taxonomischen Königreichen laufen die Reaktionen bei ArPP zusammen. Diese Komponente kann jedoch nicht direkt als Substrat für die Lumazin-Synthase (Rib4) verwendet werden, da diese nur die dephosphorylierte Form akzeptiert. Dies hat zur Folge, dass es eine Phosphatase geben muss, die ArP synthetisieren kann. Diese Phosphatase blieb bislang allerdings unentdeckt. Unter Umständen kann eine Dephosphorylierung durch Hydrolasen mit geringer Substratspezifität erreicht werden (Haase *et al.*, 2014; Harzer *et al.*, 1978; Neuberger & Bacher, 1986). Aus Pyrimidin-Derivat (ArP) entsteht durch eine Kondensation mit 3,4-dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (DHBP, entstanden durch eine Skelettneuordnung (Rib3; 3,4-dihydroxy-2-butanon Synthase) von Ribulose-5P) DMRL (Kis *et al.*, 1995; Neuberger & Bacher, 1986; Volk & Bacher, 1990; Volk & Bacher, 1991). Der letzte Schritt umfasst eine ungewöhnliche und mechanisch einzigartige Dismutation (Rib5; Riboflavin-Synthase) von zwei Molekülen des Pteridin-

Derivates DMRL zu Riboflavin und Pyrimidin ArP (Harvey & Plaut, 1966; Plaut, 1960; Plaut, 1963; Plaut *et al.*, 1970; Wacker *et al.*, 1964).

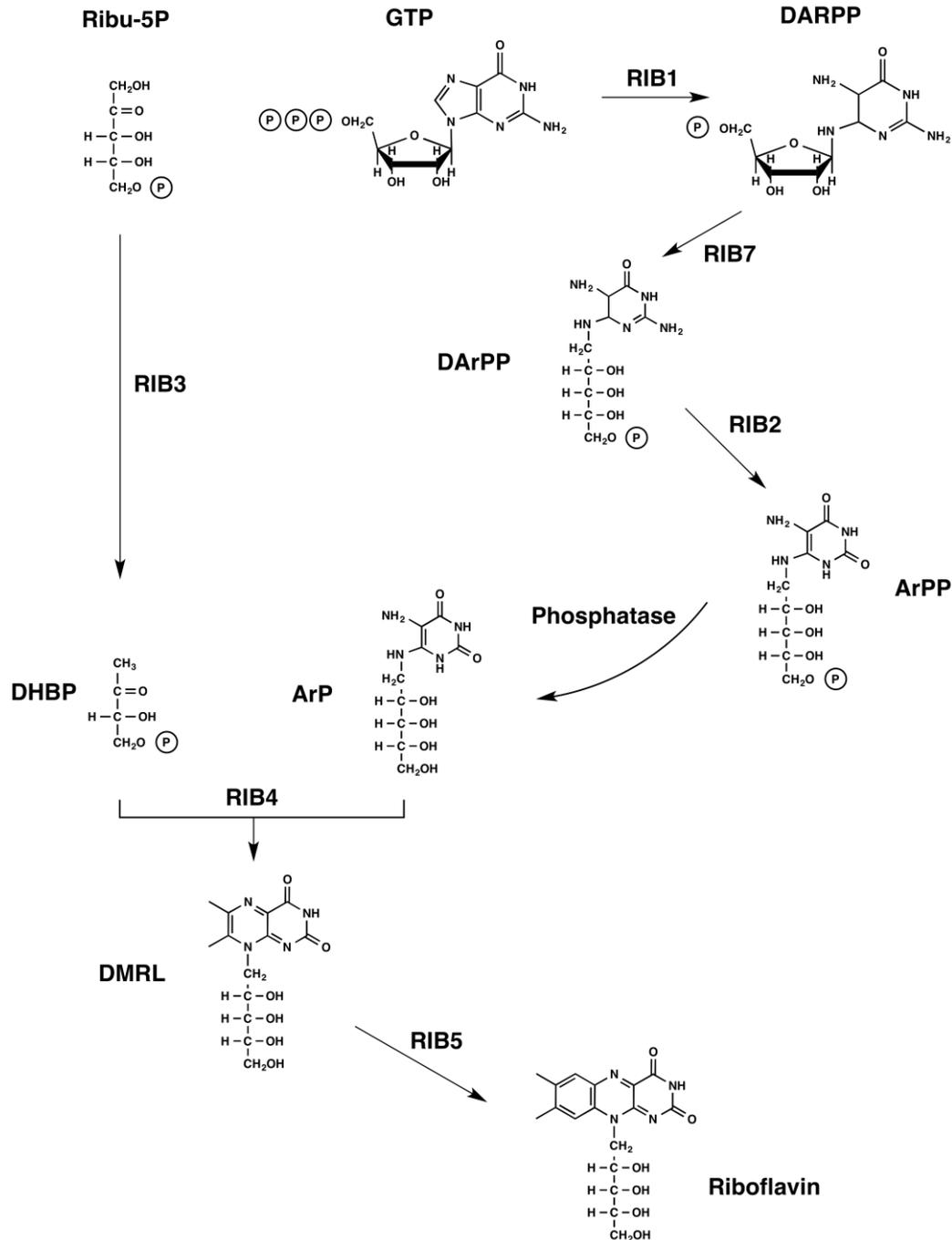


Abbildung 16: Die Biosynthese von Riboflavin in *A. nidulans*. Ein Molekül GTP und zwei Moleküle Ribu-5P sind die Edukte für die Biosynthese von Riboflavin. Im ersten Schritt katalysiert Rib1 die Freigabe von Formiat und die Abgabe von Pyrophosphat, was zur Bildung von DARPP führt. Rib7 reduziert die Ribose-Seitenkette zu DArPP; Rib2 vollzieht danach eine hydrolytische Spaltung und es entsteht ArPP, was eine noch unbekannte Phosphatase zu ArP umwandelt. Diese Dephosphorylierung ist notwendig um die Bildung von DMRL zu ermöglichen. Durch eine Kondensation (Rib4) von ArP und DHBP, was durch eine Skelettmordnung (Rib3) von Ribu-5P erlangt wird, entsteht DMRL. Der letzte Schritt umfasst eine Dismutation (Rib5) von DMRL zu Riboflavin und ArP. GTP, Guanosine triphosphat; Ribu-5P, Ribulose-5'-phosphat; DARPP, 2,5-diamino-6-ribosylamino-4 (3H)-pyrimidinon-5'-phosphat; DArPP, 2,5-diamino-6-ribitylamino-4 (3H)-pyrimidinon-5'-phosphat; ArPP, 5-amino-6-ribitylamino-2,4 (1H,3H)-pyrimidinedion-5'-phosphat; ArP, 5-amino-6-ribitylamino-2,4 (1H,3H)-pyrimidinedion; DHBP, 3,4-dihydroxy-2-butanon-4-phosphat; DMRL, 6,7-dimethyl-8-ribityllumazin; Rib1, GTP-Zyklohydrolase II; Rib2, Pyrimidin-Deaminase; Rib3, 3,4-dihydroxy-2-butanon Synthase; Rib4, Lumazin-Synthase; Rib5, Riboflavin-Synthase; Rib7, Pyrimidin-Reduktase (Fischer & Bacher, 2005).

Riboflavin ist wichtig für Organismen aus allen Taxa, da es die Vorstufe für die Koenzyme Flavin-Adenin-Mononukleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) ist. Diese wiederum sind die Kofaktoren von Flavoproteinen, die für das Überleben essentiell sind (Sahm *et al.*, 2012).

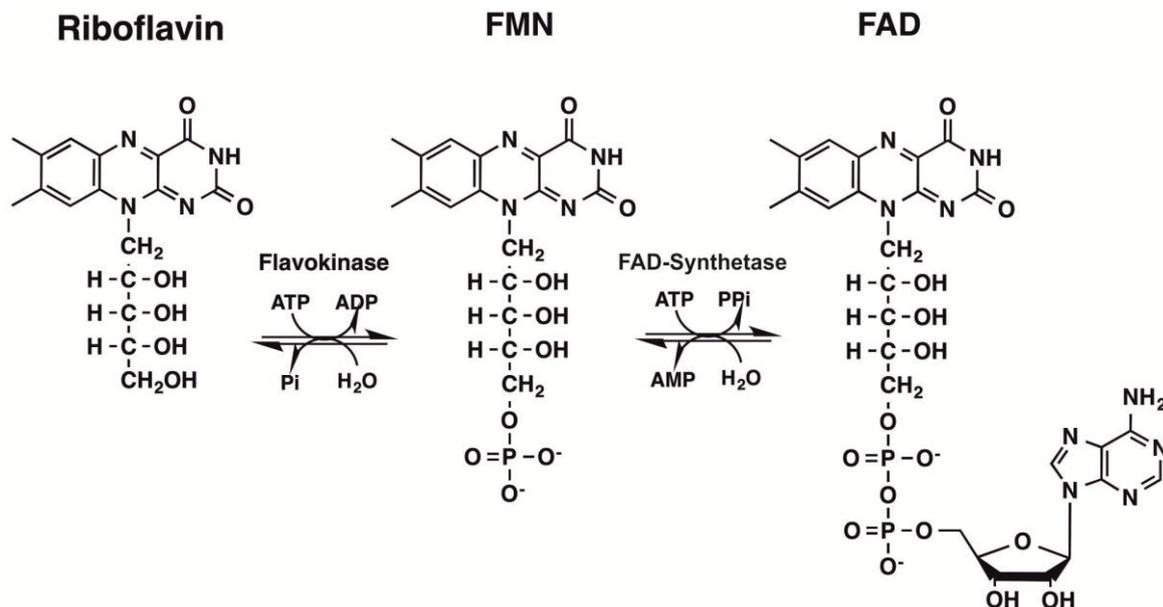


Abbildung 17: Die Umsetzung von Riboflavin zu FMN und FAD. Riboflavin ist der Vorläufer für die biologisch aktiven Formen FMN und FAD. Riboflavin wird in *A. nidulans* durch die Flavokinase (Riboflavin-Kinase) zu FMN phosphoryliert indem ein Phosphorsäurerest von einem Nucleotidtriphosphat (ATP) auf die 5'-Hydroxygruppe des Riboflavins übertragen wird. Dann wird ein Adenylrest mittels der FAD-Synthetase (FAD-Adenyltransferase) von ATP auf FMN übertragen und es entsteht FAD und Diphosphat.

Chemisch wird Riboflavin mittels der Flavokinase (Riboflavin-Kinase) durch eine Phosphorylierung zu FMN umgewandelt. Genauer wird ein Phosphorsäurerest von ATP auf die 5'-Hydroxygruppe des Riboflavins übertragen. Die FAD-Synthetase überträgt einen Adenylrest von ATP auf FMN und es entsteht FAD und Diphosphat. So entsteht aus einem Molekül Riboflavin ein Molekül FMN und daraus ein Molekül FAD (Abbildung 17).

Riboflavin-Kinase und die FAD-Synthetase wurden in einer Vielzahl von Organismen entdeckt (Fischer & Bacher, 2005). Ein wichtiger Schritt war die Entdeckung einer bifunktionalen Flavokinase-FAD-Synthetase in *Brevibacterium ammoniagenes* und *Corynebacterium ammoniagenes* (Manstein & Pai, 1986; Nakagawa *et al.*, 1995). Dieses bifunktionale Enzym ist in Eubakterien weit verbreitet. *S. cerevisiae* oder auch *H. sapiens* besitzen zum Beispiel zwei monofunktionale Enzyme (Santos *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1995). Bioinformatische Analysen mit Hilfe der "KEGG Pathways" (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), ergaben dass die Flavokinase in *A. nidulans* durch das Gen AN7469 und die FAD-Synthetase durch AN0591 kodiert wird. Es sind also zwei Enzyme an der Reaktion beteiligt.

Enzyme der Riboflavin-Biosynthese in *A. nidulans*

A. nidulans ist für die industrielle Produktion von Riboflavin von keiner großen Bedeutung, da die von ihm produzierte Riboflavin-Menge unbeachtlich ist. Daher erwies sich die Erforschung der Riboflavin-Biosynthese in diesem Pilz bislang als eher wenig interessant. Die gute genetische Zugänglichkeit und leichte Handhabung machen ihn jedoch zu einem wichtigen Element für die Erforschung neuer Anwendungen. Um die Riboflavine Gene in *A. nidulans* zu identifizieren, wurden bioinformatische Analysen durchgeführt. Anhand der Daten der "KEGG Pathways" und der *Aspergillus*-Genomdatenbank (AspGD) (Cerqueira *et al.*, 2014) ergaben sich einige potenzielle Gene und Charakteristika für die sechs notwendigen Enzyme, die hier näher besprochen werden sollen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Gene der Riboflavin-Biosynthese in *A. nidulans*. Bioinformatische Analysen wurden durchgeführt mit Hilfe der "KEGG Pathways" und der *Aspergillus*-Genomdatenbank (Cerqueira *et al.*, 2014).

Riboflavin-Enzym	Funktion	<i>A. nidulans</i> - Gen	Aminosäuren	kDa
Rib1	GTP-Zyklohydrolase II	AN0670	409	44
Rib2	Pyrimidin-Deaminase	AN10936	572	62,9
Rib3	3,4-dihydroxy-2-butanon Synthase	AN5497	239	25,7
Rib4	Lumazin-Synthase	AN10718	207	21,5
Rib5	Riboflavin-Synthase	AN4231	234	25,1
Rib7	Pyrimidin-Reduktase	AN6979	609	67,4

Rib1 (AN0670), Rib3 (AN10936), Rib5 (AN4231) und Rib7 (AN6979) sind bereits in der KEGG Datenbank erwähnt. Rib2 und Rib4 waren in der KEGG-Datenbank für *A. nidulans* nicht annotiert. Diese beiden Enzyme konnten durch einen Protein-"BLAST" (Basic Local Alignment Search Tool) mit Hilfe des entsprechenden Werkzeugs auf "NCBI" (National Center for Biotechnology Information) ermittelt werden. Verwendet wurden dafür die homologen und bereits annotierten Gene aus *S. cerevisiae*. Rib2 hat demnach 50% Identität zu AN10936 und Rib4 47% Identität zu AN10718 aus *A. nidulans*. In der AspGD werden für die jeweiligen Enzyme die für die Synthese notwendigen Funktionen vorhergesagt.

Zellmembranen als biotechnologische Oberfläche

Eines der grundlegendsten Ziele der Biotechnologie ist die Verbesserung von Produktionsstämmen und die damit verbundene Steigerung der Stoffproduktion. Um dies zu erreichen, wurde die Translokation der Enzyme der Riboflavin-Biosynthese aus dem Zytoplasma in die Zellmembran untersucht. Dies offenbart die Möglichkeit die Membran als "biotechnologische Oberfläche" zu nutzen. Mit Hilfe des CAAX-Motives sollte es möglich gemacht werden, Proteine in intrazelluläre Membranen, genauer der Zytoplasmamembran, einzubetten.

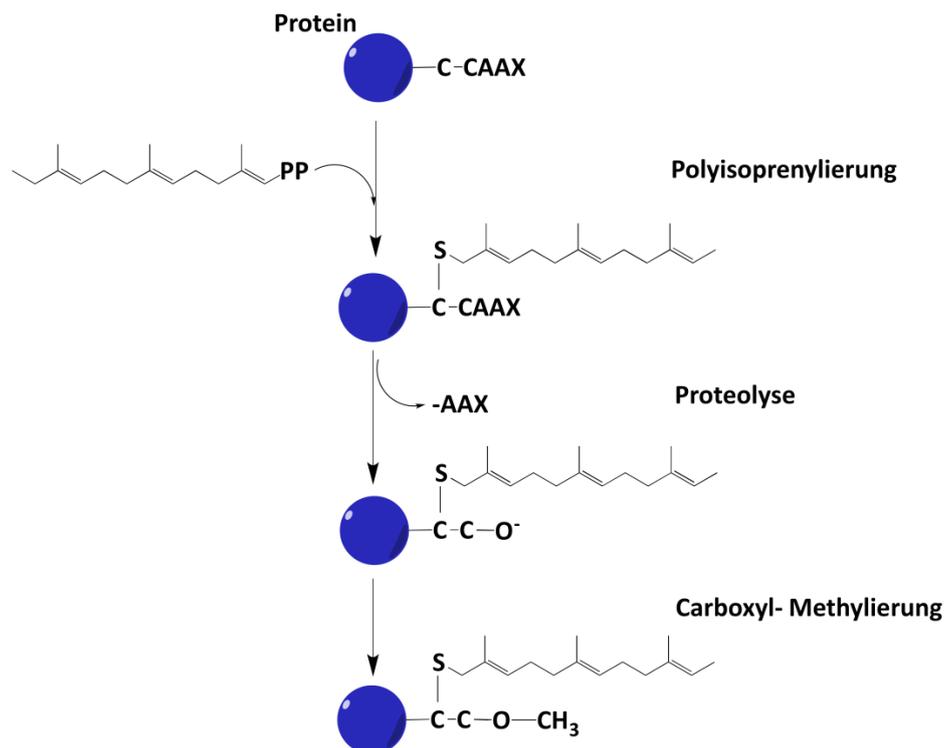


Abbildung 18: Prinzip der Prenylierung des CAAX -Motivs. Die Prenylierung ist ein dreistufiger Prozess. Nach einer ersten Polyisoprenylierung erfolgt eine Proteolyse und zum Schluss eine Carboxyl-Methylierung. Durch diesen Prozess wird der C-Terminus eines Proteins signifikant hydrophob und kann in eine Lipiddoppelschicht eingebettet werden (Gao *et al.*, 2009)

CAAX-Motive findet man ausschließlich am C-Terminus von Membran-Proteinen. Das C in "CAAX" ist ein Cysteinrest, AA steht für zwei aliphatische Aminosäuren und X ist eine beliebige C-terminale Aminosäure abhängig von verschiedenen Substratspezifitäten. Es existiert eine große Fülle an CAAX-Proteinen, mit unterschiedlichen Funktionen innerhalb der Zelle. Damit Proteine mit CAAX-Motiv in der Membran verankert werden können, muss eine Prenylierung erfolgen. Diese posttranslationale Modifikation verbindet das Protein mit einem hydrophoben Terpen-Rest (z.B. Farnesol, Geranylgeraniol, Dolichol) um eine Verankerung in die Zellmembran zu ermöglichen. Dieser Prozess umfasst drei Schritte (Abbildung 18). Zu Beginn findet eine Polyisoprenylierung statt, gefolgt durch eine Proteolyse und einer Carboxyl-Methylierung. Eine Polyisoprenylierung ist die Anlagerung eines Isoprenoidlipids durch eine Protein-Farnesyltransferase (FTase) oder einer Geranylgeranyltransferase Typ I (GGTase-I). Im zweiten Schritt werden die CAAX Anhänge proteolysiert um den "-AAX" Rest zu

entfernen. Das geschieht mit Hilfe einer Prenyl-Proteinpeptidase (RCE1-Familie). Im Anschluss erfolgen eine endoprenolytische Spaltung und eine Carboxyl-Methylierung. Dadurch wird der C-Terminus des mit dem CAAX-Motives modifizierten Proteins signifikant hydrophob. Diese nun hydrophobe Domäne des Proteins kann in die ebenfalls hydrophobe Lipidschicht eingebettet werden. Da die meisten CAAX-Proteine keine spezifische Transmembrandomäne besitzen, stellt die Prenylierung eine Alternative zu klassischen Transmembrandomänen da um Proteine in der Zellmembran verankern zu können. Die prenylierten CAAX-Proteine werden zunächst in der Zytoplasmamembran verankert um dann, wenn nötig, in die Membran des Nukleus, der Mitochondrien oder anderer Organellen transportiert zu werden (Gao *et al.*, 2009).

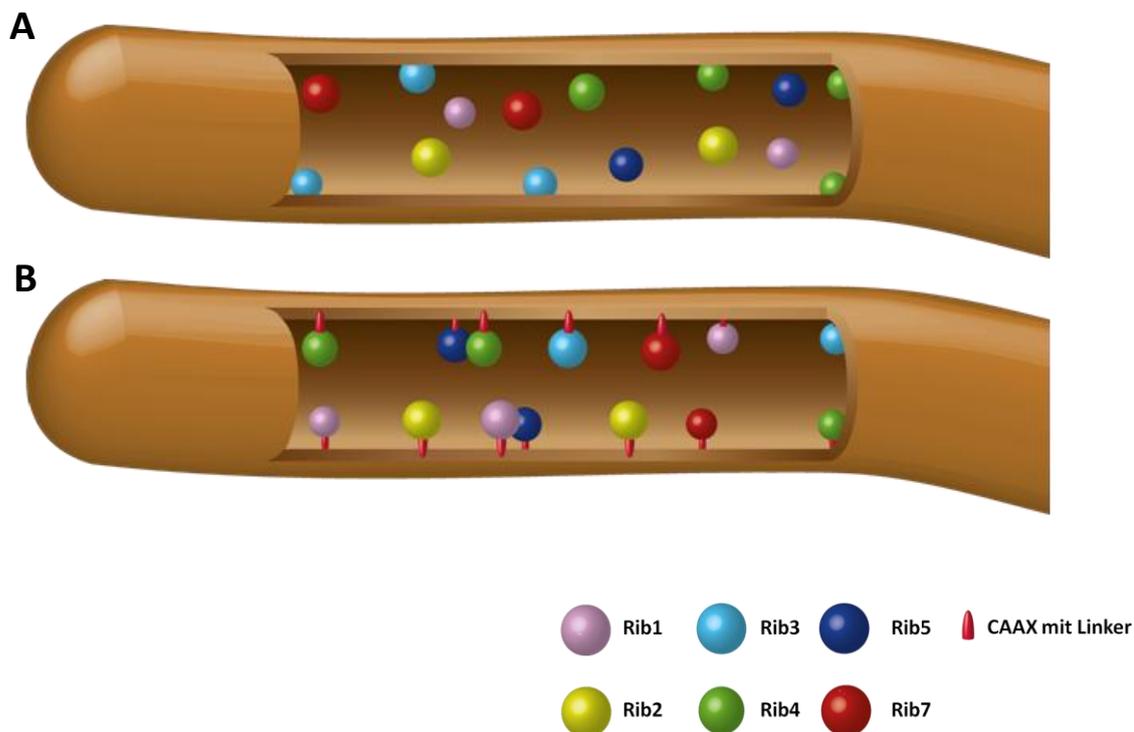


Abbildung 19: Die Enzyme der Riboflavin-Biosynthese im Zytoplasma (A) oder an der Zellmembran (B). Die Enzyme sind farblich markiert und in der Legende dargestellt; ebenfalls das CAAX-Motiv. (A) Abbildung einer Hyphe mit den Enzymen der Riboflavin-Biosynthese im Zytoplasma. Diese Darstellung stellt die Situation in der Natur dar. (B) Abbildung einer Hyphe mit den Enzymen der Riboflavin-Biosynthese, die mit Hilfe des CAAX-Motives in der Zellmembran der Zelle verankert sind. Diese Abbildung entstand mit freundlicher Unterstützung von Anja Vetter.

Die Enzyme der Riboflavin-Biosynthese liegen laut *Aspergillus*-Genomdatenbank alle im Zytoplasma vor (Abbildung 19A) (Cerqueira *et al.*, 2014) und sollten im Zuge dieser Arbeit in der Zellmembran (Abbildung 19B) verankert werden. Damit sind die Enzyme in einer Fläche gebunden und können sich dort frei bewegen, nur die Diffusion zurück ins Zytoplasma wird verhindert. Es werden also wie auch schon im ersten Teil der Arbeit Strukturen der Zelle verwendet um die Lage von Biosyntheseenzymen zu verändern. Die Veränderung der Lage ändert in diesem Fall allerdings nicht das umliegende Milieu der Enzyme. Etwaige Probleme wie Substratlimitierungen, Unterschiede im pH-Wert oder Mangel an Ko-Faktoren sollten also von vorne herein ausgeschlossen werden können.

Ergebnisse

CAAX-Motiv von TeaR

Für eine Verankerung in der Zytoplasmamembran wurde das CAAX-Motiv eines Membranproteins gewählt, welches dort natürlich vorkommt oder zumindest seine vorwiegende Funktion bis zu seinem Abbau dort erfüllt. Um das zu gewährleisten wurde das CAAX-Motiv des Proteins TeaR gewählt, das als Zellendmarker fungiert und für das polare Wachstum in *A. nidulans* mitverantwortlich ist (Takeshita *et al.*, 2008).

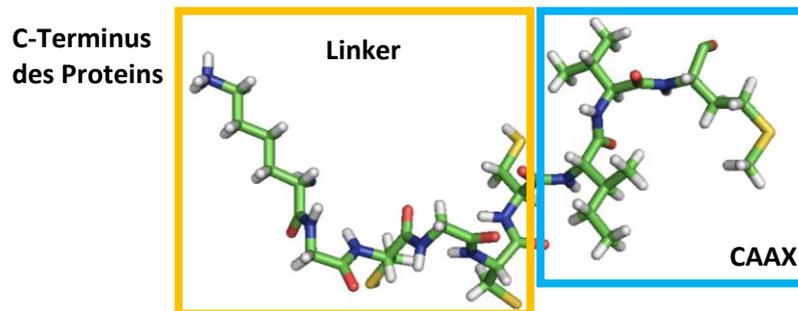


Abbildung 20: CAAX-Motiv (Aminosäuren CIVM; Kasten blau) mit Linker (Aminosäuren KGCGC; Kasten orange) aus TeaR (Aminosäuren KGCGCCIVM; gesamt). Das CAAX-Motiv wurde mit der Online-Plattform I-TASSER modelliert (Roy *et al.*, 2010; Zhang, 2008). Die Sequenz wurde ohne den Rest von TeaR eingegeben. Es wurde das Wahrscheinlichste von fünf Modellen verwendet. Die komplette Struktur bildete einen Strang. Das bedeutet, dass sich die Aminosäuren nicht gegenseitig anziehen und damit die Funktion der Struktur beeinträchtigen könnten. Grafisch dargestellt wurde das Modell mit dem Programm PyMol (Schrödinger, 2010).

Zur ersten Orientierung wie sich Proteine mit dem CAAX-Motiv von TeaR (Cystein-Isoleuzin-Valin-Methionin) verhalten, wurde GFP mit C-terminal fusioniertem CAAX-Motiv in *A. nidulans* getestet (*A. nidulans* SNB01). Der Stamm wurde in Minimalmedium mit Glycerin bei 28°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag mikroskopisch untersucht.

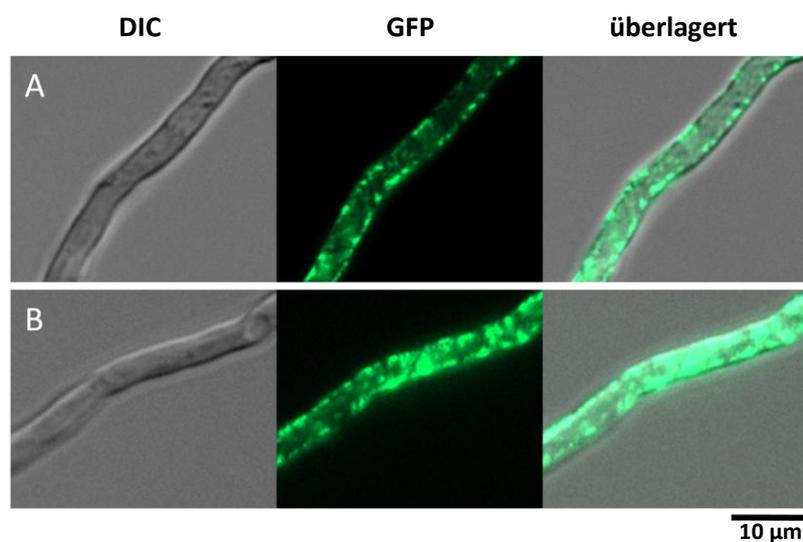


Abbildung 21: Lokalisation von GFP mit CAAX-Motiv von TeaR. *A. nidulans* SNB01 (GFP-CAAX.) nach 24 h in Mikroskopiemedium mit zwei Prozent Glycerin. (A) Lokalisation von GFP an der Membran der Hyphe. In Sporen ist meist zusätzlich eine diffuse Lokalisation im Inneren zu erkennen (B) Lokalisation von GFP an der Membran und stellenweise im Inneren der Hyphe.

Die Lokalisation von GFP-CAAX ist membranständig. Es sind einzelne Punkte an der Membran zu erkennen (Abbildung 21A). Da nur ein optischer Querschnitt der Hyphe dazustellen ist, kann angenommen werden, dass sich die Akkumulation über die gesamte innere Oberfläche der Hyphe verteilt. Es ist erkennbar, dass sich GFP nicht nur an der Oberfläche sondern teilweise auch innerhalb der Hyphe befindet, (Abbildung 21B).

Berechnung der möglichen Anzahl membrangebundener Proteine in *A. nidulans*

Um die These einer Produktionssteigerung durch die Verlagerung von Enzymen vom Zytoplasma in die Zellmembran einer Hyphe zu bestätigen, muss diese über eine gewisse Kapazität verfügen um die zusätzlichen Proteine aufnehmen zu können.

Eine Hyphe ist im idealen Fall zylindrisch und ihre Kompartimente durch Septen voneinander getrennt. Unter der Annahme, dass ein solches Kompartiment ebenfalls einen Zylinder darstellt, kann das Volumen und die Fläche davon berechnet werden (die Hyphe darf sich hierbei nicht im Wachstum befinden). Ein Zylinder wiederum ist ein zusammengerolltes Rechteck. Nach einigen praktischen Analysen ist die durchschnittliche Länge eines Kompartiments 39 μm (Durchschnitt aus den Quellen (Wolkow *et al.*, 1996); 38 μm und (Kaminskyj & Hamer, 1998); 40 μm). Die "Breite", also der Umfang einer Septe, beträgt 7,226 μm (Errechnet aus dem Durchmesser einer Hyphe; 2,3 μm (Takeshita *et al.*, 2013). Der Radius beträgt daher 1,15 μm ($U=2\pi r$). Proteine von unterschiedlicher Größe haben verschiedene Durchmesser. Die Proteine der Riboflavin-Biosynthese sind in *A. nidulans* zwischen 20 und 70 kDa schwer (Tabelle 5). Damit kann durchschnittlich angenommen werden, dass ein Protein die Form einer Kugel mit einem Durchmesser von 3 nm hat (Erickson, 2009). Laut optimaler Kugelpackung ($\pi/3\sqrt{2} = 0,74$) haben damit 2408 Kugeln in einer Reihe Platz. Es sind 15011 weitere Reihen möglich. Das bedeutet nach den Begebenheiten einer optimalen Kugelpackung können insgesamt 36141390 Proteine in der Membran eines Kompartiments verankert werden. Die Berechnung erfolgte nach den Formeln der optimalen Kugelpackung in 2D oder 3D (Hales, 2000). Da die Membran einer Hyphe zusätzlich Lipide und anderen Proteine beherbergt, wurde geschätzt, dass maximal 70% der Membran für die Integration von fremden Proteinen zur Verfügung stehen. Wenn dieser Platz zur Gänze ausgefüllt würde, wären 25298973 zusätzlich integrierte Enzyme vorhanden.

Das Volumen einer Hyphe mit den gleichen Dimensionen, wäre $1,62035 \cdot 10^{11} \text{ nm}^3$. Ein Enzym mit 3 nm Durchmesser hat ein Volumen von $14,137 \text{ nm}^3$, da es kugelförmig ist. Demnach hätten 11461766994 Enzyme nach optimaler Kugelpackung im Zytoplasma einer Hyphe Platz. Eine Hyphe beherbergt jedoch die verschiedensten Strukturen wie Organellen, dem Zytoskelett, den Zellkernen, Ribosomen, weiteren Proteine und vielem mehr (Abbildung 4) (Steinberg & Schuster, 2011). Demnach bleibt nur wenig Platz für zusätzliche Proteine in einer Zelle. Wenn man annimmt, dass 10%

des zur Verfügung stehenden Platzes in einer Zelle frei ist, dann würden noch 848.170.757 zusätzliche Enzyme in diesen Raum passen.

Schlussendlich kann somit berechnet werden, dass im Zytoplasma 33,5-mal mehr freier Platz vorliegt als an der Zellmembran. Anders ausgedrückt heißt das, wenn 3% der Proteine im Zytoplasma für die Riboflavinbiosynthese verantwortlich wären, dann würden diese ebenfalls in der Zellmembran Platz haben.

Strukturvorhersage der Enzyme der Riboflavin-Biosynthese in *A. nidulans*

Das CAAX-Motiv wird C-terminal an die Riboflavinsynthese-Enzyme fusioniert um diese in der Zellmembran zu verankern. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass sich die Konformation durch die zusätzlichen Aminosäuren ändert und das Protein seine Funktionalität verliert. Bislang gibt es keine veröffentlichten Kristallstrukturen der beteiligten Enzyme in *A. nidulans*. Um zu untersuchen, ob eine Fusion des CAAX-Motives an den C-Terminus der Enzyme eine Konformationsänderung nach sich zieht, wurden die Sequenzen der Enzyme (Tabelle 5) der AspGD entnommen und mit dem Algorithmus von "I-TASSER" modelliert (Roy *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2012; Zhang, 2008). Es wurde jeweils das wahrscheinlichste Modell (höchster "C-Score"; gibt die Qualität der vorhergesagten Modelle an) abgebildet (Abbildung 22). Dargestellt wurden die Modelle mit dem Programm PyMol (Schrödinger, 2010). Die C-Termini wurden markiert um ihre Lage innerhalb des Proteins zu bestimmen.

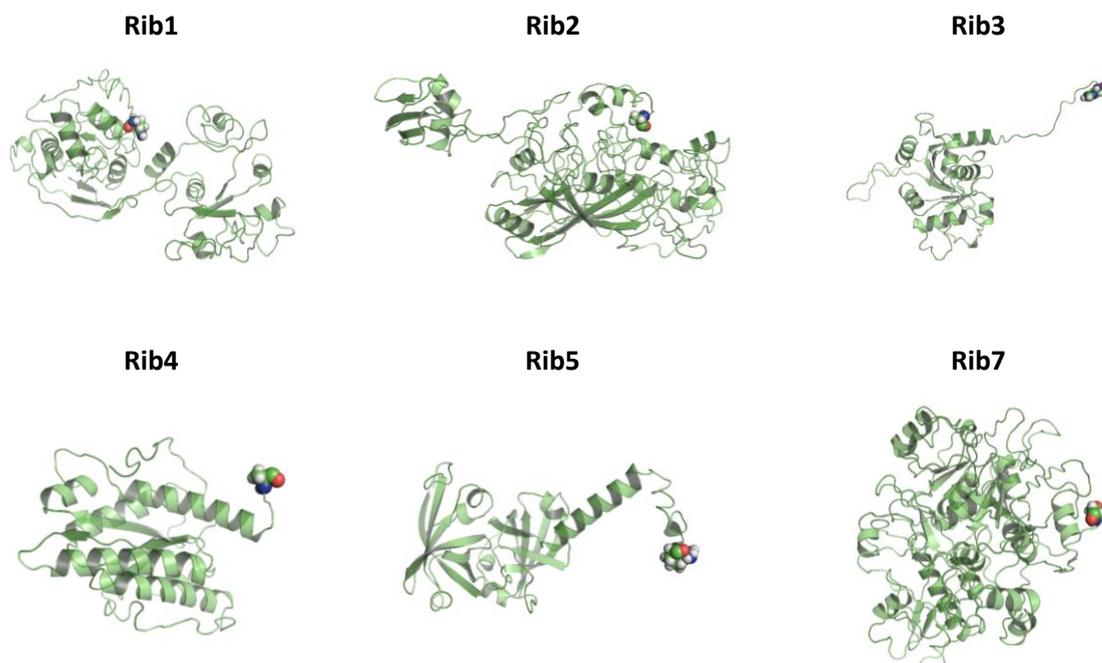


Abbildung 22: Vorhergesagte 3-D Strukturen der Riboflavinsynthese-Enzyme in *A. nidulans*. Die Tertiärstruktur der Proteine ist grünlich blass dargestellt. Hervorgehoben ist jeweils die letzte Aminosäure am C-Terminus jedes Proteins. Die Größen der dargestellten Enzyme sind nicht maßstabsgetreu. Modelliert wurden die Enzyme mit dem Algorithmus von "I-TASSER" (Roy *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2012; Zhang, 2008) und grafisch dargestellt mit dem Programm PyMol (Schrödinger, 2010).

Die Qualität der Vorhersage wird bei der Modellierung als "C-Score" angegeben. Dieser liegt zwischen -5 und 2, wobei 2 eine sehr gute Qualität angibt. Der "TM-Score" ist ein Wert für die Präzision der Vorhersage. Ein Wert kleiner als 0,17 gibt dabei eine sehr ungenaue Struktur an, während ein Wert über 0,5 ein korrektes Modell verspricht (Zhang & Skolnick, 2004). Die Qualität und Exaktheit des wahrscheinlichsten Modells für die Enzyme der Riboflavin-Biosynthese sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Qualität (C-Score) und Genauigkeit (TM-Score) der vorhergesagten Proteinmodelle der Riboflavin-Biosyntheseenzyme (Rib) in *A. nidulans*

Rib	C-Score	TM-Score
1	-1,84	0,49±0,15
2	-3,13	0,36±0,12
3	0,9	0,84±0,08
4	-0,55	0,64±0,13
5	-0,23	0,68±0,12
7	-3,08	0,37±0,12

Durch die Modellierung der Enzyme ergab sich, dass die C-Termini von allen Enzymen, die in *A. nidulans* an der Riboflavin-Biosynthese beteiligt sind, oberflächlich liegen. Bei Rib1, Rib2 und Rib7, den drei größten Enzymen (Tabelle 5), liegt der C-Terminus relativ nahe an weiter innen liegenden α -Helizes. Bei Rib3, Rib4 und Rib5 sind die C-Termini isoliert und weit genug von anderen Strukturen entfernt, sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, dass das Fusionieren mit dem CAAX-Motiv keine Auswirkung auf die Funktion der Proteine haben wird. Ob die Enzyme in *A. nidulans* durch eine C-terminale Fusion des CAAX-Motives an der Membran verankert werden können, wurde deshalb experimentell untersucht.

Lokalisation der Riboflavin-Biosyntheseenzyme

Es ist bekannt, dass Riboflavin in Eukaryoten im Zytoplasma synthetisiert wird (Garcia-Ramirez *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1995). Die Enzyme der Riboflavin-Biosynthese liegen laut Informationen der *Aspergillus*-Datenbank (Cerqueira *et al.*, 2014) ebenfalls im Zytoplasma vor. Da die Enzyme in *A. nidulans* noch wenig erforscht sind, wurde jedes entweder mit GFP oder RFP fusioniert um somit die Lage innerhalb des Wildtyps nachzuweisen (Abbildung 23).

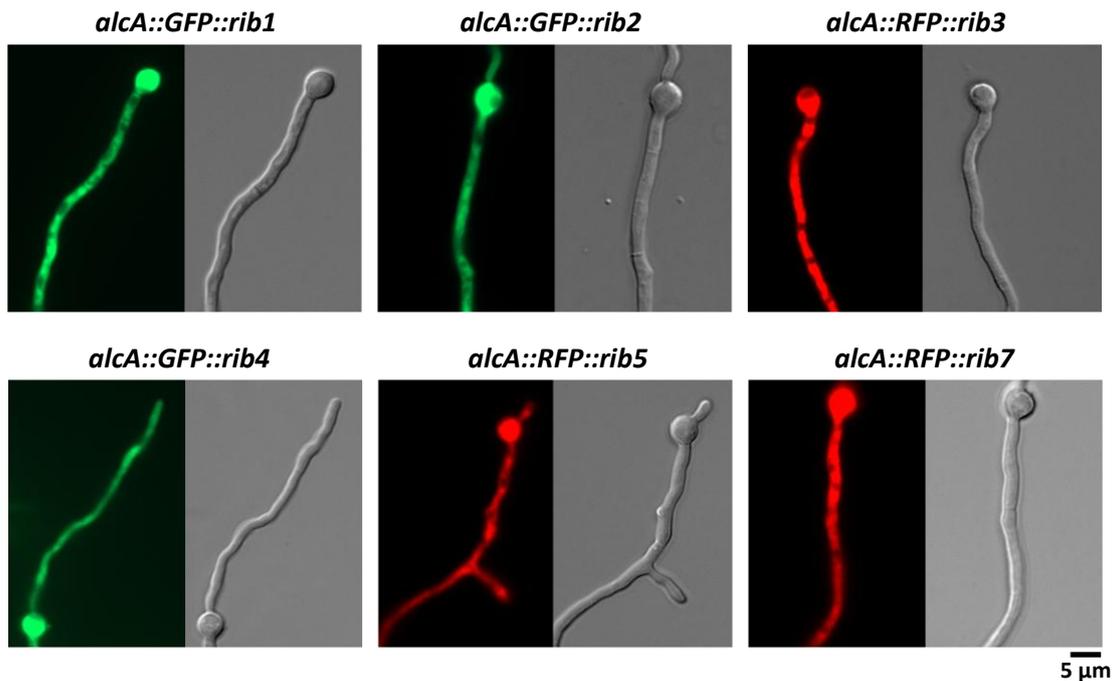


Abbildung 23: Lokalisation der Enzyme der Riboflavin-Biosynthese im Wildtyp. An alle sechs Enzyme wurde N-terminal entweder GFP (*A. nidulans* SAH57 (*alca::GFP::rib1*), SAH64 (*alca::GFP::rib2*) und SAH44 (*alca::GFP::rib4*)) oder RFP (*A. nidulans* SAH59 (*alca::RFP::rib3*), SAH45 (*alca::RFP::rib5*) und SAH50 (*alca::RFP::rib7*)) fusioniert und alle Stämme wurden bei 28°C über Nacht in Mikroskopiemedium mit Glycerin inkubiert und am folgenden Tag mikroskopisch ausgewertet.

In den Stämmen *A. nidulans* SAH57 (*alca::GFP::rib1*), SAH64 (*alca::GFP::rib2*), SAH59 (*alca::RFP::rib3*), SAH44 (*alca::GFP::rib4*), SAH45 (*alca::RFP::rib5*) und SAH50 (*alca::RFP::rib7*) wurde die Position der Enzyme im Wildtyp analysiert. Die Expression der Gene wurde mit dem *alca*-Promotor reguliert. Für die Mikroskopie wurde Mikroskopiemedium mit zwei Prozent Glycerin verwendet. Alle Stämme zeigten ein diffuses Signal über die komplette Hyphe, typisch für eine Lokalisation im Zytoplasma.

Verankerung der Enzyme Rib3, Rib4 und Rib5 in der Membran

Nach der Lokalisation von GFP-CAAX in der Zellmembran und den Riboflavinbiosynthese-Enzymen im Zytoplasma (Abbildung 21 und 23) sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob die Proteine nach einer Fusion mit dem CAAX-Motiv am C-Terminus ausschließlich in der Zellmembran zu finden sind.

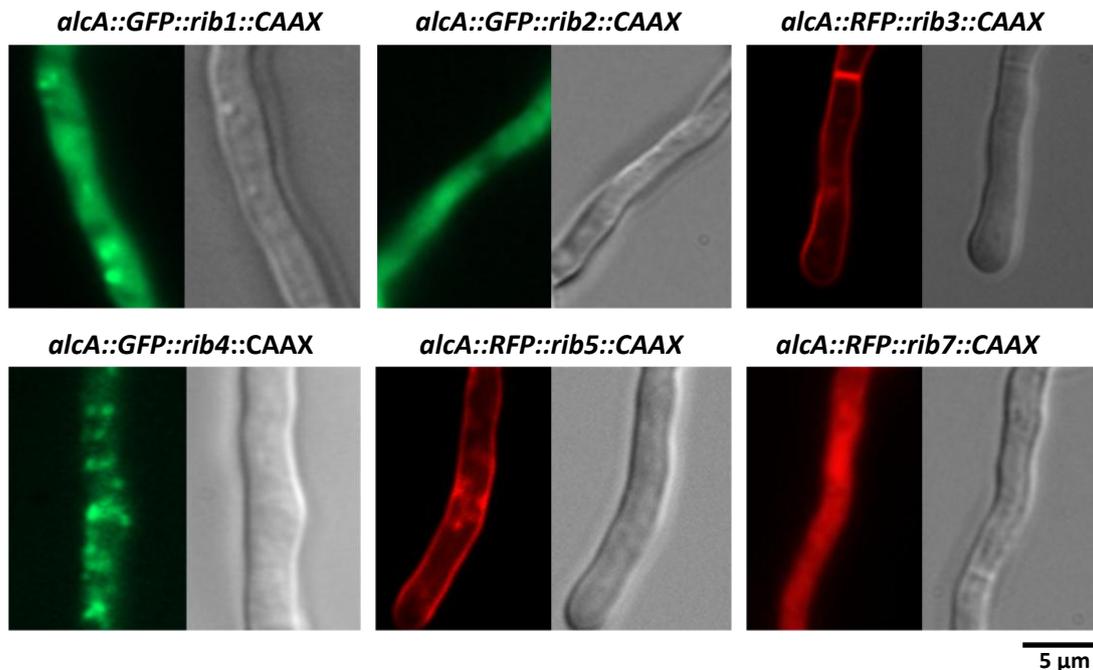


Abbildung 24: Lokalisation der Enzyme der Riboflavin-Biosynthese mit CAAX-Motiv am C-Terminus. Alle sechs Enzyme wurden N-terminal mit GFP oder RFP und C-terminal mit dem CAAX-Motiv markiert. *A. nidulans* SAH63 (*alcA::GFP::rib1::CAAX*) SAH60 (*alcA::RFP::rib3::CAAX*), SAH62 (*alcA::GFP::rib2::CAAX*), SAH58 (*alcA::GFP::rib4::CAAX*), SAH48 (*alcA::RFP::rib5::CAAX*) und SAH61 (*alcA::RFP::rib7::CAAX*) wurden bei 28°C über Nacht in Mikroskopiemedium mit zwei Prozent Glycerin inkubiert und am folgenden Tag mikroskopisch untersucht.

A. nidulans SAH63 (*alcA::GFP::rib1::CAAX*) zeigte eine diffuse Verteilung von Rib1, welches teilweise in bestimmten Bereichen akkumulierte (Abbildung 23). *A. nidulans* SAH62 (*alcA::GFP::rib2::CAAX*) und SAH61 (*alcA::RFP::rib7::CAAX*) zeigten eine zytoplasmatische Lokalisation der Enzyme Rib2 und Rib7. Bei SAH60 (*alcA::RFP::rib3::CAAX*) und SAH48 (*alcA::RFP::rib5::CAAX*) lokalisierten die Enzyme Rib3 und Rib5 an der Zellwand, was die Septen mit einschließt. SAH58 (*alcA::GFP::rib4::CAAX*) zeigte eine Akkumulationen von Rib4 an der Zellwand und im Zytoplasma. Die Verteilung innerhalb der Zelle kann mit Abbildung 21B (*alcA::GFP::CAAX*) verglichen werden.

Untersuchung der Bildung von Riboflavin

Die Messung der von jedem Stamm produzierten Riboflavin-, FMN-, und FAD-Menge erfolgte per HPLC (*high performance liquid chromatography*). Für die Etablierung dieser Methode wurden zuerst Standards der zu untersuchenden Stoffe gemessen. Diese wurden in $\mu\text{mol/L}$ (μM) angesetzt.

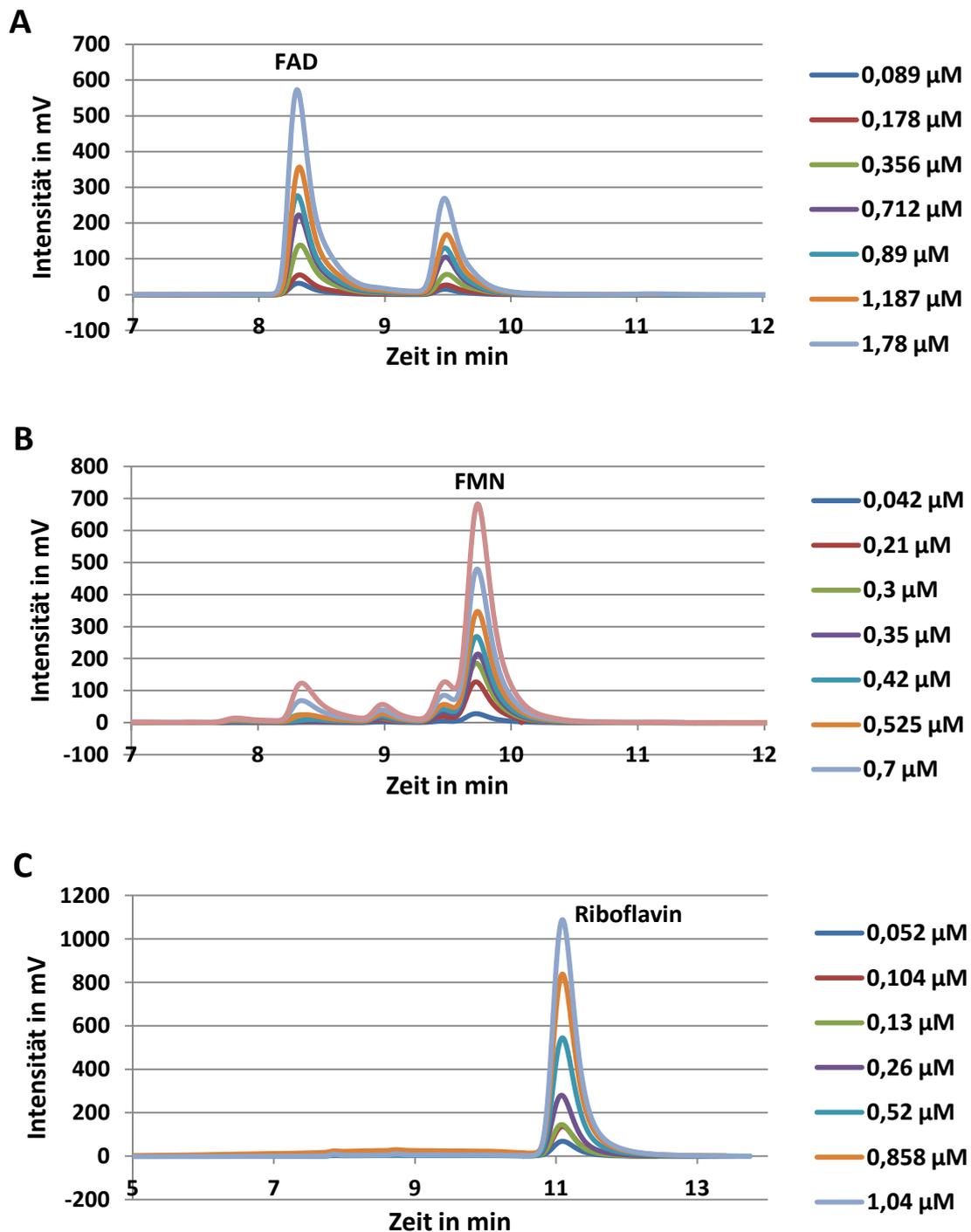


Abbildung 25: HPLC-Diagramme der Standards von (A) FAD, (B) FMN und (C) Riboflavin. Zur Etablierung der Messung von FAD, FMN und Riboflavin und der späteren Auswertung der produzierten Stoffmengen wurden die Stoffe in verschiedenen Konzentrationen mittels HPLC gemessen. Die Extinktionswellenlänge für FAD, FMN und Riboflavin liegt bei 445 nm. Detektiert wurden die Messungen bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm. Die Retentionszeit von FAD war 8,1 Minuten; von FMN 9,7 Minuten und von Riboflavin 11,1 Minuten.

Für FAD, FMN und Riboflavin wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen gemessen (Abbildung 25). Dies diente zum einen dazu, die Flächen unter den Peaks für die spezifischen Konzentrationen zu ermitteln um damit Standardkurven (Abbildung 26) für die Errechnung der produzierten Stoffkonzentrationen der Mutanten erstellen zu können; zum anderen diente es dazu die Retentionszeiten der Stoffe für diesen speziellen Versuchsaufbau zu ermitteln. Diese waren für FAD 8,1 Minuten, für FMN 9,7 Minuten und für Riboflavin 11,2 Minuten. Diese Standardkurve wurde zur Identifikation der Stoffe in anderen Messungen herangezogen, da die Retentionszeit stoffspezifisch ist. Die zusätzlichen Peaks von FMN sind damit zu begründen, dass FMN chemisch hergestellt wurde und dabei zusätzliche Derivate anfielen. Bei FAD ist eine Verunreinigung der Probe der wahrscheinlichste Grund für den zusätzlichen Peak. Da allerdings bei diesem HPLC-Aufbau FAD vor FMN von der Säule gewaschen wird (Erfahrungswert), ist die Retentionszeit von FAD mit 8,1 Minuten eindeutig.

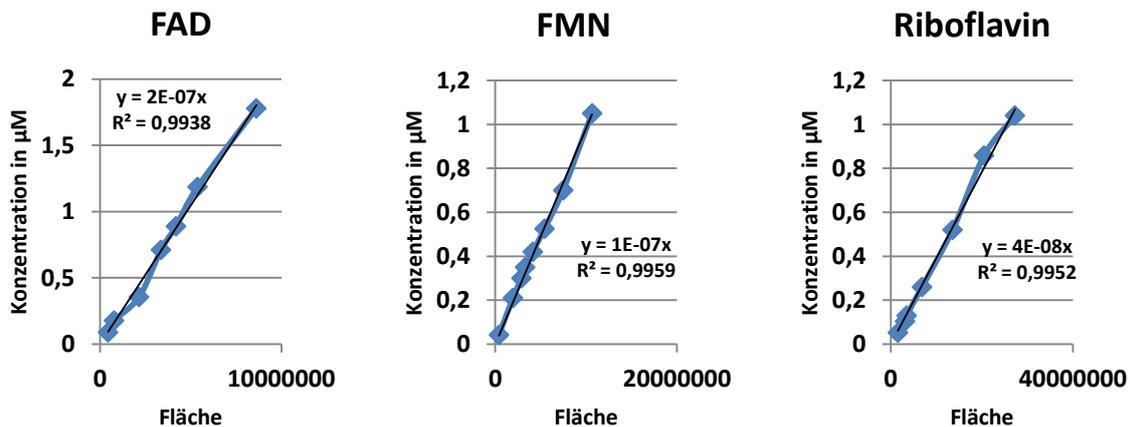


Abbildung 26: Standardkurven von FAD, FMN und Riboflavin. Nach der Messung der Standards mittels HPLC wurden die Flächen der Peaks ermittelt und in einem Diagramm den Stoffmengenkonzentrationen gegenübergestellt. Das Verhältnis verhielt sich nahezu linear (Trendlinie). In der Formel der Regressionsgeraden gibt R^2 die Genauigkeit der Messung wieder. Je näher R^2 an 1 liegt, desto höher die Genauigkeit. Die Formel wurde später zur Errechnung der Stoffkonzentrationen der einzelnen Stämme verwendet.

Die Standardkurven wurden aus der Gegenüberstellung der ermittelten Flächen der Peaks jeder HPLC-Messung für die unterschiedlichen Stoffmengenkonzentrationen erstellt. Anhand der Trendlinie wurde die Formel der Regressionsgeraden für die Errechnung der Konzentration der produzierten Stoffmenge in den generierten Stämmen erstellt.

Für die letztendliche Berechnung der in Flüssigkultur produzierten Menge von FAD, FMD und Riboflavin eines einzelnen Stammes wurde die Fläche des spezifischen Peaks (Retentionszeit) für die Stoffe ermittelt und in die Formel eingesetzt. Danach wurde das Ergebnis durch das Trockengewicht des Myzels der Kultur dividiert und man erhielt die Stoffmengenkonzentration pro Gramm Trockengewicht.

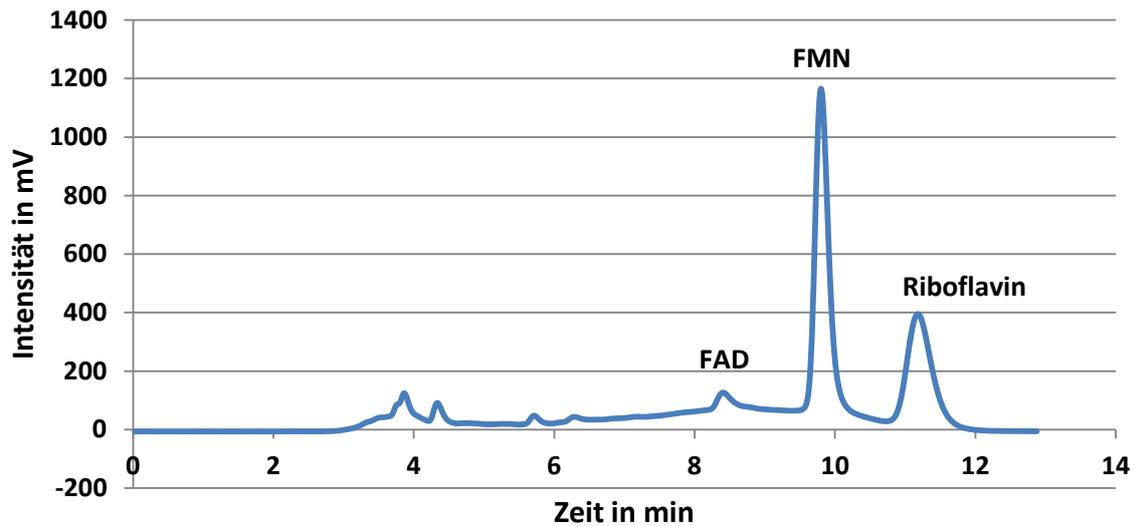


Abbildung 27: HPLC-Messung des Zellextraktes von SAH49 auf Glukose. Detektiert wurden die Messungen bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm. Die Fläche der "Peaks" wurde mit der Software "ChromStar 7" der Firma SCPA ermittelt und für die Quantifizierung verwendet. Die Peaks wurden anhand der Retentionszeiten identifiziert, die mittels der Standards ermittelt wurden (Abbildung 25).

Um die Gesamtproduktion eines Stammes zu bestimmen, wurde für die Produktion von FAD, FMN und Riboflavin jeweils für das Myzel (intrazellulär) und den Überstand (extrazellulär) eine separate Messung durchgeführt und die Werte addiert. Da aus einem Molekül Riboflavin ein Molekül FMN und daraus ein Molekül FAD entsteht (Abbildung 17), wurden alle drei Stoffe gemessen, die Stoffmengen mittels der molaren Masse in mg/L umgerechnet, addiert und in den nachfolgenden Diagrammen als ein Balken dargestellt. Zur besseren Benennung und Abgrenzung von dem Wort "Gesamtproduktion", das die Addition von intrazellulärer und extrazellulärer Produktion beschreibt, wurde die Addition aus FAD, FMN und Riboflavin von einem Stamm als "FFR" bezeichnet. Je Stamm wurden zwei biologische Replikate (1 und 2) gemessen und getrennt voneinander dargestellt, da ein Mittelwert aus zwei Messungen keine statistische Aussagekraft hätte.

Riboflavin-Produktion ist unabhängig von der eingesetzten C-Quelle

Riboflavin ist essentiell für das Überleben eines Organismus. Ohne die Kofaktoren FAD und FMN können wichtige Prozesse wie die Atmungskette zur Energiegewinnung nicht ablaufen. Im Gegensatz zu vielen anderen Organismen, können Pilze wie *A. nidulans* Riboflavin selbst herstellen. Da der Grundumsatz von FMN und FAD (und somit von Riboflavin) in jedem Stamm unter gleichen Bedingungen nahezu identisch ist, kann dieser Faktor vernachlässigt werden. Es wurde gezeigt, dass es Organismen gibt, welche auf natürliche Weise große Mengen an Riboflavin erzeugen (zum Beispiel *A. gossypii*). Um zu Überprüfen, wie viel Riboflavin in *A. nidulans* produziert wird und ob ein Überschuss besteht, wurden die Konzentrationen der Gesamtproduktion (intra- und extrazellulär) von FAD, FMN und Riboflavin (FFR) von zwei Wildtypen (SRF200 und GR5) mittels HPLC gemessen.

Die Messung erfolgte nach fünf Tagen Wachstum in RPM (Riboflavin-Produktionsmedium) bei 28°C und 200 rpm im Schüttelinkubator.

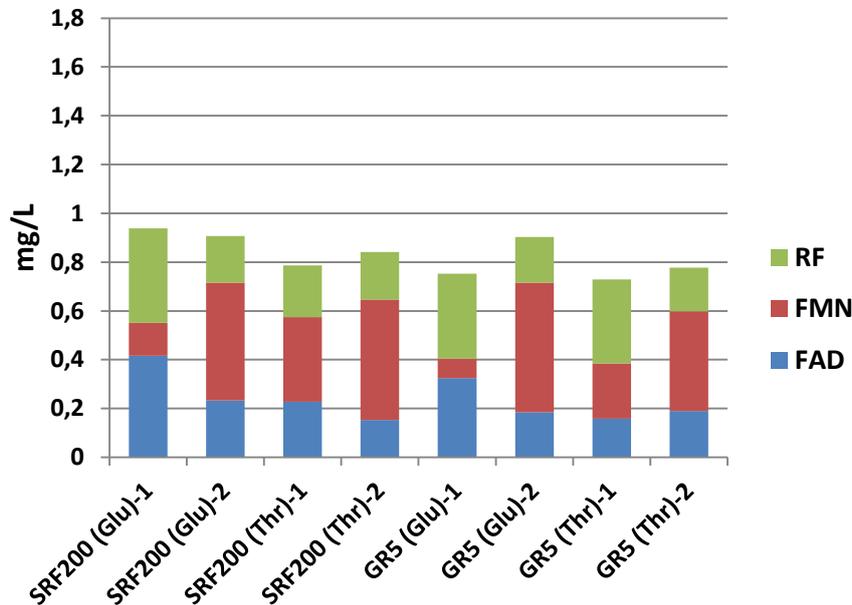


Abbildung 28: Gesamtproduktion von FFR der Wildtypen SRF200 und GR5 unter Einsatz der Kohlenstoffquellen Glukose (Glu) und Threonin (Thr). Diese wurde mittels HPLC ermittelt. Nach der Messung wurden die Flächen der Peaks in die jeweilige Standardkurve für FMN, FAD und Riboflavin eingesetzt und das Trockengewicht mit eingerechnet ($\mu\text{M/g}$ Trockengewicht). Durch die Berücksichtigung der molaren Masse konnte die Menge pro Liter in Abhängigkeit des Trockengewichtes des Myzels ermittelt werden (mg/L). Die Bezeichnung 1 und 2 stellt jeweils zwei biologische Replikate des Stammes dar. Für die Darstellung wurden die errechneten Konzentrationen der produzierten Stoffe aus dem Myzel und dem Überstand einer Probe addiert (Gesamtproduktion). Jeder Balken stellt außerdem eine Addition der Konzentration von FMN, FAD und Riboflavin (FFR) dar. Die Stämme wurden bei 28°C für fünf Tage schüttelnd inkubiert.

Die biologischen Replikate (1 und 2) der Wildtypen SRF200 und GR5 produzieren etwa gleich viel FFR (zwischen 0,75 und 0,9 mg/L pro Gramm Trockengewicht) (Abbildung 28). Sowohl die Replikate als auch die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen Glukose und Threonin ergaben ein sehr ähnliches Ergebnis.

Überexpression von *rib3*, *rib4* und *rib5* steigert die Riboflavinproduktion

Durch die C-terminale Fusion des CAAX-Motives und gleichzeitiger N-terminale Fusion von Fluoreszenzproteinen an die Enzyme der Riboflavin-Biosynthese (Abbildung 24) konnte festgestellt werden, dass die Enzyme Rib1, Rib2 und Rib7 trotz CAAX-Motivs nicht in der Membran lokalisiert waren. Die Theorie Zellmembranen als biotechnologische Oberflächen zu nutzen setzt dies jedoch voraus. Um eine Produktionssteigerung von Riboflavin auf Grundlage dieser Theorie nachzuprüfen,

wurden im Folgenden nur noch die Enzyme Rib3, Rib4 und Rib5 betrachtet. Besonderer Fokus lag dabei auf den beiden letzten Enzymen der Biosynthese Rib4 und Rib5.

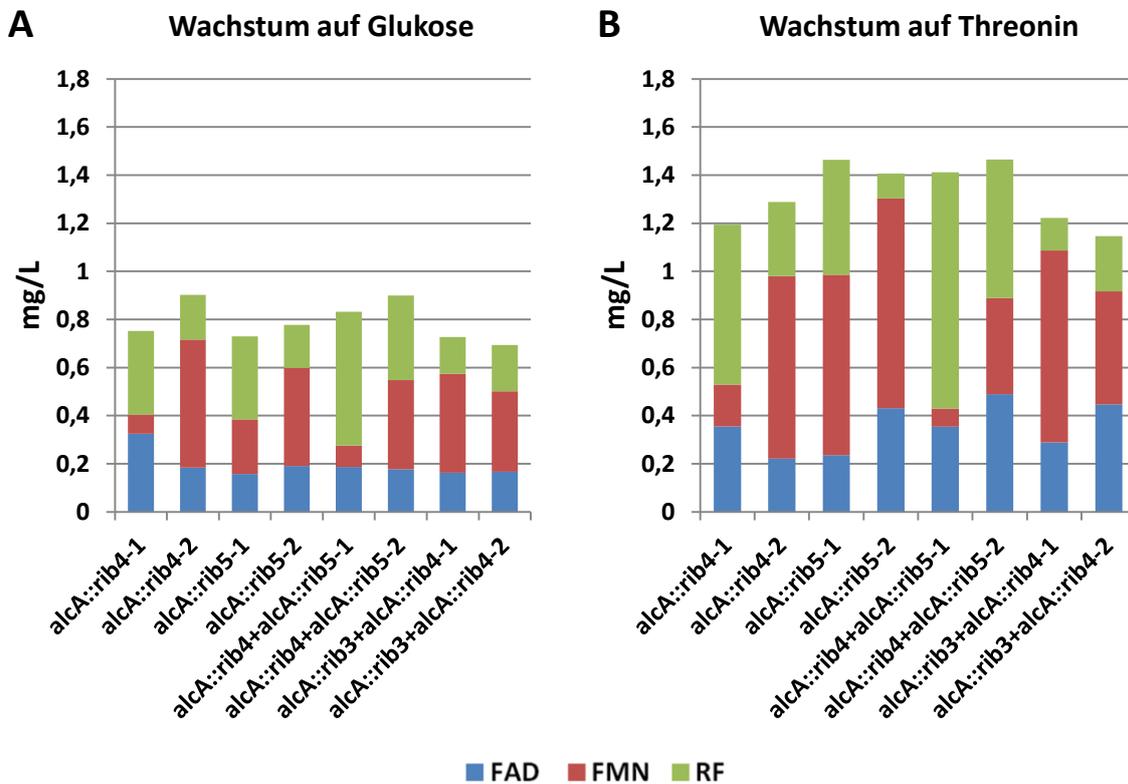


Abbildung 29: Gesamtproduktion von FFR ohne CAAX-Motiv bei (A) inhibierenden oder (B) induzierenden Bedingungen. Diese wurde mittels HPLC ermittelt. Nach der Messung wurden die Flächen der Peaks in die jeweilige Standardkurve für FMN, FAD und Riboflavin eingesetzt und das Trockengewicht mit eingerechnet ($\mu\text{M/g}$ Trockengewicht). Durch die Berücksichtigung der molaren Masse konnte die Menge pro Liter in Abhängigkeit des Trockengewichtes des Myzels ermittelt werden (mg/L). Die Bezeichnung 1 und 2 stellt jeweils zwei biologische Replikate des Stammes dar. Für die Darstellung wurden die errechneten Konzentrationen der produzierten Stoffe aus dem Myzel und dem Überstand einer Probe addiert (Gesamtproduktion). Jeder Balken stellt außerdem eine Addition der Konzentrationen von FMN, FAD und Riboflavin (FFR) dar. Gezeigt sind Überexpressionen der Gene *rib4* (SAH39), *rib5* (SAH40), die Kombination aus den Genen *rib4* und *rib5* (SAH43) und die Kombination aus *rib3* und *rib4* (SAH56). Die Stämme wurden bei 28°C und 200 rpm für fünf Tage inkubiert.

Um eine Vergleichsmöglichkeit zu haben, wie sich *A. nidulans* bei Überexpression bestimmter Riboflavingene verhält, wurden die Gene *rib4* (*A. nidulans* SAH39), *rib5* (SAH40), die Kombination aus den Genen *rib4* und *rib5* (SAH43) und die Kombination aus *rib3* und *rib4* (SAH56) mit Hilfe des *alca*-Promotors überexprimiert. Als Kontrolle wurden alle Stämme in RPM (Riboflavinproduktionsmedium) mit Threonin (Abbildung 29B) und Glukose inkubiert (Abbildung 29A). Die Messung erfolgte mittels HPLC.

Die biologischen Replikate (1 und 2) der Stämme wurden nicht gemittelt sondern getrennt voneinander dargestellt, da zwei Werte keine Statistik ergeben. Sie zeigten allerdings fast identische Werte. Wenn die Mutanten in RPM mit Glukose (Abbildung 29A) inkubiert wurden, verhielten sich SAH39, SAH40, SAH43 und SAH56 in etwa wie die Wildtypen (Abbildung 28). Die Gesamtproduktion von FFR lag zwischen 0,75 und 0,9 mg/L pro Gramm Trockenmasse. Im Falle einer Inkubation in RPM

mit Threonin (Abbildung 29B) (Überexpressionsbedingungen), konnte SAH39 (*alcA::rib4*) 1,5-mal mehr FFR produzieren als in Medium mit Glukose. In SAH40 (*alcA::rib5*) war mit 1,9-mal mehr FFR die höchste Steigerung zu beobachten. SAH43 (*alcA::rib4* und *alcA::rib5*) produzierte im Vergleich zu Wachstum auf Glukose 1,66-mal mehr FFR bei Induktion der Gene. Bezüglich der absoluten Werte produzierte SAH43 in RPM mit Threonin aber genauso viel FFR (1,43 mg/L pro Gramm Trockenmasse) wie SAH40 (1,43 mg/L) und mehr als SAH39 (1,24 mg/L). SAH56 (*alcA::rib3* und *alcA::rib4*) konnte bei Induktion 1,18 mg/L FFR produzieren was 1,66-mal mehr FFR im Gegensatz zum Wachstum auf Glukose darstellt.

Membranlokalisierung von Rib4 hat einen Einfluss auf die Riboflavinproduktion

Zur Untersuchung der Produktion der Riboflavin-Biosynthese durch Verlagerung gewisser Enzyme der Biosynthese in die Zellmembran und die Nutzung dieser als biotechnologische Oberfläche wurden die gleichen Gene wie aus dem vorigen Abschnitt nicht nur überexprimiert, sondern zusätzlich am C-Terminus mit dem CAAX-Motiv markiert. Somit können Produktionsunterschiede von Riboflavin zwischen Überexpression alleine (Abbildung 29B) und einer zusätzlichen Membranlokalisierung der Proteine ermittelt werden (Abbildung 30B).

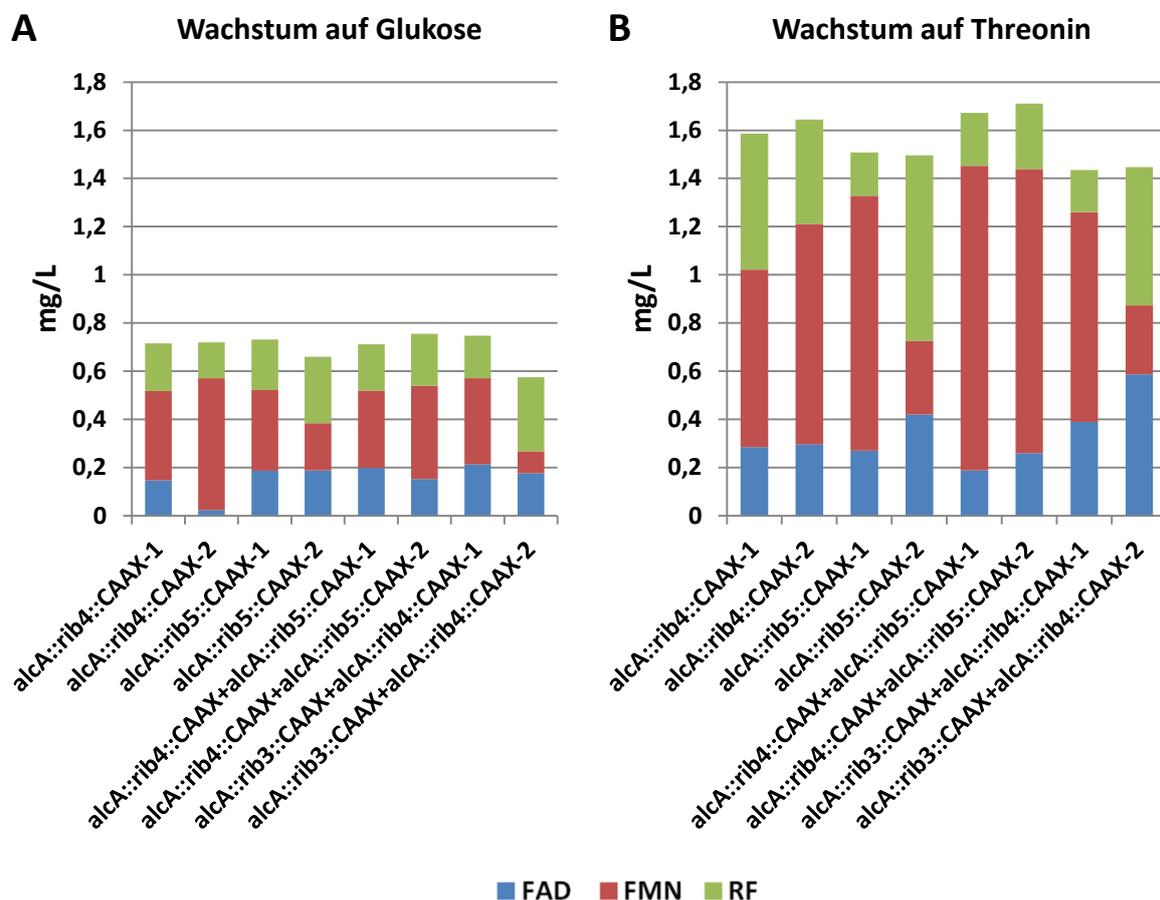


Abbildung 30: Gesamtproduktion von FFR mit CAAX-Motiv bei (A) inhibierenden und (B) induzierenden Bedingungen. Diese wurde mittels HPLC ermittelt. Nach der Messung wurden die Flächen der Peaks in die jeweilige Standardkurve für

FMN, FAD und Riboflavin eingesetzt und das Trockengewicht mit eingerechnet ($\mu\text{M/g}$ Trockengewicht). Durch die Berücksichtigung der molaren Masse konnte die Menge pro Liter in Abhängigkeit des Trockengewichtes des Myzels ermittelt werden (mg/L). Die Bezeichnung 1 und 2 stellt jeweils zwei biologische Replikate des Stammes dar. Für die Darstellung wurden die errechneten Konzentrationen der produzierten Stoffe aus dem Myzel und dem Überstand einer Probe addiert (Gesamtproduktion). Jeder Balken stellt außerdem eine Addition der Konzentrationen von FMN, FAD und Riboflavin (FFR) dar. Gezeigt sind die Gene *rib4* (SAH49), *rib5* (SAH52), die Kombination aus den Genen *rib4* und *rib5* (SAH51) und die Kombination aus *rib3* und *rib4* (SAH53) die mit dem *alcA*-Promotor N-terminal und dem CAAX-Motiv C-terminal markiert wurden.

Um eine Überexpression der Gene und spätere Membranlokalisierung der Proteine herbeizuführen, wurden die Gene *rib4* (SAH49), *rib5* (SAH52), die Kombination aus den Genen *rib4* und *rib5* (SAH51) und die Kombination aus *rib3* und *rib4* (SAH53) mit dem *alcA*-Promotor N-terminal und dem CAAX-Motiv C-terminal markiert. Die Stämme wurden fünf Tage in RPM mit Glukose oder Threonin bei 28 °C schüttelnd inkubiert und danach wurde die FFR-Produktion mittels HPLC gemessen.

Auch hier sind die biologischen Replikate (1 und 2) der Stämme einzeln aufgeführt, da eine Mittelung zweier Messwerte keine statistische Aussagekraft hat. Sie waren nahezu identisch. In RPM mit Glukose (Kontrollbedingungen) (Abbildung 30A) zeigten die Stämme eine vergleichbare FFR-Produktion (0,66 bis 0,75 mg/L) zu den Wildtypen (Abbildung 28). Bei Induktion (Abbildung 30B) produzierte SAH49 (*alcA::rib4::CAAX*) 2,25 mal mehr FFR als auf Glukose (1,61 mg/L). Im Vergleich zu SAH39 (*alcA::rib4*) auf Threonin konnte die 1,3-fache Menge erreicht werden. SAH52 (*alcA::rib5::CAAX*) produzierte bei Wachstum auf Threonin (1,5 mg/L) 2,15 mal mehr FFR als auf Glukose (0,7 mg/L). Dieser Stamm produzierte durch Induktion minimal mehr FFR als SAH40 (*alcA::rib5*) bei gleichen Bedingungen. SAH51 (*alcA::rib4::CAAX* und *alcA::rib5::CAAX*) konnte durch Induktion eine Konzentration von 1,69 mg/L pro Gramm Trockenmasse erreichen. Das ist 2,3 mal so viel wie ohne Induktion und 1,17 mal mehr als SAH43 (*alcA::rib4* und *alcA::rib5*). SAH53 (*alcA::rib3::CAAX* und *alcA::rib4::CAAX*) produzierte auf Threonin (Induktion) 1,44 mg/L . Das war 2,17-mal so viel FFR wie auf Glukose und 1,21 mal mehr als der Stamm SAH56 (*alcA::rib3* und *alcA::rib4*).

Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Kohlenstoffquelle

A. nidulans wächst auf verschiedenen Kohlenstoffquellen unterschiedlich gut. Da die Gene der Riboflavin-Mutanten unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors stehen, wurden sie zur Kontrolle in RPM mit Glukose und für die Induktion in RPM mit Threonin inkubiert (Felenbok, 1991). Produktionsunterschiede können auch daher kommen, dass ein Stamm grundsätzlich höhere Mengen Biomasse produziert und somit eine höhere Riboflavin-Produktion aufweist. Da dieser Faktor durch Einbeziehen des Trockengewichts in den Abbildungen 28, 29 und 30 berücksichtigt wurde, sind die Daten somit unabhängig von der Menge der Biomasse des Stammes dargestellt.

Tabelle 7: Menge der Trockenmasse der Wildtyp- und Riboflavin-Produktionsstämme von Abbildung 28, 29 und 30.

Stamm	Genotyp	Glukose		Threonin	
		1	2	1	2
SRF200	WT	1	1,2	8	1,05
GR5	WT	1	1,3	0,9	1,1
SAH39	<i>alcA::rib4</i>	1,3	1,3	0,7	0,8
SAH40	<i>alcA::rib5</i>	1,3	1,1	0,6	0,8
SAH43	<i>alcA::rib4</i> und <i>alcA::rib5</i>	1,3	1,3	0,7	0,8
SAH56	<i>alcA::rib3</i> und <i>alcA::rib4</i>	1	1,2	0,8	0,9
SAH49	<i>alcA::rib4::CAAX</i>	1,2	1,3	0,7	0,7
SAH52	<i>alcA::rib5::CAAX</i>	1,1	1,2	0,8	0,7
SAH51	<i>alcA::rib4::CAAX</i> und <i>alcA::rib5::CAAX</i>	1,1	1,1	0,6	0,75
SAH53	<i>alcA::rib3::CAAX</i> und <i>alcA::rib4::CAAX</i>	1	1	0,8	0,7

Die Menge Trockenmasse der Wildtyp- wie auch der Riboflavin-Produktionsstämme liegen jeweils bei Wachstum auf Glukose oder Threonin in der gleichen Größenordnung. Vergleicht man das Wachstum auf den beiden Kohlenstoffquellen lassen sich Unterschiede von 0,2 - 0,7 Gramm erkennen. Auf Glukose wird somit je nach Stamm etwa 1,3 bis 1,8 mal mehr Biomasse als auf Threonin gebildet. Die Unterschiede sind in den Wildtypstämmen weniger stark ausgeprägt als in den Riboflavin-Produktionsstämmen (Tabelle 7).

CAAX-Motiv übt keinen Einfluss auf die Aktivität von Rib4 und Rib5 aus

Durch die Überexpression von *rib4* und *rib5* konnte die Riboflavin-Produktion gesteigert werden (Abbildung 29B). Durch eine Positionierung von Rib4 in der Membran wurde sie noch einmal erhöht (Abbildung 30B). Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Enzyme im aktiven Zustand vorliegen und ob es einen Mengenunterschied zwischen den Versionen mit oder ohne CAAX-Motiv gibt, welcher die Produktion beeinflussen könnte. Es wurden sowohl die Dismutation von DMRL zu Riboflavin, katalysiert durch die Riboflavin-Synthase Rib5, als auch die Kondensation von ArP und DHBP zu DMRL, katalysiert von der Lumazin-Synthase Rib4 genauer untersucht (Abbildung 16). Da die Reaktion von Rib4 vor Rib5 geschaltet ist, ist es denkbar, dass eine Überexpression von *rib4* einen Einfluss auf die Enzymreaktion von Rib5 hat. Es könnte daher möglich sein, die Reaktion der Lumazin-Synthase (Rib4) indirekt durch einen Riboflavin-Synthase (Rib5)-spezifischen Enzymversuch nachzuweisen. Aus diesem Grund wurden neben dem Wildtyp SRF200 zusätzlich zu den Stämmen SAH40 (*alcA::rib5*) und SAH52 (*alcA::rib5::CAAX*), die Stämme SAH39 (*alcA::rib4*), SAH43 (*alcA::rib4* und *alcA::rib5*), SAH49 (*alcA::rib4::CAAX*) und SAH51 (*alcA::rib4::CAAX* und *alcA::rib5::CAAX*) in den Enzymversuch mit DMRL mit einbezogen.

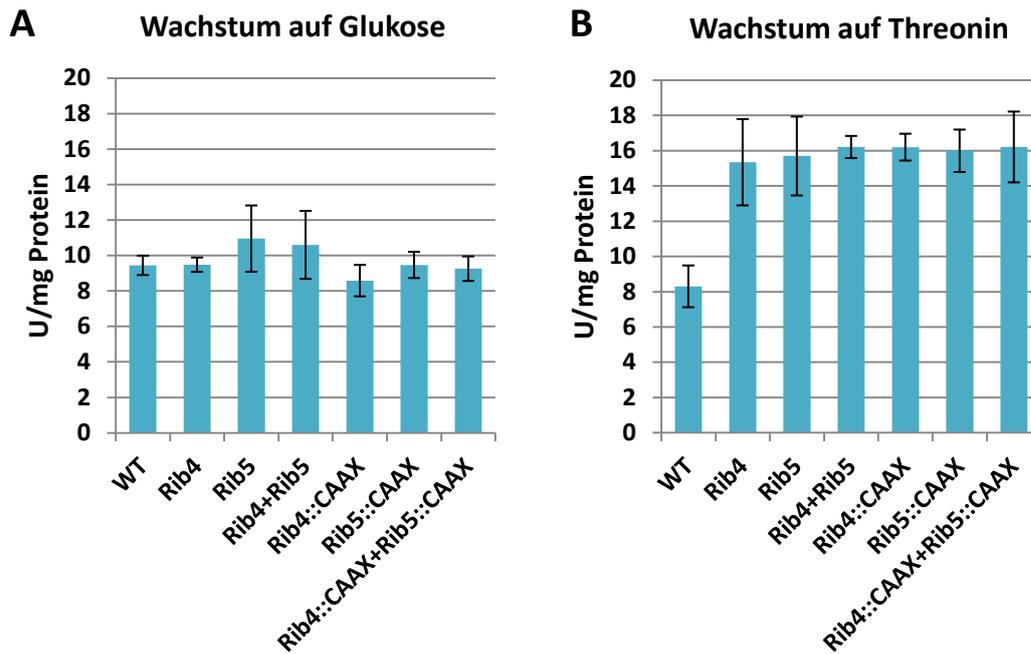


Abbildung 31: Menge von aktivem Rib5 in verschiedenen Riboflavin-Mutanten. Die Stämme wurden fünf Tage in RPM bei 28°C unter (A) inhibierenden oder (B) induzierenden Bedingungen inkubiert. Gezeigt sind die Stämme SAH40 und SAH52, bei denen *rib5* ohne und mit CAAX-Motiv reguliert ist; SAH39 und SAH49, bei denen *rib5* nur indirekt beeinflusst werden konnte und SAH43 und SAH51, bei denen *rib5* in Kombination mit *rib4* reguliert wurde.

Für die Bestimmung der aktiven Menge Rib5 wurden die Stämme wie für die HPLC-Analyse inkubiert (fünf Tage in RPM mit Glukose oder Threonin bei 28°C) und geerntet. Wachstum auf Glukose führte zu ähnlichen Werten Riboflavin-Synthase (Rib5) Aktivität in den gentechnisch veränderten Stämmen wie im Wildtyp (8-11 Units pro mg Protein) (Abbildung 31A). Nur SAH40 (Überexpression von *rib5*) und SAH43 (Überexpression von *rib4* und *rib5*) zeigten eine leicht erhöhte Rib5-Aktivität (9-13 U/mg Protein). Durch eine Induktion mittels Threonin zeigte der Wildtyp die gleichen Rib5 -Werte(8 U/mg) wie bei Wachstum in Glukose (Abbildung 31B). Alle Mutanten lieferten etwa 16 U/mg Rib5, unabhängig davon ob die Proteine mit CAAX-Motiv fusioniert waren oder nicht. Das bedeutet zum einen, dass die Expression der Riboflavin-Synthase von der der Lumazin-Synthase abhängig ist. Zum anderen kann damit belegt werden, dass die gesteigerte Riboflavin-Produktion durch die Membranverankerung zustande kam und nicht durch eine höhere Menge Enzym.

Diskussion

Die Produktionssteigerung von Primär- oder Sekundärmetaboliten war und ist eine wichtige Aufgabe der Biotechnologie um beispielsweise den Bedarf der Menschheit an Nahrungsmitteln und Medikamenten zu decken. Im ersten Teil der Arbeit wurde der Ansatz verfolgt Enzyme einer Biosynthese aus dem Zytoplasma in die Peroxisomen zu transferieren. In diesem Teil sollten die Enzyme der Riboflavin-Biosynthese in der Membran verankert werden um diese als biotechnologische Oberfläche nutzbar zu machen und eine Steigerung der Riboflavinproduktion zu erreichen. Kurze Wege und eine direkte Verfügbarkeit von Grundbausteinen haben sich als effiziente Strategie bewährt, welche unter anderem in der Auto- oder Lebensmittelindustrie Anwendung findet. Auf die Zelle übertragen bedeutet dies durch eine Verankerung der Enzyme in der Zellmembran eine Nähe zu erzeugen, die im Zytoplasma so nicht gegeben ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Zwischenprodukt der Riboflavinsynthese direkt auf das nächste Enzym trifft, wird erhöht und somit auch die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Riboflavin-Biosynthese findet ursprünglich im Zytoplasma statt (Iatsishin *et al.*, 2009). Damit ändert eine Integration der Enzyme in die Zellmembran das umliegende Milieu nicht. Zusätzlich konnte errechnet werden, dass an der Zytoplasmamembran genügend Platz ist um die Riboflavin-Biosynthese-Enzyme aufzunehmen.

Die Verankerung der Enzyme in die Zellmembran wurde durch das Anhängen des CAAX-Motivs von TeaR erreicht. Dieses Motiv wurde an den C-Terminus der Proteine fusioniert. Im Falle einer Membranverankerung von GFP und Rib4 konnte beobachtet werden, dass zusätzlich zur Zytoplasmamembran auch Strukturen innerhalb der Zelle fluoreszent markiert waren. Diese Strukturen könnten Akkumulationen von fluoreszent markierten Enzymen darstellen, die ursprünglich an der Zytoplasmamembran saßen und nun Abbauprozessen im Zytoplasma zugeführt wurden (Hicke & Riezman, 1996; Volland *et al.*, 1994). Denkbar ist zudem, dass die mit CAAX fusionierten Proteine in die Membran von zellinternen Strukturen (beispielsweise Peroxisomen, dem Nukleus oder Mitochondrien) verankert wurden (Gao *et al.*, 2009).

Die Enzyme Rib3 und Rib5 konnten an der Zellmembran verankert werden, wohingegen Rib1, Rib2 und Rib7 durch das CAAX-Motiv nicht an der Zellmembran verankert werden konnten. Die individuelle Konformation eines Proteins könnte ein möglicher Grund dafür sein, warum sich manche Proteine in die Membran integrieren lassen und andere nicht. Eine C-terminale Fusion des CAAX-Motives kann zu einer Veränderung dieser Konformation oder zu einer zusätzlichen internen Bindung zwischen einzelnen Aminosäuren führen, sodass die Funktion der Membranverankerung verloren geht. Die Modellierung der Enzyme ohne CAAX-Motiv zeigte, dass der C-Terminus von allen Enzymen nach außen gerichtet ist.

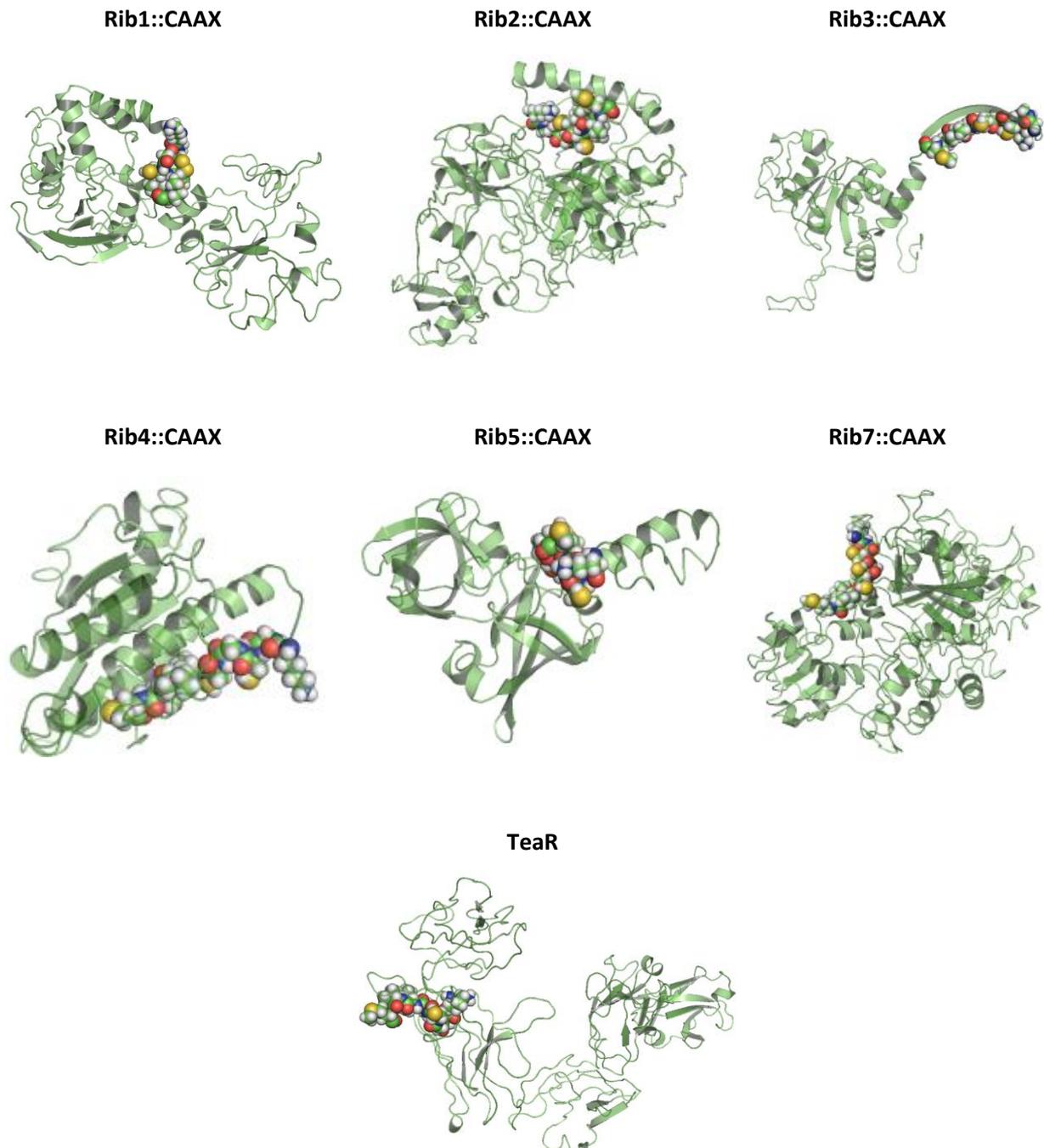


Abbildung 32: Modellierung der Riboflavin-Biosynthese-Enzyme mit C-terminaler Fusion des CAAX-Motives und TeaR in *A. nidulans*. Die Tertiärstruktur der Proteine ist in grün, die Aminosäuren des CAAX-Motives als Punkte dargestellt. Je Enzym wurden fünf Modelle erstellt, wobei nur das erste Modell mit der höchsten Qualität und Wahrscheinlichkeit (höchster C-Score und bester TM-Score) gezeigt ist. Die Sequenzen der Proteine wurden der AspGD entnommen (Cerqueira *et al.*, 2014), mit dem Algorithmus von I-TASSER modelliert (Roy *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2012; Zhang, 2008) und in PyMol dargestellt (Schrödinger, 2010). Die Größen der Proteine sind nicht maßstabsgetreu. Man kann erkennen, dass das CAAX-Motiv bei den Enzymen Rib1, Rib2 und Rib7 von weiteren Strukturen des Proteins umschlossen wird. Es existiert jedoch jeweils ein Modell, bei dem das CAAX-Motiv außerhalb liegt (nicht gezeigt). Bei den Enzymen Rib3, Rib4 und Rib5 wird das CAAX-Motiv bei keinem der Modelle von anderen Strukturen des jeweiligen Proteins umschlossen.

Die Modellierung der Enzyme der Riboflavin-Biosynthese zeigt im Falle von Rib1, Rib2 und Rib7, dass das CAAX-Motiv von zusätzlichen Strukturen des Proteins umgeben ist, was allerdings keinen Einfluss auf die Funktion haben muss (Abbildung 32). Eine Modellierung von TeaR selbst zeigte, dass auch dort das CAAX-Motiv an Aminosäuren des Proteins bindet und mit ihnen interne Strukturen

bildet. Auch bei Rib3, Rib4 und Rib5 geht das CAAX-Motiv mit internen Aminosäuren des Proteins Bindungen ein, die daraus resultierenden Strukturen befinden sich allerdings im Gegensatz zu jenen in TeaR auf der Außenseite des Proteins.

Ein zweiter Grund warum die Verankerung in der Zellmembran nicht stattgefunden hat, könnte an einem unterschiedlichen Grad der Komplexizität von Riboflavin-Biosynthese-Enzymen *in vivo* sein. Es ist bekannt, dass zum Beispiel Rib1 in *Mycobacterium tuberculosis* (Singh *et al.*, 2013), Rib3 in *Candida albicans* (Le Trong & Stenkamp, 2008) und Rib7 in *S. cerevisiae* (Lv *et al.*, 2013) als Homo-Dimere vorliegen. Rib2 liegt in *Bacillus subtilis* als Homo-Tetramer (Chen *et al.*, 2013) und Rib5 in *Schizosaccharomyces pombe* als Monomer vor (Gerhardt *et al.*, 2002b). Das Enzym Rib4 bildet in Pilzen ein Homo-Pentamer (Gerhardt *et al.*, 2002a; Koch *et al.*, 2004; Meining *et al.*, 2000; Persson *et al.*, 1999). In beispielsweise *B. subtilis* und *E. coli* hingegen liegt Rib4 als ikosadrisches (zwanzig Flächen) Kapsid mit einer Masse von etwa 1 MDa vor (Ladenstein *et al.*, 1988; Ladenstein *et al.*, 1994; Mortl *et al.*, 1996; Ritsert *et al.*, 1995). In *Bacillaceae* formen die Enzyme Rib4 und Rib5 einen einzigartigen Komplex. Dieser besteht aus einer ikosaedrischen Hülle aus 60 Lumazin-Synthasen (β -Untereinheiten) und einem Kern aus drei Riboflavin-Synthasen (α -Untereinheiten) (Bacher *et al.*, 1980; Ladenstein *et al.*, 2013). Somit ist anzunehmen, dass in *A. nidulans* ebenfalls höhergradige Komplexe (Quartärstruktur) gebildet werden, wodurch die C-Termini in die Mitte eines Proteinkomplexes gelangen und dort das CAAX-Motiv seine Funktion als Membrananker nicht mehr ausüben kann. Die Modellierung der Enzyme der Riboflavin-Biosynthese in *A. nidulans* geschah ausschließlich mit Monomeren als Tertiärstruktur. Die Auswirkung eventueller Quartärstrukturen konnte deshalb nicht vorhergesagt werden.

Stämme mit Überexpressionen der Gene *rib3*, *rib4* und *rib5*, von denen die Proteine in die Membran verankert werden konnten, und Stämme mit Überexpressionen der CAAX-markierten Gene und Kombinationen daraus wurden auf ihre Riboflavin-Produktion getestet und miteinander verglichen (Abbildung 33).

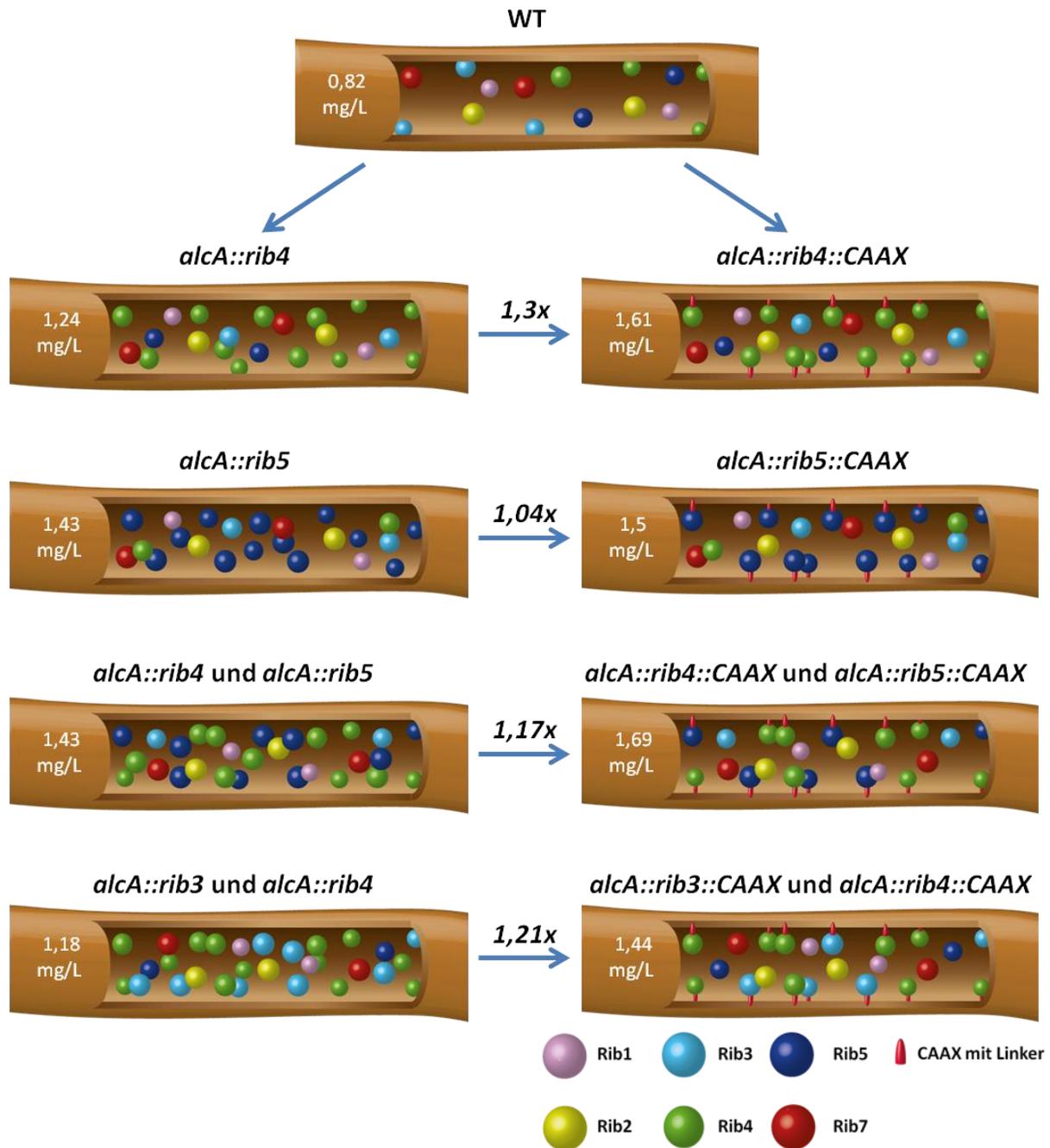


Abbildung 33: Zusammenfassende Darstellung zur Riboflavin-Produktion. Gezeigt sind die Gesamtproduktionsmengen von FFR (FMN, FAD und Riboflavin) bei induzierenden Bedingungen in mg/L pro Gramm Trockenmasse des Myzels.

Zusätzlich zur produzierten Menge Riboflavin wurde auch die Menge von FMN und FAD gemessen. Dies war notwendig um die Gesamtproduktion von Riboflavin zu erfassen. Industriell zur Riboflavin-Produktion verwendete Stämme besitzen im Gegensatz zum Laborstamm keine Flavokinase und FAD-Synthetase, welche Riboflavin zu FMN und FAD umbauen. In *B. subtilis* zum Beispiel ist das Gen *ribC* deletiert (Coquard *et al.*, 1997), das beide Funktionen inne hat. Da Riboflavin zu FMN und FMN weiter zu FAD umgewandelt wird, wurden die Messungen addiert und durch den Wert "FFR" repräsentiert.

Da FFR sowohl intra- als auch extrazellulär produziert wird, wurden beide Messwerte addiert ("Gesamtproduktion von FFR"). Interessanter Weise befand sich intrazellulär eine größere Menge FMN, wohingegen Riboflavin und FAD extrazellulär dominierten (Abbildung 36, Anhang). Das liegt daran, dass Riboflavin und FMN zwar beide hydrophil sind, die Löslichkeit von FMN in Wasser aber 200-mal höher ist als die von Riboflavin (Berezovskii, 1973). Somit kann Riboflavin besser über die Membran diffundieren als FMN, das sich im Inneren anreichert. Um die Sekretion von Riboflavin noch weiter zu erhöhen, können zusätzlich Transporter wie RibM aus *Streptomyces davawensis* eingesetzt werden (Hemberger *et al.*, 2011). Damit kann der langwierige und kostspielige Schritt des Zellaufbruchs mit anschließender Aufreinigung von Riboflavin umgangen werden. Dieser Transporter befördert Riboflavin passiv (ohne Energieverlust) über die Membran. Die Transportrichtung wird durch das Konzentrationsgefälle von Riboflavin an der Zellmembran bestimmt. Zudem existieren eventuell Rückkopplungsprozesse bei denen ein Mangel an Riboflavin im Zellinneren ein Signal zur Riboflavin-Produktion sendet. Andere Riboflavin-Transporter wie beispielsweise RibU aus *B. subtilis* benötigen im Gegensatz zu RibM Energie für den Transport (Eitinger *et al.*, 2011; Neubauer *et al.*, 2009; Rodionov *et al.*, 2009; ter Beek *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010). In *E. coli* existiert ein Transporter (YeeO), der FMN und FAD transportieren kann (McAnulty & Wood, 2014). Liegt dieser Transporter in der Membran von *E. coli* vor, erhöhen sich die intrazellulären Mengen von Riboflavin. Es wäre interessant herauszufinden, ob ein Mangel wichtiger Kofaktoren wie FMN und FAD alleine zu einer erhöhten Riboflavin Produktion führen kann. Eine Kombination aus Riboflavin-Export und gleichzeitiger FMN- und FAD-Sekretion (RibM oder RibU in Kombination mit YeeO) könnte in einem Signal für den Pilz resultieren mehr Riboflavin zu produzieren und somit eine Chance darstellen um die Riboflavin-Produktion noch weiter zu steigern.

In fast allen Stämmen wurden im Vergleich zu FMN und Riboflavin geringere Mengen FAD detektiert. Das liegt daran, dass die FAD-Synthetase durch ihr Produkt (FAD) inhibiert wird (Yamada *et al.*, 1990). Auch in *H. polymorpha* wirkt freies FAD als Repressor der Riboflavin-Biosynthese (Brooke *et al.*, 1986). Der Grundumsatz von FMN und FAD sollte in jedem Stamm nahezu identisch sein oder nicht messbare Unterschiede zeigen. Viele Flavine existieren intrazellulär zusätzlich als gebundene Kofaktoren (Wilson & Pardee, 1962). Da diese ebenfalls in etwa gleichen Mengen vorhanden sein sollten, wurden sie nicht in die Betrachtungen mit einbezogen.

Das Wachstumsstadium hat einen entscheidenden Einfluss auf die Riboflavin-Produktion (Schlosser *et al.*, 2007). Die höchste Riboflavin-Produktion findet zwischen der Wachstumsphase und der stationären Phase einer Kultur statt (somit in Phasen mit abnehmender Wachstumsgeschwindigkeit). In diesen Phasen werden *rib3*, *rib4* und *rib5* in *A. gossypii* stärker exprimiert (Schlosser *et al.*, 2007). Durch die Verwendung des *alcA*-Promoters zur Induktion der Riboflavinsynthese auf Threonin haben

alle Riboflavin-Stämme in dieser Arbeit nach fünf Tagen Wachstum auf Threonin weniger Trockenmasse angehäuften, teilweise nur annähernd die Hälfte im Vergleich zu Wachstum auf Glukose. Dafür zeigten sie vergleichbare oder sogar erhöhte Riboflavin-Mengen. Durch die Berücksichtigung der Trockenmasse in die Endproduktion erzielten sie bei Wachstum auf Threonin wesentlich höhere Produktionsmengen als auf Glukose. Eine weitere Optimierung des Systems würde eine Verbesserung der Kultivierungsbedingungen auf Threonin oder ein Wechseln zu einem Kohlenstoffquellen-unabhängigen Expressionssystem wie dem "Tet-ON"-System sein (Meyer *et al.*, 2011).

Die Menge an produziertem FFR war hingegen in allen Replikaten annähernd identisch. Jedoch gab es Schwankungen von Riboflavin, FMN und FAD innerhalb der Replikate. Da es sich um biologische Replikate handelt und die Stämme aus unabhängigen Transformationen entstanden sind, könnten zusätzliche Mutationen die Reaktionsgleichgewichte beeinflusst haben. Außerdem ist es fast ausgeschlossen zwei unabhängig voneinander gewachsene Stämme mit exakt der selben Konzentration Riboflavin, FMN und FAD zu finden, da die Enzymreaktionen ständig ablaufen und viele Faktoren diese beschleunigen oder verlangsamen können.

Für die Messungen der Gesamtproduktion von FFR in *A. nidulans* wurden zwei Wildtypen (SRF200 und GR5) verwendet. Diese produzierten unabhängig von der Kohlenstoffquelle (Glukose oder Threonin) die gleiche Menge FFR. Stämme mit Überexpressionen der Gene *rib4*, *rib5*, *rib4* und *rib5*, sowie *rib3* und *rib4* zeigten alle eine erhöhte Riboflavin-Produktion (Abbildung 33). Im Vergleich zum Wildtyp konnten durch die Überexpression von *rib4* bei Induktion 1,51-mal mehr FFR, von *rib5* 1,74-mal so viel FFR, durch die Kombination aus den Überexpressionen von *rib4* und *rib5* ebenfalls 1,74-mal so viel FFR und durch die Kombination aus den Überexpressionen von *rib3* und *rib4* 1,43-mal mehr FFR hergestellt werden. Bei einem Vergleich der FFR Gesamtproduktion der Stämme zwischen induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen konnten noch höhere Unterschiede festgestellt werden. Auch in anderen Organismen konnten durch eine Überexpression von jedem der Gene Engpässe umgangen werden. In *A. gossypii* W122032, ein Stamm mit sehr hoher Riboflavin-Produktion, konnte eine höhere Expression aller sechs direkt an der Riboflavin-Biosynthese beteiligten Gene nachgewiesen werden (Kato & Park, 2012). In *Pichia pastoris* konnte durch die Überexpression von Rib1, Rib3, Rib4 und Rib5 die Riboflavin-Produktion gesteigert werden (Marx *et al.*, 2008). Eine computergestützte Analyse der Netzwerkdynamik der Riboflavin-Biosynthese in *B. subtilis* ergab, dass RibA (entspricht Rib1 und Rib3 in *A. nidulans*) der erste limitierende Faktor ist. Dies wurde bereits experimentell bestätigt (Hümbelin *et al.*, 1999). Direkt darauf folgt RibH (Rib4 in *A. nidulans*) (Birkenmeier *et al.*, 2014).

Neben den schon angesprochenen Überexpressionen und der Nutzung von Transportern sind auch Einflüsse auf die Riboflavin-Biosynthese durch Veränderungen in Synthesewegen bekannt. In *A. gossypii* wurde der bereits erwähnte Stamm W122032 mittels DNA-Microarray genauer untersucht. Eine Änderung in der Expressionsrate der Gene für die β -Oxidation oder des Glyoxylat-Zyklus (Ledesma-Amaro *et al.*, 2014), des Zitratzyklus oder der Glukoneogenese (Kato & Park, 2012) hatte eine direkte Auswirkung auf die Riboflavin-Produktion. Genauer gesagt wurden die Gene der Purin- und Riboflavin-Biosynthese stärker exprimiert, wohingegen die Gene zur Kohlenstoffaufnahme, Energiegewinnung und der Glykolyse schwächer exprimiert wurden. Das bedeutete im Endeffekt eine Verlagerung des Kohlenstoffflusses von der β -Oxidation zur Riboflavin-Biosynthese (Park *et al.*, 2011). Eine erhöhte GTP-Zufuhr über den Pentosephosphatweg und den Purin-Syntheseweg führte ebenfalls zu einer Erhöhung der Riboflavin-Produktion in *A. gossypii* (Jeong *et al.*, 2015). Es werden offensichtlich durch diese Veränderungen Engpässe umgangen um so eine bessere Produktion von Riboflavin zu ermöglichen. Allerdings werden durch genetische Veränderungen immer wieder neue Engpässe unabsichtlich hinzugefügt, sodass eine genaue Kalibrierung der besten Kombinationen aller Möglichkeiten notwendig ist.

Ein möglicher Engpass in *A. nidulans* konnte durch eine Membranverankerung von Rib4 umgangen werden. Die Verankerung von Rib4 zeigte eine erhöhte FFR-Produktion im Vergleich zur Überexpression von *rib4*. Jedoch konnte eine Kombination aus Rib3 und Rib4 in der Membran nicht mehr FFR produzieren als eine Verankerung von Rib4 alleine. Eine Verankerung von Rib5 zeigte eine minimale Produktionssteigerung von FFR im Gegensatz zur Überexpression von *rib5*. Durch eine Kombination aus membrangebundenem Rib4 und Rib5 konnte mehr FFR produziert werden als durch die bloße Überexpression der Gene. Folglich konnte die FFR-Produktion durch die Beteiligung von membranständigem Rib4 gesteigert werden.

Die Kombination aus einer Membranverankerung von Rib4 und Rib5 ergab die mengenmäßig höchste Riboflavin-Produktion. Es ist anzunehmen, dass sich durch die teilweise Immobilisierung dieser beiden Enzyme, ähnlich wie in dem $\beta_{60}\alpha_3$ -Kapsid aus *Bacillaceae*n (Bacher *et al.*, 1980) eine effizientere Übergabe eines Intermediates auf das folgende Enzym ergibt (Kis & Bacher, 1995).

Die Beziehung von Rib4 zu Rib5 wird auch durch einen Enzymversuch mit DMRL sichtbar. Damit wurde die Aktivität von Rib5 *in vitro* nachgewiesen. Es zeigte sich, dass durch eine Überexpression von *rib4* die Aktivität von Rib5 anstieg und zwar in gleichem Ausmaß wie bei einer Überexpression von *rib5*. Selbst durch eine zusätzliche Membranverankerung von Rib5 blieb die Aktivität nahezu identisch. Das bedeutet, dass die Verankerung in der Membran von Rib4 ausschlaggebend ist für die Produktionssteigerung von FFR in Stämmen mit fusioniertem CAAX und nicht etwa eine gesteigerte Menge des Enzyms.

Eukaryotische Membranen können in unterschiedliche Bereiche unterteilt werden (Lingwood & Simons, 2010; Rajendran & Simons, 2005; Rothberg *et al.*, 1990). Sterole und Sphingolipide bilden "Cluster" in der Membran in einem Mix mit Glycerophospholipiden. Diese Domänen werden "Lipid Rafts" genannt. Sie markieren unterschiedliche Regionen in der Membran, in denen Proteine mit GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Ankern oder Lipid-assoziierte Proteine spezifisch binden (Schuck & Simons, 2004; Simons & Toomre, 2000). Da TeaR in sterol-reichen Plasmamembrandomänen verankert wird (Takeshita *et al.*, 2008), kann man annehmen, dass auch Proteine mit dem CAAX-Motiv von TeaR dort verankert werden. Membrandomänen bieten ein großes Potential für die Biotechnologie. Mit dem Wissen, dass eine Membranverankerung eine Produktionssteigerung bewirken kann, könnten spezielle Membranbereiche gebildet werden, in denen durch Fusion von verschiedenen Motiven nur ein Biosyntheseweg ablaufen kann. Durch diese gezielte Einteilung der Membran würden also Cluster für je einen Biosyntheseweg entstehen. Dieses Prinzip gleicht den bakteriellen Mikrokompartimenten (BMCs, "Bacterial Micro-compartments"), in denen jeweils ein Biosyntheseweg abläuft und dadurch die Synthese durch Abgrenzung zu anderen Synthesewegen im Zytoplasma erreicht werden kann (Kerfeld *et al.*, 2010).

Die erfolgreiche Produktionssteigerung durch die Membranverankerung von Rib4 stellt einen neuen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen und die Erstellung von Produktionsstämmen dar. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Produktionssteigerung von Primär- oder Sekundärmetaboliten durch eine Verlagerung von Biosynthese-Enzymen *in vivo* mit zelleigenen Strukturen erreicht werden kann. Allerdings ist zwischen einer Verringerung des Substratflusses, der Entfernung der Enzyme voneinander und der Verlagerung eines Enzyms zu unterscheiden. Jedes Enzym hat eigene spezifische Eigenschaften wie Konformation, Liganden, und Stabilität in unterschiedlichen Milieus. Selbst ein Enzym mit der gleichen Funktion in unterschiedlichen Organismen (vor allem zwischen Pro- und Eukaryoten) kann andere Eigenschaften besitzen. Wie in Teil I erwähnt, wäre auch hier interessant, ob sich eine Membranverankerung von anderen Stoffwechselwegen oder in anderen Organismen ebenfalls positiv auf die Produktion auswirken kann um eventuelle Engpässe zu überwinden.

Material & Methoden

Allgemein

Stämme, Plasmide und Kulturbedingungen

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammten, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt), Biozym (Hessisch Oldendorf) und Serva (Heidelberg). Restriktionsenzyme und DNA-Marker stammten von New England Biolabs (Frankfurt) und Fermentas (St. Leon-Rot). Sequenzierungen wurden durchgeführt bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg). In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklaven	Systec 3850 ELV Systec VE-75	Systec GmbH, Wittenberg
Zentrifugen	Universal 320 R Sorvall RC 6+ (Rotor SS-34) Eppendorf 5415R, 5415D, 5424	Hettich Zentrifuge, Deutschland Thermo Scientific, Deutschland Eppendorf, Hamburg
Gelscanner	SnapScan1236v	Agfa, Köln
Inkubatoren/Schüttler	Minitron AI 72 Heraeus 6000	Infors AG, Bottmingen Heraeus Instruments
PCR – Cycler	T3 Thermocycler Mastercycler personal	Bayer, Leverkusen Eppendorf
Heizblock	Thermomixer 5436 Thermomixer comfort	Eppendorf
Mikroskop	Eclipse E200 Axio Imager Z1	Nikon Zeiss, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	EV231; Kammer: Modell 40-0911	PeqLab Biotechnologie GmbH
Spektrophotometer	Nano Drop ND-1000	PeQLab, Erlangen
HPLC	Smartline	Knauer
HPLC-Säule	Luna 5u C18 Säule (250 x 4,6 mm)	Phenomenex
Real Time	iCycler iQ	BioRad

Verwendete Organismen

In dieser Arbeit wurden folgende Stämme von *Aspergillus nidulans* (Tabelle 9), *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* (Tabelle 10) verwendet.

Tabelle 9: Verwendete *A. nidulans* -Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
TN02A3	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB</i>	(Nayak et al., 2006)
FGSC26	<i>biA1; veA1</i>	FGSC
SJR2	FGSCA1153 X SKV103#G4; <i>pyroA4, pyrG89, nkuA::bar, veA+</i>	Julio Rodriguez
SAH03	TN02A3 mit pAH03 (<i>pexC-LB (1kb)::pyroA4::pexC-RB (1kb)</i>); <i>pyrG89</i>	Diplomarbeit Andreas Herr
SAH06	SJR2 mit pAH05 (<i>nat(p)::ipnA::PTS1</i>)	Diese Arbeit
SAH07	SJR2 mit pAH04 (<i>nat(p)::acvA::PTS1</i>)	Diese Arbeit
SAH08	SAH14 mit pAH28 (<i>nat(p)::acvA::PTS1</i> und <i>nat(p)::ipnA::PTS1</i> und <i>alcA(p)::ipnA</i>)	Diese Arbeit
SAH10	SJR2 mit pYZ12 (<i>alcA(p)::mRFP::acuE</i>)	Diese Arbeit
SAH11	SJR2 mit pYZ12 und pAH06 (Ko-Transformation); (<i>alcA(p)::pexK</i> und <i>alcA(p)::mRFP::acuE</i>)	Diese Arbeit
SAH12	SJR2 mit pAH06 (<i>alcA(p)::pexK</i>)	Diese Arbeit
SAH13	SAH07 mit pAH06 (<i>alcA(p)::pexK</i> und <i>nat(p)::acvA::PTS1</i>)	Diese Arbeit
SAH14	SJR2 mit pAH12 (<i>nat(p)::acvA::PTS1</i>)	Diese Arbeit
SAH16	SJR2 mit pAH14 (<i>alcA(p)::acvA</i>)	Diese Arbeit
SAH19	SAH07 mit pAH10 (<i>nat(p)::acvA::PTS1</i> und <i>alcA(p)::ipnA</i>)	Diese Arbeit
SAH21	SAH14 mit pAH6 (<i>alcA(p)::pexK</i> und <i>nat(p)::acvA::PTS1</i>)	Diese Arbeit
SAH23	SJR2 mit pAH27 (<i>alcA(p)::GFP::ipnA::PTS1</i>)	Diese Arbeit
SAH24	SJR2 mit pAH15 (<i>alcA(p)::ipnA</i>)	Diese Arbeit
SAH25	SJR2 mit pAH14 und pAH15 (Ko-Transformation); (<i>alcA(p)::acvA</i> und <i>alcA(p)::ipnA</i>)	Diese Arbeit
SAH28	SAH25 mit pAH23 (<i>alcA(p)::acvA</i> und <i>alcA(p)::ipnA</i> und <i>alcA(p)::aatA</i>)	Diese Arbeit
SAH30	SAH14 mit pAH23 (<i>nat(p)::acvA::PTS1</i> und <i>alcA(p)::aatA</i>)	Diese Arbeit
SAH31	SAH14 mit pAH10 (<i>nat(p)::acvA::PTS1</i> und <i>alcA(p)::ipnA</i>)	Diese Arbeit
SAH33	SAH23 mit pYZ12 (<i>alcA(p)::GFP::ipnA::PTS1</i> und <i>alcA(p)::mRFP::acuE</i>)	Diese Arbeit

SAH34	SAH14 mit pAH21 und pYZ12 (Ko-Transformation); (<i>alcA(p)::GFP::acvA::PTS1</i> und <i>alcA(p)::mRFP::acuE</i>)	Diese Arbeit
SAH36	SJR2 mit pAH23 (<i>alcA(p)::aatA</i>)	Diese Arbeit
SAH37	SAH14 mit pAH09 (<i>alcA(p)::acvA::PTS1</i>)	Diese Arbeit
SAH38	SAH6 mit pAH12 (<i>nat(p)::acvA::PTS1</i> und <i>nat(p)::ipnA::PTS1</i>)	Diese Arbeit
SAH39	SRF200 mit pAH39 (<i>alcA(p)::rib4</i>)	Diese Arbeit
SAH40	SRF200 mit pAH43 (<i>alcA(p)::rib5</i>)	Diese Arbeit
SAH43	SRF200 mit pAH39 und pAH43 (<i>alcA(p)::rib4</i> und <i>alcA(p)::rib5</i>)	Diese Arbeit
SAH44	SRF200 mit pAH41 (<i>alcA(p)::GFP::rib4</i>)	Diese Arbeit
SAH45	SRF200 mit pAH45 (<i>alcA(p)::RFP::rib5</i>)	Diese Arbeit
SAH48	SRF200 mit pAH46 (<i>alcA(p)::RFP::rib5::CAAX</i>)	Diese Arbeit
SAH49	SRF200 mit pAH40 (<i>alcA(p)::rib4::CAAX</i>)	Diese Arbeit
SAH50	TN02A3 mit pAH37 (<i>alcA(p)::RFP::rib7</i>)	Diese Arbeit
SAH51	SRF200 mit pAH40 und pAH44 (<i>alcA(p)::rib4::CAAX</i> und <i>alcA(p)::rib5::CAAX</i>)	Diese Arbeit
SAH52	SRF200 mit pAH44 (<i>alcA(p)::rib5::CAAX</i>)	Diese Arbeit
SAH53	GR5 mit pAH40 und pAH52 (<i>alcA(p)::rib4::CAAX</i> und <i>alcA(p)::rib3::CAAX</i>)	Diese Arbeit
SAH56	GR5 mit pAH39 und pAH51 (<i>alcA(p)::rib4</i> und <i>alcA(p)::rib3</i>)	Diese Arbeit
SAH57	GR5 mit pAH49 (<i>alcA(p)::GFP::rib1</i>)	Diese Arbeit
SAH58	GR5 mit pAH42 (<i>alcA(p)::GFP::rib4::CAAX</i>)	Diese Arbeit
SAH59	GR5 mit pAH53 (<i>alcA(p)::RFP::rib3</i>)	Diese Arbeit
SAH60	GR5 mit pAH54 (<i>alcA(p)::RFP::rib3::CAAX</i>)	Diese Arbeit
SAH61	GR5 mit pAH38 (<i>alcA(p)::RFP::rib7::CAAX</i>)	Diese Arbeit
SAH62	GR5 mit pAH34 (<i>alcA(p)::GFP::rib2::CAAX</i>)	Diese Arbeit
SAH63	GR5 mit pAH50 (<i>alcA(p)::GFP::rib1::CAAX</i>)	Diese Arbeit
SAH64	GR5 mit pAH33 (<i>alcA(p)::GFP::rib2</i>)	Diese Arbeit
SNB01	TN02A3 mit pNB10 (<i>alcA(p)::GFP::CAAX</i>)	Nicole Bühler

Tabelle 10: Verwendete *E. coli*- und *Saccharomyces cerevisiae* -Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
Top10	F' mcrA Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80, <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> , <i>nupG</i> , <i>recA1</i> , <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>) 7679, <i>galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻</i>	Invitrogen, (Sambrook & Russel, 1999)
WW-YH10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC208405	ATCC

Kultivierung von Organismen

Die *A. nidulans*- und *E. coli*-Kulturen wurden aerob bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden bei 180-200 rpm in Erlenmeyerkolben in Schüttelinkubatoren gezüchtet. Für Festmedien wurden 15 g Agar pro Liter Medium eingewogen. Die verwendeten Medien zur Anzucht von *E. coli* (Tabelle 11) wurden je nach Versuchsansatz mit Antibiotika supplementiert (Tabelle 12); diese und *A. nidulans*-Medien (Tabelle 13 und Tabelle 15) wurden mit verschiedenen Auxotrophiemarkern versetzt (Tabelle 14). Hitzeempfindliche Lösungen, wie Antibiotika, Aminosäuren und Nukleotide wurden steril filtriert (Sterilfilter mit 0,2 μ m Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel). Allgemein wurde nach Standards von (Hill & Käfer, 2001) gearbeitet. Expressionen von Genen unter dem *alca* -Promotor wurden durch Threonin oder Glycerin induziert (Schier *et al.*, 2001).

Tabelle 11: Medien für *E. coli*

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Luria Bertani (Upshall <i>et al.</i>)	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; pH 7,5
SOC	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl; 0,19 g KCl; 2 g MgCl ₂ x 7H ₂ O; 3,6 g Glukose; pH 7,0

Tabelle 12: Antibiotika für *E. coli* -Medien

Substanz	Endkonzentration
Ampicillin	100 μ g/mL

Tabelle 13: Medien für *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Vollmedium (CM)	50 mL SalzstammLösung; 20 g Glukose; 2 g Pepton; 1 g Hefeextrakt; 1 mL Vitaminlösung; 1 mL Spurenelementlösung; pH 6,5
Minimalmedium	50 mL SalzstammLösung; 1 mL Spurenelementlösung; 2% Glukose, Glycerin, Threonin, oder Ethanol; pH 6,5; zur Regeneration von Protoplasten mit 0,6 M KCl supplementiert
YAG -Medium	

Salzstammlösung (20-fach)	120 g NaNO ₃ ; 10,4 g KCl; 10,4 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 30,4 g KH ₂ PO ₄
Spurenelementlösung (1000-fach)	22 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O; 11 g H ₃ BO ₃ ; 5 g MnCl ₂ x 4H ₂ O; 5 g FeSO ₄ x 7H ₂ O; 1,6 g CoCl ₂ x 5H ₂ O; 1,6 g CuSO ₄ x 5H ₂ O; 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O; 50 g Na ₄ EDTA; pH 6,5
Vitaminlösung (1000-fach)	0,1 g D-Biotin; 0,1 g Pyridoxin-HCl; 0,1 g Thiamin-HCl; 0,1 g Riboflavin; 0,1 g p-Aminobenzoessäure

Je nach verwendetem Stamm wurde den Medien bestimmte Auxotrophiemarker zugesetzt.

Tabelle 14: Auxotrophiemarker von *A. nidulans* – Stämmen

Marker	Funktion	Chromosom	Referenz
veA1	Lichtunabhängige Induktion der Sporulation	VIII	FGSC
pyrG89	Uracil- und Uridin Auxotrophie	I	(Balance, <i>et al.</i> , 1983)
pyroA4	Pyridoxin -Auxotrophie	IV	FGSC
argB2	Arginin -Auxotrophie	III	(Upshall <i>et al.</i> , 1986)
trpC801	Tryptophan -Auxotrophie	VIII	(Yelton <i>et al.</i> , 1984)
pabaA1	Para aminobenzoessäure -Auxotrophie	I	FGSC
biA1	Biotin Auxotrophie	I	FGSC

Tabelle 15: Vitamine, Aminosäuren und Mediumkomponenten

Komponente	Stock -Konzentration	Volumen oder Gewicht pro Liter
Biotin	0,05%	1 mL
Nicotinamid	0,5%	1 mL
Pyridoxin-HCl (Pyro)	0,1%	1 mL
p-Aminobenzoessäure (PABA)	0,1%	1 mL
Riboflavin	0,25%	1 mL
Arginin	-	1,2 g
Uracil	-	1 g
Uridin	-	1 g

Zur Lagerung von *E. coli* – Stämmen wurden frisch gewachsene Bakteriensuspensionen auf eine Endkonzentration von 15% sterilem Glycerol eingestellt und bei -80°C eingefroren. Die *A. nidulans* – Stämme wurden auf Minimal – oder Vollmediumplatten angeimpft. Davon wurden Sporen abgenommen und in 15-20% Glycerol bei -80°C gelagert.

Molekularbiologische Methoden

Präparation von Plasmid – DNA aus *E. coli*

Die Kolonien wurden gepickt und in 2,5 mL LB – Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 1,5 mL davon in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Rest wurde aufgehoben. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen, das Pellet in 200 µL Zell-Suspensionspuffer resuspendiert und gevortext. Anschließend wurden 200 µL Zell Lysis Puffer zugegeben (Inkubation 2 bis 3 Minuten) und vorsichtig invertiert. 200 µL 1,5 M KAc pH 4,8 wurden zugegeben und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurde 5 Minuten auf höchster Stufe zentrifugiert und danach der klare Überstand (ohne Pellet) in ein frisches Eppendorfgefäß überführt; 500 µL 100%iges Isopropanol wurden zugeben. Das Gemisch wurde 20 Minuten auf Eis gestellt oder bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurde 10 Minuten auf höchster Stufe zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µL kaltem 70% EtOH gewaschen. Erneut wurde 3 Minuten auf höchster Stufe zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Danach wurde es in 25 µL TE gelöst (10 Minuten bei 68°C inkubieren). Danach folgte ein Restriktionsverdau zum Test der Plasmid – DNA.

Tabelle 16: Verwendete Lösungen zur Plasmid -Präparation aus *E.coli*

Medium	Zusammensetzung
Zell – Suspensionpuffer (100 mL)	5 mL 1 M TrisCl pH 7,5; 2 mL 0,5M EDTA pH 8,0; 10 mg RNase
Zell – Lysis -Puffer	0,2M NaOH; 1% SDS
Kalium -Acetat	1,5M KAc, pH 4,8
TE	10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0

Midi -Präparation

Die Midipräparationen wurden mit dem Nucleobond-Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden in einem 100 mL Kolben ca. 50 mL LB-Medium mit Ampicillin als Selektionsmarker mit einer positiven *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 mL des Mediums in ein Falcon überführt und 15 Minuten bei 4°C und 5000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 mL S1-Puffer resuspendiert. 4 mL S2-Puffer wurden zugegeben, das Falcon wurde kurz geschwenkt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 mL gekühlter S3-Puffer zugegeben, kurz geschwenkt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. In dieser Zeit wurde ein Trichter mit Faltenfilter auf eine Säule gestellt und diese mit N2-Puffer äquilibriert. Nun wurde das Lysat über den Faltenfilter auf die Säule gegeben. Nach Durchlaufen des Lysats wurde der Trichter mit Faltenfilter entfernt und die

Säule mit 10 mL N3-Puffer gewaschen. Nun wurden 5 mL N5-Puffer auf die Säule gegeben und der Durchfluss in einem neuen 15 mL Falcon aufgefangen. Der Durchfluss wurde mit 3,5 mL kaltem Isopropanol gemischt und auf 4 Eppendorfgefäße verteilt (ca. 2100 µL Probe pro Gefäß). Nun wurden die Eppendorfgefäße 30 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit 500 µL EtOH (70%) gewaschen. Danach wurde nochmals 10 Minuten bei Raumtemperatur und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets getrocknet. Am Ende wurden drei der vier Pellets in 25 µL TE-Puffer und eines in 25 µL H₂O bei 68°C auf dem Heizblock gelöst. Am NanoDrop wurde nun die DNA-Konzentration bestimmt.

Tabelle 17: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pJET 1.2 / blunt	Blunt end cloning vector	Fermentas
pMCB17apx	<i>alcA(p)::sgfp, pyr4</i> aus <i>N. crassa</i> , zur N-terminalen Fusion von GFP an das Zielprotein	Efimov, USA
pAH03	pJET1.2/blunt mit <i>pexC-LB (1kb)::pyroA4::pexC-RB (1kb)</i>	Diese Arbeit
pAH04	pJET1.2 blunt mit <i>acvA^{1kb C-term}::PTS1::pyroA::acvA^{1kb 3'UTR}</i>	Diese Arbeit
pAH05	pJET1.2 blunt mit <i>ipnA^{komplett}::PTS1::pyroA::ipnA^{1kb 3'UTR}</i>	Diese Arbeit
pAH06	pMCB17apx mit <i>alcA(p)::pexK^{komplett}; pyr4</i> (ohne GFP)	Diese Arbeit
pAH09	pMCB17apx mit <i>alcA(p)::acvA^{1kb N-term}; pyr4</i> (ohne GFP)	Diese Arbeit
pAH10	pMCB17apx mit <i>alcA(p)::ipnA^{komplett}; pyr4</i> (ohne GFP)	Diese Arbeit
pAH11	pMCB17apx mit <i>pyroA</i> an Stelle von <i>pyr4</i> ; with <i>alcA(p)</i> aber ohne GFP	Diese Arbeit
pAH12	pAH11 mit <i>alcA(p)::acvA^{1kb C-term}::PTS1; pyroA</i>	Diese Arbeit
pAH13	pAH11 mit <i>alcA(p)::ipnA^{komplett}::PTS1; pyroA</i>	Diese Arbeit
pAH14	pAH11 mit <i>alcA(p)::acvA^{1kb N-term}; pyroA</i>	Diese Arbeit
pAH15	pAH11 mit <i>alcA(p)::ipnA^{komplett}; pyroA</i>	Diese Arbeit
pAH21	pMCB17apx mit <i>alcA(p)::GFP::acvA^{1kb N-term}; pyr4</i>	Diese Arbeit
pAH23	pMCB17apx mit <i>alcA(p)::aatA^{komplett}::PTS1; pyr4</i> (ohne GFP)	Diese Arbeit
pAH27	pMCB17apx mit <i>alcA(p)::GFP::ipnA^{komplett}::PTS1; pyr4</i>	Diese Arbeit
pAH28	pMCB17apx mit <i>alcA(p)::ipnA^{komplett}::PTS1; pyr4</i> (ohne GFP)	Diese Arbeit
pAH33	pYZ16 mit <i>alcA(p)::GFP::rib2; pyro</i>	Diese Arbeit
pAH34	pYZ16 mit <i>alcA(p)::GFP::rib2::CAAX; pyro</i>	Diese Arbeit
pAH37	pYZ12 mit <i>alcA(p)::RFP::rib7; pyro</i>	Diese Arbeit

pAH38	pYZ12 mit <i>alcA(p)::RFP::rib7::CAAX; pyro</i>	Diese Arbeit
pAH39	pAH09 mit <i>alcA(p)::rib4; pyr4</i>	Diese Arbeit
pAH40	pAH09 mit <i>alcA(p)::rib4::CAAX; pyr4</i>	Diese Arbeit
pAH41	pAH21 mit <i>alcA(p)::GFP::rib4; pyr4</i>	Diese Arbeit
pAH42	pAH21 mit <i>alcA(p)::GFP::rib4::CAAX; pyr4</i>	Diese Arbeit
pAH43	pAH09 mit <i>alcA(p)::rib5; pyr4</i>	Diese Arbeit
pAH44	pAH09 mit <i>alcA(p)::rib5::CAAX; pyr4</i>	Diese Arbeit
pAH45	pYZ07 mit <i>alcA(p)::RFP::rib5; pyr4</i>	Diese Arbeit
pAH46	pYZ07 mit <i>alcA(p)::RFP::rib5::CAAX; pyr4</i>	Diese Arbeit
pAH49	pRS426 mit <i>alcA(p)::GFP::rib1; argB</i> (Hefe-Rekombination)	Diese Arbeit
pAH50	pRS426 mit <i>alcA(p)::GFP::rib1::CAAX; argB</i> (Hefe-Rekombination)	Diese Arbeit
pAH51	pRS426 mit <i>alcA(p)::rib3; argB</i> (Hefe-Rekombination)	Diese Arbeit
pAH52	pRS426 mit <i>alcA(p)::rib3::CAAX; argB</i> (Hefe-Rekombination)	Diese Arbeit
pAH53	pRS426 mit <i>alcA(p)::RFP::rib3; argB</i> (Hefe-Rekombination)	Diese Arbeit
pAH54	pRS426 mit <i>alcA(p)::RFP::rib3::CAAX; argB</i> (Hefe-Rekombination)	Diese Arbeit
pNB10	pMCB17apx mit <i>alcA(p)::GFP::CAAX; pyr4</i>	Nicole Bühler
pYZ07	pMCB17apx mit <i>alcA(p)::mRFP::γ-tubulin; pyr4</i>	Ying Zhang
pYZ12	pMCB17apx mit <i>alcA(p)::mRFP::acuE; pyroA</i>	Ying Zhang
pYZ14	pMCB17apx mit <i>alcA(p)::apsB; pyr4</i> (ohne GFP)	Ying Zhang
pYZ16	pMCB17apx mit <i>alcA(p)::GFP::apsB^{1.0}; pyro</i>	Ying Zhang
pRS426	Hefe-Rekombinationsvektor	(Christianson <i>et al.</i> , 1992)

Isolierung genomischer DNA aus *A. nidulans*

Um genomische DNA aus *A. nidulans* zu gewinnen, wurden Kolonien auf Festmedium ausgestrichen. Nach 14-16 Stunden wurden pro Stamm 4 Agarblöckchen mit Myzel und Sporen aus dem Medium ausgestochen und in ein 2 mL Eppendorfgefäß mit Extraktionspuffer (1 mL mit 10 µL S1 – Puffer aus dem Midi – Kit) und 5 Metallkügelchen gegeben. Dann wurden die Agarstücke mit Hilfe eines Spatels in der Flüssigkeit zerkleinert, die Suspension 2 min gevortext und 1,5 Std. bei 68°C im Wasserbad inkubiert. Alle 30 min wurde jede Probe kurz gevortext. Dann wurde das Myzel 10 Minuten mit 13.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und pro mL Extraktionspuffer 70 µL Kalium – Acetat (8M) zugegeben. Das Myzel wurde verworfen. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Eppendorfgefäße erneut 10 min bei 13.200 rpm und 4°C

zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden 500 µL 100%iges Isopropanol zugegeben, 10 Minuten auf Eis inkubiert und 10 min bei 13.200 rpm und 4°C zentrifugiert. Dann wurde die Flüssigkeit abgekippt und 500 µL 70%iges Ethanol zugegeben. Nach einer weiteren 3-minütigen Zentrifugation bei 13.200 rpm und 4°C wurde das Pellet bei 68°C getrocknet, in 50 µL TE aufgenommen und bei 68°C gelöst.

Tabelle 18: Medien für die Isolierung von genomischer DNA aus *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	50 mM EDTA / 0,2% SDS
3M Kalium-Acetat (100mL)	29,445 g KAc in ddH ₂ O lösen; 11,5 mL Eisessig; pH 4,2

Restriktion von DNA

Analytische Restriktionsverdau wurden im Allgemeinen in 10 µL Gesamtvolumen durchgeführt. Die Ansätze enthielten 0,2 µL EnzymLösung. Die jeweilige Zusammensetzung und Reaktionstemperatur entsprach den Empfehlungen der Hersteller. Der Ansatz wurde in der Regel 1 bis 2 Stunden lang bei 37°C verdaut und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

Agarose -Gelelektrophorese, Isolierung von DNA – Fragmenten aus Agarosegelen

Nach dem Restriktionsverdau wurden die DNA-Fragmente auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen und in 0,5-fachen TAE-Puffer aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden zum Beladen der Geltaschen mit Ladepuffer versetzt. Zum Vergleich wurde ein Größenmarker (1kb DNA Ladder; NEB oder 2-log DNA Ladder; NEB) mitgeführt. Die Gele wurden für 15 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/µL in 0,5xTAE) gefärbt, die DNA-Banden mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Für weitere Klonierungsschritte wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt (Zymoclean DNA Gel Recovery Kit).

Tabelle 19: Lösungen für die Agarose -Gelelektrophorese

Substanz	Zusammensetzung
50 x TAE (pH 8,0)	40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA
10 x Ladepuffer	15% Ficoll 400; 5 mM EDTA (pH 8,0); 1% SDS; 1,5 M Bromphenolblau

PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die PCR wurde mit *Taq*-(Qbiogene, Heidelberg), bzw. *Phusion*-Polymerase (NEB, Frankfurt) und Nukleotiden von Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden bei MWG (Ebersberg) bestellt. Es wurden jeweils 10 pmol in 10 µL Reaktionsvolumen eingesetzt. Sowohl der Rapid Cycler von Idaho Technology (Neuried), als auch der TRIO-Thermoblock von Biometra (Göttingen) wurden eingesetzt. Die Programme wurden der zu amplifizierenden Fragmentlänge und der berechneten Annealingtemperatur der Primer angepasst. Denaturiert wurde bei 98°C, die Elongation erfolgte bei 72°C bzw. 68°C, je nach Polymerase.

Fusion-PCR

Mit Hilfe der Fusion-PCR ist es möglich mit speziellem Primerdesign DNA – Fragmente herzustellen, die bei einer Transformation mit hoher homologer Integrationsrate (bei $\Delta nku70$ – Stämmen) ins Genom eingebaut werden (Szewczyk *et al.*, 2006). Die Fusion-PCR wurde in einem 50 µL Ansatz durchgeführt. Es wurden jeweils die gleiche Konzentration der drei zu fusionierenden DNA-Fragmente eingesetzt sowie 10 µL Phusion Buffer (5x) und 0,5 µL *Phusion* -Polymerase. Denaturiert wurde bei 98°C und elongiert bei 72°C. Die Elongationszeit wurde der Länge des Fragments angepasst.

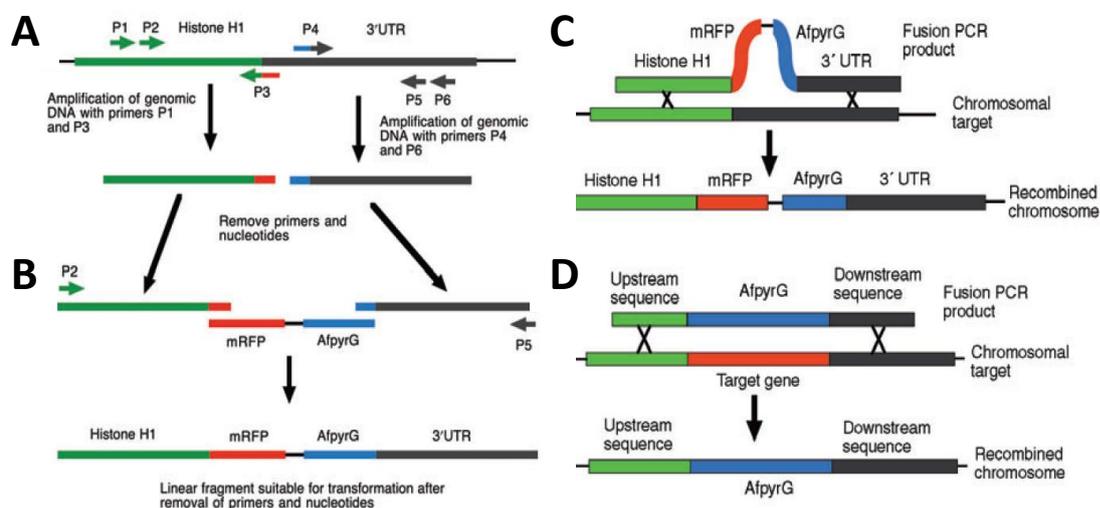


Abbildung 34: Schema der Fusion PCR – In diesem Fall wurde das zu untersuchende Gen (Histone H1) mit *mRFP* getaggt. Als Selektionsmarker dient *pyrG89*. (A) P1 und P3 amplifizieren die RB (right border), P4 und P6 die LB (left border). An P3 und P4 befinden sich jeweils Linker, die zur Fusion-Kassette (mit Marker und einem fluoreszierenden Protein) passen. (B) Die „nested primer“ P2 und P5 amplifizieren dann das gewünschte Konstrukt mit dem GFP oder RFP direkt am Ende des ORF des zu untersuchenden Gens. LB und RB sind also homolog zu den Sequenzen im Genom. Damit ist die Chance einer homologen Rekombination, vor allem in $\Delta nkuA$ – Stämmen, bei denen das „Non-homologous Endjoining“ nicht mehr funktioniert, bei denen also ektopische Integration reduziert werden. (C) Homologe Integration des hier mit mRFP markierten Histone H1. (D) Knockout eines Zielgens, das durch einen Selektionsmarker ersetzt wird.

Tabelle 20: Verwendete Primer (Oligonukleotide)

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
Teil I	
P1_acvA_PTS	GCTTGCGAGAATGCCTTAG
P2_acvA_PTS	CTGGGCCAGCTGACAAG
P3_acvA_PTS	GAGGAAGCAGTCAAAGCTTGAATATCTGGCGAGAAATTTCTCGATT
P4_acvA_PTS	GCGACGAATGATGAAGATCTAAAGTGATGCCAACCAACGTATG
P5_acvA_PTS	TGGCAAGTAACTAATTAACGGC
P6_acvA_PTS	ACTGTTAGCCACCTTTGCTG
P1_ipnA_PTS	CAGAAACGTCTGTTCTTCGC
P3_ipnA_PTS	GAAGAGCATTGTTTGAGGGCTCAAAGCTTGGAGGTCTGGCCGTTCTTGTT
P4_ipnA_PTS	ATCAGTGCCTCCTCTCAGACAGAAGCGAGGGGTGTGGAAC
P5_ipnA_PTS	CCGATCTGGAAGTATAGGC
P6_ipnA_PTS	CGCCTGTGTCTTTTTGTTTTGC
pyrG_fwd	CGCCTCAAACAATGCTCTTC
pyrG_rev	CTGTCTGAGAGGAGGCAC
PTS1_pyroA_fwd	AAGCTTTGACTGCTTCCTCAAC
pyroA_rev	GATCTTCATCATTGTCGCTTTC
KpnI_pexK_fwd	CAGGTACCATGGTTCAGACGCTCTG
Pacl_pexK_re	GTTAATTAATTAAGCGGTCTTTCGCCATTG
KpnI_acvA_1000_f	GAGGTACCATGAGCCCTCCCGGGC
acvA_1000_Pacl_re	CTTAATTAATTTGTACACGATGGCAAC
KpnI_ipnA_fwd	GAGGTACCATGGTTCAGTCAGCAAAGC
ipnA_Pacl_rev	CTTAATTAATCAGGTCTGGCCGTTCTTG
XhoI_Efimov_fwd	GAAGCTCGAGGTAACAATAATTGTAATTGGACAAG
Ascl_alcA_re	AGGCGCGCCGCTAATTAAGTACTGAGTAGAGAAGTGT
Ascl_acvA_1000_f	AGGCGCGCCATGAGCCCTCCCGGGC
Ascl_ipnA_fwd	AGGCGCGCCATGGTTCAGTCAGCAAAGC
Ascl_aatA_fwd	AGGCGCGCCATGCTTCACGTAACCTTGCCAAG
aatA_full_Pacl_r	CTTAATTAATCAAATGTTGGCTTGGATCGC
Efimov_seq_re	GTGGAATTGTGAGCGGATAAC
Ascl_acvA_1000_C-term_f	AGGCGCGCCGACAAGCAAGCAATCGATAAC
acvA_PTS1_Pacl_re	GTTAATTAATCAAAGCTTGAATATCTGGCG
ipnA_PTS1_Pacl_re	GTTAATTAATCAAAGCTTGGAGGTCTGG

alcA_seq_fwd	CAAGGTTCTCAGTCTCACCA
pyrG 5'raus	CAATTGCGACTTGGACGAC
pyrG 3'raus	GAGTATGCGGCAAGTCATG
pyro 5'raus	CGTCAGGAACAGCTGGAAACGCC
pyro 3'raus	GGCCAAGAGAGGATGGTAATTGC
acvA_1350_re	GCTCAAGCAATGCTCTAGAC
RT_acvA_fwd	CAATCCGTTCCAAACAGACAGTG
RT_acvA_re	GCGAATCTTGACCTGGAAGTC
RT_ipnA_fwd	CGCTTCGCGTGATACTGG
RT_ipnA_re	CACGAATCGCAAGGTCCC
RT_aatA_fwd2	GGGTCTACCCACTATCAAATG
RT_aatA_re	GTACTIONTCGAGGGCCATGC
H2B RTQ fw	CTGCCGAGAAGAAGCCTAGCAC
H2B RTQ re	GAAGAGTAGGTCTCCTTCCTGGTC
Teil II	
GFP-CAAX_fwd	atatggtaccATGAGTAAAGGAGAAGAACTTT
GFP-CAAX_re1	GATCCACATCCCTTCGGCGCGCCTTTGTATAG
GFP-CAAX_re2	TTAATTAATCACATCACGATGCAGCATCCACATCCCTTCGG
Ascl_Rib2_fwd	aGGCGCGCCATGTCTCTTGTCCTCCGTCG
Ascl_Rib7_fwd	aGGCGCGCCATGGACCATGGCGTTTCTGG
KpnI_Rib4_fwd	aaGGTACCATGCAATCTCTTAAAGGGCCCG
Ascl_Rib4_fwd	aGGCGCGCCATGCAATCTCTTAAAGGGCCCG
KpnI_Rib5_fwd	aaGGTACCATGTTTACCGGACTGGTTGAAAC
Ascl_Rib5_fwd	aGGCGCGCCATGTTTACCGGACTGGTTGAAAC
Rib2_Pacl_re	aTTAATTAATCAAGCAGTCCCGGCAGCAG
Rib7_Pacl_re	aTTAATTAATTAGGATGAAACCGTGCTGGTGG
Rib4_Pacl_re	aTTAATTAATCAAGCAACCTCGCCCTTTGCC
Rib5_Pacl_re	aTTAATTAATTATCTTCCGTTCAACTTCTCGTCC
Pacl_Rib2_CAAX_r	aTTAATTAATCACATCACGATGCAGCATCCACATCCCTTAGCAGTCCCGGCAGCAG
Pacl_Rib7_CAAX_r	aTTAATTAATCACATCACGATGCAGCATCCACATCCCTTGGATGAAACCGTGCTGGTGG
Pacl_Rib4_CAAX_r	aTTAATTAATCACATCACGATGCAGCATCCACATCCCTTAGCAACCTCGCCCTTTGCC
Pacl_Rib5_CAAX_r	aTTAATTAATCACATCACGATGCAGCATCCACATCCCTTTCTTCCGTTCAACTTCTCGTCC
Linker_alcA_f	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCCCGGGCTGAAAAGCTGATTGTGATAG
argB_Linkers_re	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCCCCGGGgcgaaagcttgcatgcaataattg
alcA_GFP_re	CTCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATCTAATTAAGTACTGAGTAGAGAACTGTTG

GFP_fwd	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCAC
GFP_ohne STOP_re	TTTGTATAGTTCATCCATGCCATG
GFP_Rib1_fwd	GATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAAATGGCGAATTTACCGTCTCATG
Rib1_argB_re	ctctatccagcacattcttctgagcggccTCATTGAATCATATGGCCCATTTTAG
Rib1_argB_fwd	GATTTCTAAAATGGGCCATATGATTCAATGAggccgctcagaagaatgtgc
Rib1_CAAX_re	TCACATCACGATGCAGCATCCACATCCCTTTTGAATCATATGGCCCATTTTAGAAATC
CAAX_argB_fwd	AAGGGATGTGGATGCTGCATCGTGATGTGAggccgctcagaagaatgtgc
alcA_RFP_re	CTCCTTGATGACGTCCTCGGAGGAGGCCATCTAATTAAGTACTGAGTAGAGAACTGTTG
RFP_fwd	ATGGCCTCCTCCGAGGACG
RFP_re_oSTOP	GGCGCCGGTGGAGTGG
alcA_Rib3_re	GAATTGAAGCGCGGGGTCCGTGCGCGAAGGCATCTAATTAAGTACTGAGTAGAGAACTGTTG
Rib3_fwd	ATGCCTTCGCCGACGGACC
Rib3_re	TCAGTGTTTCCCATTGACAGC
Rib3_argB_fwd	CTGGTGATGCTGTCAATGGGAAACTGAggccgctcagaagaatgtgc
Rib3_CAAX_re	TCACATCACGATGCAGCATCCACATCCCTTGTGTTTCCCATTGACAGCATCAC
RFP_Rib3_fwd	GCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGCCATGCCTTCGCCGACGGACC
Rib3_argB_re	cctctatccagcacattcttctgagcggccTCAGTGTTTCCCATTGACAGC
Rib3_argB_fwd	CTGGTGATGCTGTCAATGGGAAACTGAggccgctcagaagaatgtgc
Rib3_CAAX_re	TCACATCACGATGCAGCATCCACATCCCTTGTGTTTCCCATTGACAGCATCAC
CAAX_re	CATCACGATGCAGCATCCAC

Klonierung in pJET

Hierzu wurde das CloneJET™ PCR Cloning Kit von Fermentas benutzt. Mit Hilfe der T4 DNA-Ligase wurde das PCR –Produkt in den blunt-end Vektor kloniert (Verhältnis 1:3). Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur, um eine hohe Aufnahme des PCR-Produktes in den Vektor zu gewährleisten.

Transformation von *E. coli*

TOP 10-Zellen wurden 3 min auf Eis aufgetaut und anschließend 5 µL der zu transformierenden DNA zugegeben. Nach 5 min auf Eis folgte ein Hitzeschock 30 Sekunden bei 42°C und die Zugabe von 300 µL SOC-Medium. Dann wurden die Bakterien 1 h lang bei 37°C schüttelnd inkubiert und auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert.

Protoplastentransformation von *A. nidulans*

Um *A. nidulans*-Protoplasten zu gewinnen, wurden alle Sporen einer bewachsenen MM-Platte (mit entsprechenden Auxotrophie-Markern) mit etwas Flüssigmedium abgenommen. 500 mL Minimalmedium in einem 1-Liter Kolben wurden damit beimpft und über Nacht bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur durch steriles Miracloth und einen Trichter abfiltriert und mit sterilem Wasser gewaschen. Danach wurde 1 Gramm des Myzels entnommen, in ein 50 mL Falcon überführt und 10 mL vorgekühlte Lösung 2 zugegeben und gevortext. Dann wurde das Mycel mit 200 mg Glucanex 5 min auf Eis inkubiert und danach in einen 100 mL Erlenmeyerkolben überführt und 1,5 Stunden bei 30°C mit 120 rpm schüttelnd inkubiert. Nach einer mikroskopischen Kontrolle der Protoplasten, wurden diese in ein neues 50 mL Falcon überführt und 10 mL vorgekühlte Lösung 2 zugegeben (Gesamtvolumen 20 mL). Diese 20 mL wurden nun auf 2 50 mL Falcons aufgeteilt, die Suspension vorsichtig mit vorgekühlter Lösung 5 überschichtet und 12 min mit 4.000xg bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde die Protoplastenbande (Interphase) mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in ein neues, steriles 50 mL Falcon gegeben. Anschließend wurde das zwei-fache Volumen Lösung 6 zugegeben und 12 min mit 2.800xg bei 4°C zentrifugiert um die Protoplasten zu pelletieren. Danach wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 1 mL vorgekühlter Lösung 6 resuspendiert und in eines steriles 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Durch eine anschließende Zentrifugation 5 min mit 2.800xg bei 4°C wurden die Protoplasten erneut pelletiert und das Pellet danach in 400 – 1.000 µL (je nach Anzahl der Transformationen; 200 µL pro Transformation) vorgekühlter Lösung 7 resuspendiert.

Für die nun folgende Transformation wurden 2 MMR – Platten pro Transformation und zusätzlich je eine MMR-Platte für Positiv- und Negativkontrolle vorbereitet (richtige Selektionsmarker). Zusätzlich wurde der MMR-TOP-Agar vorgewärmt und bei 50°C gelagert. Pro Transformation wurde 1 Falcon verwendet, in das zuerst 100 µL Lösung 8 vorgelegt wurde. Danach wurden 3 -10 µL DNA (etwa 10µg DNA) mit Lösung 7 auf 50 µL aufgefüllt, mit 200 µL Protoplasten gemischt (In das Kontrollfalcon wurde keine DNA zugegeben) und diese 250 µL zu den 50 µL Lösung 8 zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 1 mL Lösung 8 zugegeben, mit der Suspension gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Suspension mit Lösung 7 auf 5 mL aufgefüllt, mit 25 mL MMR-TOP gemischt und sofort auf die schon vorbereiteten MMR-Platten gegossen. Diese Platten wurden 2 bis 3 Tage bei 37°C inkubiert.

Tabelle 21: Lösungen für die Protoplastentransformation von *A. nidulans*

Reagenzien und Medien	Zusammensetzung
Glukose (10x)	200 g Glukose pro Liter; (autoklavieren)
Ammonium-Tartrat (100x)	9,2 g pro Liter; (autoklavieren)
MMR (500mL)	10 mL Salzsäurelösung (ohne Stickstoff); 0,5 mL Spurenelemente; benötigte Vitamine (Marker); 171 g Saccharose; 7,5 g Agar; mit Wasser auf 500 mL auffüllen; pH 6,8; nach dem autoklavieren 10 mL Ammoniumtetrat und 50 mL Glukose zugeben
MMR-TOP (500mL)	10 mL Salzsäurelösung (ohne Stickstoff); 0,5 mL Spurenelemente; 171 g Saccharose; 3 g Agar; mit Wasser auf 500 mL auffüllen; autoklavieren
Lösung 2 (50mL) frisch ansetzen	14,9 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$; 1,8 mL Na_2HPO_4 (0,2 M); 0,7 mL NaH_2PO_4 (0,2 M); pH 5,5; steril filtrieren ; Lagerung bei 4°C
Lösung 5 (100mL)	10,9 g Sorbitol; 10 mL TrisHCl 1 M pH 7,5; autoklavieren
Lösung 6 (100mL)	18,22 g Sorbitol; 1 mL TrisHCl 1M pH 7,5; autoklavieren
Lösung 7 (100mL)	18,22 g Sorbitol; 1 mL TrisHCl 1 M pH 7,5; 1 mL $CaCl_2$ 1 M; autoklavieren
Lösung 8 (50mL)	30 g PEG-4000 oder PEG-6000; 0,5 mL Tris-HCl 1 M pH 7,5

Mikroskopische Methoden

Die mikroskopischen Beobachtungen und Bilder wurden an einem Zeiss Axio Imager Z.1 mit einer Zeiss AxioCamMR Kamera durchgeführt. Die Aufnahmen von *A. nidulans* entstanden mit einem 63er oder einem 100er Plan-ApoChromat-Ölimmersionsobjektiv (Zeiss, Jena). Das Mikroskop und die Kamera wurden mit der Zeiss AxioVision Software bedient. Als Quelle für Fluoreszenzlicht diente eine HBO103 Quecksilberdampf Lampe (Osram).

Präparation von *A. nidulans* für die Mikroskopie

Um biologisches Material, zum Beispiel auskeimende Sporen, mit Hilfe des Mikroskops zu beobachten, wurden Deckgläschen sterilisiert und in ebenso sterile Petrischalen gelegt. Die Deckgläschen wurden dann mit 400 μ L des entsprechend mit Auxotrophiemarkern supplementierten Mediums (Tabelle 22) betropft und danach mit den dazugehörigen Sporen einer frischen Pilzkultur mittels eines sterilen Zahnstochers beimpft. Die Proben wurden bei Raumtemperatur oder bei 30°C jeweils im Dunkeln inkubiert. Um diese Proben am nächsten Tag zu untersuchen, wurden die Deckgläschen aus der Schale genommen, das Medium leicht abgetropft und dann mit der bewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt, mit Immersionsöl beschichtet und unter dem Mikroskop betrachtet.

Tabelle 22: Medium für die Mikroskopie

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Mikroskopiemedium	50 mL SalzstammLösung; 1 mL Spurenelementlösung (1000x); 1 mL Vitaminstocklösung (1000x); 2% Glycerin; pH 6,5; 0,3 g Uradin; 0,3 g Uracil

Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurde das DIC-Verfahren (Differential Interference Contrast, nach Nomarsky) angewandt. Mit dieser Methode werden Unterschiede in der optischen Dichte des Präparats in Kontrastunterschiede des Bildes konvertiert. Damit lassen sich pseudoplastische Bilder erstellen, die allerdings nicht die wahren räumlichen Strukturen wiedergeben.

Tabelle 23: Verwendete Filter für die Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzfarbstoff	Erregerfilter (Bandpassfilter) [nm]	Farbteiler [nm]	Sperrfilter (Langpassfilter) [nm]
GFP	450-490	510	520
RFP	546	580	590
DAPI	365	395	397

Zu Teil I

Penicillin-Messung

Penicillin Produktionsmedium (PPM) wurde nach folgendem Rezept hergestellt. „Corn steep solids“, 40 g/L; Threonin, 20 g/L; CaCO₃, 10 g/L; KH₂PO₄, 7 g/L; Phenoxyessigsäure, 0,5 g/L und jeweils Uridin und Uracil 1 g/L. Das Medium wurde auf 400 mL mit destilliertem Wasser aufgefüllt und zu einem finalem pH von 6 mit 10 M KOH justiert und danach autoklaviert. Laktose (200 g/L) und MgSO₄ x 7 H₂O (4,5 g/L) wurden separat autoklaviert und 100 mL Laktose, 1 mL MgSO₄ x 7 H₂O, pyro (1000x, 0,1 g/100 mL H₂O) und Biotin (1000x, 0,1 g/ 100 mL H₂O) wurden zu den 400 mL hinzugegeben. 4 x 10⁶ Sporen jedes Stammes wurden in 50 mL PPM (100 mL Kolben) bei 26°C und 200 rpm für 48 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Myzel durch Filtration mit Miracloth geerntet und bei Raumtemperatur 48 Stunden getrocknet. Der Überstand nach der Filtration wurde 1,5 Minuten bei 2340 xg zentrifugiert und im Penicillin-Assay eingesetzt mit *Geobacillus stearothermophilus* als Indikatororganismus. Ein Tag vor dem Assay wurde *G. stearothermophilus* als Vorkultur über Nacht angeimpft. Die gesamte Vorkultur wurde zu 500 mL LB Medium gegeben und große Petrischalen wurden mit 100 mL dieser Mischung befüllt. Nach Erstarren des Mediums wurden Löcher mit 0,9 cm

Durchmesser in das Medium gestochen und der Inhalt entfernt. 180 µL des abzentrifugierten Überstandes wurde in die Löcher pipettiert und die Platten wurden über Nacht bei 55 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Durchmesser der bakteriellen Hemmhöfe gemessen und produziertes Penicillin wurde mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt. Das gemessene Penicillin wurde relativiert zur Trockenmasse des Myzels. Alle Stämme in dieser Arbeit, die zur Penicillinproduktion verwendet wurden, existieren in drei biologischen Replikaten aus unabhängigen Transformationen.

Für jedes Experiment wurde ein Penicillinase – Versuch durchgeführt. Die Überstände wurden mit 5 Units Penicillinase von *Bacillus cereus* (Sigma-Aldrich, USA) unter Verwendung der Angaben des Herstellers inkubiert.

RNA-Isolierung

Die Gewinnung des Myzels erfolgte wie im “Penicillin Bioassay” beschrieben um die Expression der Gene unter Produktionsbedingungen messen zu können. Dieses Myzel wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und zwei Spatelspitzen in ein RNase freies 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Für die Isolierung der RNA wurden 500 µL RB-Puffer aus dem Fungal RNA Mini-Kit (Omega Bio-Tek, USA) zu dem gefrorenen Myzel gegeben und durch Vortexen gemischt. Es folgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde auf die erste Säule des Kits gegeben und für 5 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß gegeben und mit 250 µL EtOH (100%) behandelt. Anschließend wurde die Suspension direkt auf die zweite Säule überführt und es folgte eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13.000 rpm. Der Durchfluss wurde verworfen. Im Anschluss wurden 500 µL RNA Wash Buffer I auf die Säule gegeben und für 30 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde abermals verworfen und es folgte eine Behandlung mit 700 µL RNA Wash Buffer II mit anschließender Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13.000 rpm. Der Waschschrift wurde ein weiteres Mal mit 500 µL RNA Wash Buffer II und einer Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13.000 rpm durchgeführt. Die Säule wurde danach in ein neues 2 mL Auffanggefäß gegeben und für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Säule in ein 1,5 mL RNase freies Reaktionsgefäß gegeben. Die RNA wurde mit 50 µL RNase freiem DEPC-Wasser und einer Zentrifugation für abermals 1 Minute und bei 13.000 rpm eluiert.

Mittels des TURBO DNA-free Kits (Invitrogen, Karlsruhe) wurden mögliche DNA-Verunreinigungen entfernt. Zu der in DEPC-Wasser gelösten RNA wurde das 0,1-fache Volumen an 10x TURBO DNase Buffer und 1 µL TURBO DNase gegeben und leicht gevortext. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 37°C. Im Anschluss wurde das 0,1-fache Volumen an DNase Inactivation Reagent zugegeben und gevortext. Danach wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei gelegentlich leicht gevortext wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 1,5 Minuten bei 13.000 rpm. Zuletzt wurde der

Überstand in ein neues RNase freies 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Quantität und Qualität der RNA durch Gelelektrophorese überprüft. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Nanodrop Spektrophotometer ND-1000 (Peqlab, Erlangen) gemessen.

Quantitative Real Time PCR

Für die Durchführung der quantitativen Real Time PCR wurde von jedem zu untersuchenden Stamm RNA aus drei unabhängigen biologischen Replikaten eingesetzt. Von jeder RNA- Probe wurden zwei technische Replikate erstellt. Als Kontrollgen diente das Histon 2B Gen (H2B). Die Konzentration der RNA wurde mit DEPC-H₂O auf 40 ng/μL eingestellt. Pro Reaktion wurden je 1 μL Forward- Primer und 1 μL Reverse- Primer, 12,5 μL 2x SensiFAST™ SYBR & Fluorescein One-Step Mix, 0,25 μL Reverse Transkriptase, 0,5 μL RiboSafe RNase Inhibitor, 7,75 μL RNase freies H₂O und 2 μL der zu untersuchenden RNA eingesetzt. Alle Reagenzien stammten von BIOLINE (Luckenwalde). Die Reaktion wurde im BioRad iCycler iQ bei folgenden Einstellungen durchgeführt. Zuerst wurde eine reverse Transkription für 10 Minuten bei 45°C durchgeführt. Danach erfolgte die Polymeraseninaktivierung für 2,5 Minuten bei 95°C. Es folgten 40 Zyklen mit je 10 Sekunden bei 95°C, Annealing für 30 Sekunden bei 57°C und Elongation für 30 Sekunden bei 60°C. Für die Dissoziationskurven wurde 1 Minute bei 95°C und 1 Minute bei 55°C angewandt. Für die Schmelzkurven wurden 81 Zyklen mit je 10 Sekunden bei 55°C angewandt, wobei pro Zyklus die Temperatur um 0,5°C gesenkt wurde.

Markierung von *acvA*

Um ein Konstrukt zur Markierung von *acvA* mit PTS1 herzustellen, wurde eine Fusion-PCR durchgeführt (Szewczyk *et al.*, 2006). Zuerst wurden die linke und die rechte Flanke des Konstrukts mit den Primern P1_*acvA*_PTS, P3_*acvA*_PTS und P4_*acvA*_PTS, P6_*acvA*_PTS amplifiziert. Die Primer PTS1_*pyroA*_fwd und *pyroA*_rev wurden verwendet um den Mittelteil zu amplifizieren. Die Primer P2_*acvA*_PTS und P5_*acvA*_PTS wurden verwendet um das komplette Fusion Konstrukt aus den drei Teilen mit Überhängen herzustellen. Das entstandene Konstrukt wurde in den Vektor pJet1.2/blunt ligiert (pAH04). pAH04 wurde in den *A. nidulans*-Stamm SJR2 transformiert (SAH07). Die homologe Integration wurde durch drei PCRs mit den Primerpaaren P1_*acvA*_PTS und *pyro*_5'raus; P6_*acvA*_PTS und *pyro*_3'raus; P2_*acvA*_PTS und P5_*acvA*_PTS bestätigt. Das PCR-Produkt des letzten Primerpaares wurde sequenziert um die Richtigkeit der PTS1-Sequenz zu bestätigen.

Alternativ wurde ein zweites Plasmid konstruiert, in dem ein mit PTS1 markiertes 1 kb Fragment des 3'-Endes von *acvA* unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors war (pAH12). Dieser Vektor wurde in SJR2 transformiert und ergab SAH14. Das PTS1 markierte Gen war unter Kontrolle des natürlichen Promotors. Die homologe Integration des zirkulären Plasmids wurde mittels PCR mit den Primern

P1_acvA_PTS und Efimov_seq_re bestätigt. Das PCR-Produkt wurde sequenziert um die Richtigkeit der PTS1-Sequenz nachzuweisen.

Um einen Stamm mit überexprimiertem *acvA::PTS1* herzustellen, wurden die Primer KpnI_acvA_1000_f und acvA_1000_PacI_re verwendet um 1 kb des 5'-Endes von *acvA* zu amplifizieren. Durch einen Verdau des PCR-Produktes und des Vektors pMCB17apx mit den Enzymen *KpnI* und *PacI* und anschließender Ligation entstand der Vektor pAH09. Dieser enthielt 1 kb des 5'-Endes von *acvA* unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors. pAH09 wurde in *A. nidulans* SAH14 transformiert und es entstand SAH37. Die homologe Integration des zirkulären Plasmids wurde mittels PCR mit den Primern *alcA_seq_fwd* and *acvA_1350_re* nachgewiesen. Um Kombinationen mit einem Stamm zu testen, der das PTS1 markierte *acvA*-Gen unter der Kontrolle des natürlichen hatte, wurden die Stämme SAH19 und SAH31 mit zusätzlicher Überexpression von *ipnA* und SAH30 für die zusätzliche Überexpression von *aataA* hergestellt. Die Primer KpnI_ipnA_fwd und ipnA_PacI_rev wurden verwendet um das komplette *ipnA*-Gen zu amplifizieren. Das PCR-Produkt und pMCB17apx wurden verdaut mit den Enzymen *KpnI* und *PacI* und ligiert (pAH10). pAH10 wurde transformiert in SAH07 um SAH19 zu bekommen und in SAH14 um SAH31 herzustellen. Die Integration von pAH10 wurde mittels PCR mit den Primern *alcA_seq_fwd* and *ipnA_PacI_rev* überprüft. PCR mit den Primern *Ascl_aataA_fwd* and *aataA_full_PacI_r*, verdau des PCR-Produkts und des Vektors pMCB17apx mit den Enzymen *Ascl* and *PacI* und die folgende Ligation führte zu dem Vektor pAH23, welcher in SAH14 transformiert wurde (SAH30). Integration von pAH23 wurde mittels PCR mit den Primern *alcA_seq_fwd* and *aataA_full_PacI_r* überprüft.

Markierung von *ipnA*

Um zu überprüfen ob die Fusion von *IpnA* zu einer gesteigerten Penicillin-Produktion führte, wurde ein peroxisomales Zielsignal 1 (PTS1) mit Hilfe der Fusion-PCR Methode angefügt. Die Primer *alcA_seq_fwd* und *aataA_full_PacI_r* wurden verwendet um die linke Flanke zu amplifizieren, Primer P4_ipnA_PTS und P6_ipnA_PTS für die rechte Flanke und *pyrG_fwd* und *pyrG_rev* für den Mittelteil. Alle drei Teile wurden aufgrund ihrer Linker in einer PCR-Reaktion mit den Primern P2_ipnA_PTS und P5_ipnA_PTS zusammengefügt. Das entstandene PCR-Produkte wurden in den Vektor pJet1.2/blunt ligiert (pAH05). pAH05 wurde in *A. nidulans* SJR2 transformiert und es entstand SAH06. Die homologe Integration wurde mittels drei PCRs mit den Primerpaaren P1_ipnA_PTS und *pyrG_5'raus*; P6_ipnA_PTS und *pyrG_3'raus*; sowie P2_ipnA_PTS und P5_ipnA_PTS kontrolliert. Das PCR-Produkt des letzten Primerpaares wurde sequenziert um die Sequenz von PTS1 zu bestätigen. Stamm SAH38 wurde konstruiert durch Transformation von pAH12 in SAH06. Bei diesem Stamm waren alle drei Proteine der Penicillin-Produktion (*AcvA*, *IpnA* und *AataA*) in den Peroxisomen.

Kolokalisierung der Enzyme der Penicillin-Biosynthese mit einem peroxisomalen Marker

Die peroxisomale Lokalisierung der Enzyme wurde mit *AcuE* nachgewiesen, einem etablierten Marker für Peroxisome. Doppelverdau der Vektoren pAH13 und pMCB17apx mit *Ascl* und *Pacl* und die Ligation des Inserts von pAH13 und Rückrades von pMCB17apx ergab den Vektor pAH27.

Zuerst wurde ein Stamm mit GFP markiertem *Ipna* konstruiert. pAH27 wurde in SJR2 transformiert und die Transformanten wurde mittels Mikroskopie auf Richtigkeit überprüft (SAH23). Das Plasmid pYZ12, welches das mit mRFP markierte *acuE* unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors enthielt, wurde in SAH23 transformiert und ergab SAH33. Um *acvA* mit GFP zu markieren und es unter die Kontrolle des *alcA*-Promotors zu stellen und um einen Stamm mit zum einen GFP markiertem *acvA* mit PTS1 unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors und zum anderen mRFP markiertes *acuE* unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors zu haben war eine Ko-Transformation notwendig. Ein Plasmid mit einem durch GFP markierten 1 kb Teil des 5'-Endes von *acvA* (pAH12) wurde hergestellt mittels PCR mit den Primern *Ascl_acvA_1000_f* und *acvA_1000_Pacl_re*, einem Doppelverdau des PCR-Produkts und es Vektors pMCB17apx mit den Enzymen *Ascl* und *Pacl* und Ligation dieser beiden Teile. pAH21 wurde zusammen mit pZY12 in SAH14 transformiert (SAH34). Die Transformanten wurden mittels Mikroskopie auf ihre Richtigkeit überprüft.

Steigerung der Peroxisomenzahl

Um den Effekt einer höheren Peroxisomenzahl auf die Penicillin-Produktion zu testen, wurde *pexK* überexprimiert. Peroxisomen wurden mit *AcuE* sichtbar gemacht (siehe vorherigen Abschnitt). pYZ12 wurde in SJR2 transformiert um die Anzahl der Peroxisomen im Wildtyp zu zählen (SAH10). Für die Überexpression von *pexK* wurde das komplette Gen mit den Primern *KpnI_pexK_fwd* und *Pacl_pexK_re* amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt und der Vektor pMCB17apx wurden verdaut mit den Enzymen *KpnI* und *Pacl* und ligiert (pAH06). pAH06 und pYZ12 wurden in SJR2 kotransformiert und ergaben SAH11. SAH10 und SAH11 wurden mittels Mikroskopie auf ihre Richtigkeit überprüft. Um die Penicillin-Produktion zu messen wurde pAH06 in SJR2 transformiert (SAH12).

Überexpression der Penicillingene

Zur Überexpression von *acvA* wurden die Primer *Ascl_acvA_1000_f* und *acvA_1000_Pacl_re* für eine PCR und *Ascl* und *Pacl* für einen Verdau mit anschließender Ligation verwendet um ein 1 kb Stück des 5'-Endes von *acvA* unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors zu erhalten (pAH14). pAH14 wurde in SJR2 transformiert und ergab SAH16. Für die Überexpression von *ipnA* wurden die Primer *Ascl_ipnA_fwd* und *ipnA_Pacl_rev* für eine PCR und *Ascl* und *Pacl* für einen Verdau mit folgender Ligation

verwendet um das komplette *ipnA*-Gen unter die Kontrolle des *alcA*-Promotors zu bekommen (pAH15). pAH15 wurde in SJR2 transformiert und ergab SAH24. Für die Überexpression von *aatA* wurde pAH23 in SJR2 transformiert (SAH36). Für die Kombination einer Überexpression von *acvA* und *ipnA* wurden die Vektoren pAH14 und pAH15 in SJR2 kotransformiert (SAH25). Für die Überexpression aller drei Enzyme wurde pAH23 (*aatA*) in SAH25 transformiert (SAH28). Die homologe Intregation von pAH14 wurde mittels PCR mit den Primern *alcA_sec_fwd* und *acvA_1350_re* bestätigt. Die Integration von pAH15 wurde mittels PCR mit den Primern *alcA_seq_fwd* und *ipnA_Pacl_rev* bestätigt. Die Integration von pAH23 wurde mittels PCR mit den Primern *alcA_seq_fwd* und *aatA_full_Pacl_r* bestätigt.

Zu Teil II

Markierung der Riboflavin-Biosynthesenzyme Rib1 und Rib3 mit und ohne CAAX-Motiv durch GFP oder RFP mittels Hefe-Rekombination

Für die Hefe-Rekombination mussten DNA-Stücke mittels PCR hergestellt werden, die sich teilweise überlappten. Hierzu sind im Vektor pRS426 (Christianson *et al.*, 1992) definierte Rekombinationsstellen angegeben, die um die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* herum liegen. Sie liegen durch einen Verdau mit diesen Enzymen automatisch an die beiden Enden des Vektors. Der "Linker forward" hat dabei die Sequenz GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACG. Der "Linker reverse" hat die Sequenz GCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGC. Diese beiden Sequenzen sind jeweils 30 bp lang. Sie wurden mit Hilfe von Primern an das erste (5'Ende) und das letzte (3'Ende) Stück eines jeden Konstruktes amplifiziert. Da viele Primer sehr lang sind, wurde für jedes Stück, unabhängig von der Schmelztemperatur der Primer, das gleiche PCR-Programm ("Top-Down-PCR") verwendet. Nach einem Initialen Schritt 30 Sekunden bei 98°C, folgten drei Zyklen mit jeweils 98°C für 15 Sekunden, 68°C/63°C/60°C für 30 Sekunden, 72°C mit einer Dauer je nach der Länge des Fragmentes (Phusion-Polymerase; 1kb in 15-30 Sekunden). Danach folgte ein finaler Elongationsschritt mit 72°C für 5 Minuten. Die Primer sind in Tabelle 20 aufgeführt. Die Fragmente wurden auf einem Gel kontrolliert. Falls nur die gewünschte Bande vorhanden war, wurden direkt 2 µL der PCR in die Rekombination eingesetzt. Wenn zusätzliche Banden vorhanden waren, wurden mehrere PCR-Ansätze gemacht und alle mit einem Gel-Aufreinigungskit gereinigt um eine Konzentration von 100 ng/µL zu erreichen.

Für die Rekombination wurde der Hefevektor pRS426 (Abbildung 35) mit *EcoRI* und *XhoI* verdaut, aufgereinigt und auf eine Konzentration von 100 ng/µL eingestellt. Eine Übernachtskultur des Hefestammes WW-YH10 wurde mit 200 rpm und 30°C in YPD (1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 1% Glukose) angeimpft. Von dieser Übernachtskultur wurden am nächsten Tag 10 mL in 200 mL frischen YPD angeimpft und bei 30°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 1 erreicht wurde. Danach wurden die Zellen bei 2.000 rpm 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 25 mL sterilem Wasser gewaschen und erneut 10 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 mL Lithiumacetat-Lösung (100 mM Lithiumacetat; 10mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8) resuspendiert und danach erneut 10 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 300 -500 µL Lithiumacetat-Lösung gelöst und 30 min bei 30°C inkubiert. Modifiziert nach (Ivanova *et al.*, 2013; Schiestl & Gietz, 1989)

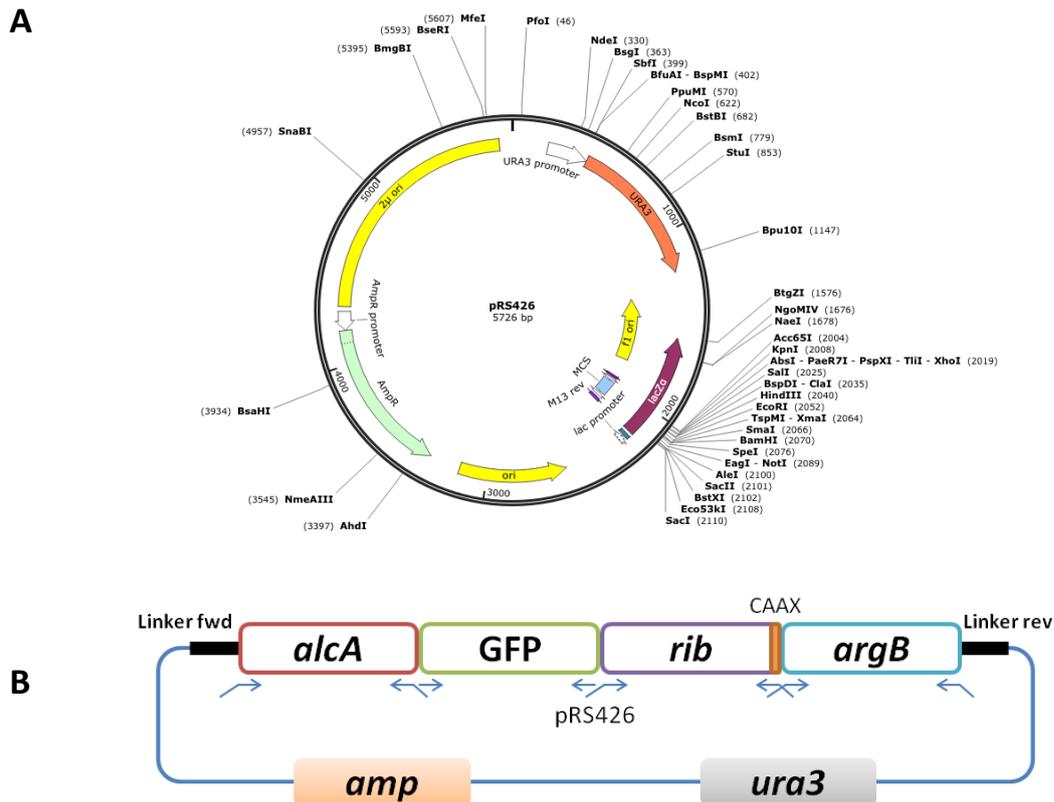


Abbildung 35: Hefe-Rekombination. (A) Hefe-Transformationsvektor pRS426 (Christianson et al., 1992). Der Vektor wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *XhoI* linearisiert. Das vorhandene *ura3*-Gen hatte keine Wirkung in *Aspergillus* (experimentell bestätigt). (B) Die vier mit Hefe-Rekombination hergestellten Vektoren pAH49, 50, 53 und 54 wurden nach diesem Schema erstellt. Jeder Linker (dargestellt durch schräge Striche an den Primerpfeilen) war 30 Basenpaare lang. Der *alcA*-Promotor wurde mit Linker in den Vektor und mit Linker zu GFP oder RFP; GFP oder RFP komplett ohne STOP-Kodon; das *rib*-Gen (entweder mit CAAX-Motiv oder ohne; das CAAX-Motiv wurde auch mit den Primern in das Konstrukt eingebracht) mit Linker zu GFP oder RFP und zu *argB* (Arginin); *argB* mit Linker zum *rib*-Gen und in den Vektor amplifiziert. Falls kein GFP im Vektor notwendig war (pAH51 und pAH52) änderte sich die Reihenfolge entsprechend. Für die Rekombination wurden alle Fragmente (Tabelle 24) mit pRS426 in einen Ansatz pipettiert. Die Hefe war damit in der Lage durch Rekombination der Linker einen kompletten Vektor herzustellen.

Für die **Transformation** wurden 50 μL der Hefezellsuspension in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß gegeben. Dann wurden 100 ng des zuvor verdauten Vektors pRS426 (1 μL), 2 μL jedes PCR-Fragmentes (direkt aus der PCR; falls mehrere Banden in der PCR vorhanden waren, wurde die PCR entweder optimiert oder mehrere PCRs angesetzt und die richtige Bande über ein Gel-Aufreinigungskit aufgereinigt bis eine Konzentration von 100 ng/ μL erreicht wurde; dann 1 μL in die Reaktion einsetzen), 25 μL Heringssperma (2 mg/mL; 5 min bei 95°C denaturiert und danach auf Eis oder bei -20°C gelagert) zu den Hefezellen gegeben. Danach wurden noch 300 μL PEG-Lösung (100 mM Lithiumacetat; 10mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8; 0,4 g/mL PEG4000) zu der Mischung gegeben und 30 min bei 30°C inkubiert. Danach wurde ein Hitzeschock für 30 min bei 42°C durchgeführt, 5 Sekunden an zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 μL sterilem Wasser gelöst. Die 100 μL wurden auf SC-URA Medium (1,54 g/L BSM-Ura Pulver, 1,71 g/L Hefestickstoffbasis-Medium, 5 g/L Ammoniumsulfat, 20 g/L Glukose und 20 g/L Agar) ausplattiert. Die Platten wurden 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.

DNA-Präparation aus Hefe

Acht Kolonien jeder Hefe-Transformation wurden zusammen in einem Röhrchen mit frischem SC-Ura Medium schüttelnd über Nacht bei 30°C inkubiert. Die entstandene Suspension wurde am nächsten Tag 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 200 µL Lysis-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% SDS; 2% Triton-X100; RNase A), mit 0,3 g Glasperlen und 200 µL Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Gemisch (25:24:1) resuspendiert, indem sie 2 min sehr stark gevortext wurden. Danach erfolgte eine Zentrifugation 10 min bei 13.000 rpm. Die oberste Phase (DNA) wurde abgenommen, in ein neues Gefäß pipettiert und 500 µL Chloroform zugegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation mit 13.000 rpm für 10 min wurde erneut die oberste Phase abgenommen und 1 mL Isopropanol zugegeben. Nach 60 Minuten inkubation bei -20°C wurde die DNA durch eine erneute Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min pelletiert. Danach wurden 500 µL 70%iges Ethanol zugegeben und erneut zentrifugiert um die Probe zu waschen. Das Ethanol wurde bei 68°C auf dem Heizblock verdampft und 20 µL Wasser zugegeben um die DNA zu lösen (Singh & Weil, 2002). 2 µL davon wurden in *E. coli* transformiert (siehe oben).

Tabelle 24: PCR-Fragmente zur Herstellung der Vektoren pAH49, pAH50, pAH51, pAH52, pAH53 und pAH54 mit Hilfe von Rekombination in Hefe.

Für Plasmid	PCR-Fragment	Primer	Template	Fragmentlänge	transformiert in ...	Entstandener Stamm
pAH49	1	Linker_alcA_f	pAH11 (alcA)	439	GR5	SAH57
		alcA_GFP_re				
	2	GFP_fwd	pAH21	714		
		GFP_ohne STOP_re				
3	GFP_Rib1_fwd	gDNA	1370			
	Rib1_argB_re					
4	Rib1_argB_fwd	pAH16 (arg)	1820			
	argB_Linkers_re					
pAH50	1	Linker_alcA_f	pAH11 (alcA)	439	GR5	SAH63
		alcA_GFP_re				
	2	GFP_fwd	pAH21	714		
		GFP_ohne STOP_re				
5	GFP_Rib1_fwd	gDNA	1369			
	Rib1_CAAX_re					
6	CAAX_argB_fwd	pAH16 (arg)	1820			
	argB_Linkers_re					
pAH51	7	Linker_alcA_f	pAH11 (alcA)	441	SRF200	(mit pAH39) SAH56
		alcA_Rib3_re				
	8	Rib3_fwd	gDNA	976		
Rib3_re						
9	Rib3_argB_fwd	pAH16 (arg)	1818			
	argB_Linkers_re					

pAH52	7	Linker_alcA_f	pAH11 (alcA)	441	GR5	(mit pAH40) SAH53
		alcA_Rib3_re				
	10	Rib3_fwd	gDNA	1004		
		Rib3_CAAX_re				
	6	CAAX_argB_fwd	pAH16 (arg)	1820		
		argB_Linkers_re				
pAH53	11	Linker_alcA_f	pAH11 (alcA)	438	GR5	SAH59
		alcA_RFP_re				
	12	RFP_fwd	pYZ12	675		
		RFP_re_oSTOP				
	13	RFP_Rib3_fwd	gDNA	1032		
		Rib3_argB_re				
	14	Rib3_argB_fwd	pAH16 (arg)	1818		
		argB_Linkers_re				
pAH54	11	Linker_alcA_f	pAH11 (alcA)	438	GR5	SAH60
		alcA_RFP_re				
	12	RFP_fwd	pYZ12	675		
		RFP_re_oSTOP				
	15	RFP_Rib3_fwd	gDNA	1033		
		Rib3_CAAX_re				
	6	CAAX_argB_fwd	pAH16 (arg)	1820		
		argB_Linkers_re				

Um die Vektoren und Stämme herzustellen mussten mehrere Fragmente in einen Ansatz gegeben werden.

Tabelle 24 zeigt neben den 15 unterschiedlichen Fragmenten die Kombination in der sie zur Herstellung des jeweiligen Vektors kombiniert wurden. Aus der DNA-Vorlage wurden die Fragmente amplifiziert. Das Primerdesign und damit das Design der Fragmente und deren Linker zeigt Abbildung 35. Die Vektoren wurden in *A. nidulans*-Stämme transformiert.

Rib1 und Rib3 wurden mittels Hefe-Rekombination mit dem CAAX-Motiv und den Fluoreszenzproteinen fusioniert. Gleichzeitig waren alle Konstrukte unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors.

Für *rib1* mit GFP und ohne CAAX wurden insgesamt vier Fragmente benötigt. Diese wurden mit den Primerkombinationen Linker_alcA_f und alcA_GFP_re; GFP_fwd und GFP_ohne STOP_re; GFP_Rib1_fwd und Rib1_argB_re; sowie Rib1_argB_fwd und argB_Linkers_re hergestellt. Aus den Fragmenten und dem Vektor pRS426 entstand der Vektor pAH49. Dieser wurde in den *A. nidulans* Stamm GR5 transformiert (SAH57). Für *rib1* mit GFP und mit CAAX wurden ebenfalls vier Fragmente benötigt. Diese wurden mit den Primerkombinationen Linker_alcA_f und alcA_GFP_re; GFP_fwd und GFP_ohne STOP_re; GFP_Rib1_fwd und Rib1_CAAX_re; sowie CAAX_argB_fwd und argB_Linkers_re

hergestellt. Aus dieser Kombination und dem Vektor pRS426 entstand mittels Rekombination das Plasmid pAH50. Dieses wurde in den Stamm GR5 transformiert und es entstand SAH63. Für *rib3* mit RFP und ohne CAAX wurde die Fragmente mit den Primerkombinationen Linker_alcA_f und alcA_RFP_re; RFP_fwd und RFP_re_oSTOP; RFP_Rib3_fwd und Rib3_argB_re; sowie Rib3_argB_fwd und argB_Linkers_re hergestellt. Durch Rekombination mit dem Vektor pRS426 entstand daraus der Vektor pAH53. Dieser wurde in den *A. nidulans*-Stamm GR5 transformiert. Es entstand der Stamm SAH59. Für *rib3* mit RFP und CAAX-Motiv am 3'-Ende wurden folgende Primerkombinationen zum Erstellen der Fragmente verwendet. Linker_alcA_f und alcA_RFP_re; RFP_fwd und RFP_re_oSTOP; RFP_Rib3_fwd und Rib3_CAAX_re; sowie CAAX_argB_fwd und argB_Linkers_re. Nach erfolgter Rekombination mit dem Vektor pRS426 entstand der Vektor pAH54. Dieser wurde in den Stamm GR5 transformiert (SAH60). Die Fragmente der durch Hefe-Rekombination hergestellten Vektoren pAH49, pAH50, pAH53 und pAH54, wie auch ihre Zusammensetzung und Länge können in Tabelle 24 eingesehen werden.

Markierung der Riboflavin-Biosynthesenzyme Rib2, Rib4, Rib5 und Rib7 mit und ohne CAAX-Motiv durch GFP oder RFP

In den folgenden Konstrukten standen ebenfalls alle Gene unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors. Das ergibt sich aus der ursprünglichen Verwendung des Vektors pMCB17apx, der vor der Ligationstelle den *alcA*-Promotor besitzt. Um die Lokalisation von Rib2 (ohne CAAX-Motiv) zu untersuchen wurde das Gen mit den Primern Ascl_Rib2_fwd und PacI_Rib2_CAAX_r aus genomischer DNA von *A. nidulans* mittels PCR amplifiziert, mit den Enzymen Ascl und PacI verdaut und in den ebenfalls mit diesen Enzymen verdauten Vektor pYZ16 (pMCB17apx mit GFP, *pyro*) ligiert. Nach erfolgter Transformation in *E. coli* und Kontrolle durch Restriktionsverdau entstand pAH33. Dieses Plasmid wurde in den *A. nidulans*-Stamm GR5 transformiert (SAH64). Für die Bestimmung der Lokalisation von Rib2 mit CAAX-Motiv wurde *rib2* mit den Primern Ascl_Rib2_fwd und PacI_Rib2_CAAX_r amplifiziert, das PCR-Produkt und der Vektor pYZ16 mit den Enzymen Ascl und PacI geschnitten und ligiert. Das resultierende Plasmid pAH34 wurde in den Stamm GR5 transformiert und es entstand SAH62. Um die Lokalisation von Rib4 (ohne CAAX-Motiv) zu untersuchen wurde *rib4* mit den Primern Ascl_Rib4_fwd und Rib4_PacI_re mittels PCR amplifiziert, mit Ascl und PacI geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pAH21 (pMCB17apx mit GFP, *pyr4*) ligiert (pAH41). pAH41 wurde in den *A. nidulans*-Stamm SRF200 transformiert und es entstand der Stamm SAH44. Für die Lokalisation von Rib4 mit CAAX wurde *rib4* mit den Primern Ascl_Rib4_fwd und PacI_Rib4_CAAX_r amplifiziert, mit den Enzymen Ascl und PacI geschnitten und in pAH21 ligiert. Es entstand pAH42. Dieser Vektor wurde in den Stamm GR5 transformiert und es entstand SAH58. Für die Ermittlung der Lokalisation von Rib5 (ohne CAAX)

wurde *rib5* mit *Ascl_Rib5_fwd* und *Rib5_Pacl_re* mittels PCR amplifiziert, mit den Enzymen *Ascl* und *Pacl* geschnitten und in den Vektor pZY07 (pMCB17apx mit RFP, *pyr4*), der mit den gleichen Enzymen geschnitten wurde, ligiert. Das daraus resultierende Plasmid heißt pAH45. Dieses wurde in den *A. nidulans*-Stamm SRF200 transformiert und es entstand der Stamm SAH45. Die Lokalisation von Rib5 mit CAAX-Motiv wurde ermöglicht durch die Amplifikation von *rib5* mittels PCR mit den Primern *Ascl_Rib5_fwd* und *Pacl_Rib5_CAAX_r*. Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *Ascl* und *Pacl* verdaut und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pYZ07 ligiert. Daraus entstand der Vektor pAH46, der in den *A. nidulans*-Stamm SRF200 transformiert wurde (SAH48). Für die Lokalisation von Rib7 (ohne CAAX) wurde *rib7* mit den Primern *Ascl_Rib7_fwd* und *Rib7_Pacl_re* amplifiziert, mit den Enzymen *Ascl* und *Pacl* verdaut und in den Vektor pYZ12 (pMCB17apx mit RFP, *pyro*) ligiert. Der daraus resultierende Vektor pAH37 wurde in den *A. nidulans*-Stamm TN02A3 transformiert und es entstand SAH50. Für die Lokalisation von Rib7 mit CAAX wurde *rib7* mit den Primern *Ascl_Rib7_fwd* und *Pacl_Rib7_CAAX_r* amplifiziert, mit den Enzymen *Ascl* und *Pacl* verdaut und in den Vektor pYZ07 ligiert. Der daraus entstandene Vektor pAH38 wurde in den *A. nidulans*-Stamm GR5 transformiert und es entstand SAH61.

Jedes Plasmid mit CAAX-Motiv wurde zusätzlich zu der Kontrolle durch Restriktionsverdau sequenziert. Aus allen entstandenen *A. nidulans* Stämmen wurde genomische DNA isoliert. Da in jedem Konstrukt das komplette Gen vorhanden ist und keine homologe Integration notwendig ist, wurde die Richtigkeit im Falle einer Transformation eines Konstrukts mit CAAX-Motiv mittels PCR mit den Primern *alcA_seq_fwd* und *CAAX_re* oder im Falle eines Konstrukts ohne CAAX-Motiv mittels PCR mit den Primern *alcA_seq_fwd* und einem Primer am 3'-Ende des Gens kontrolliert.

Alle Stämme wurden bei 28°C über Nacht in Minimalmedium mit Glycerin inkubiert und am nächsten Tag mikroskopisch ausgewertet (Abbildung 24).

Überexpression von Rib3, Rib4 und Rib5 mit und ohne CAAX-Motiv

Um die Auswirkungen von Überexpressionen einzelner Gene oder Kombinationen der Riboflavin-Biosynthese mit und ohne CAAX-Motiv auf die Produktion von FAD, FMN und Riboflavin (FFR) in *A. nidulans* zu bestimmen, wurde zunächst Rib3 wie im Abschnitt zuvor mit Hilfe der Hefe-Rekombination zum einen unter die Kontrolle des *alcA*-Promotors gestellt und zum anderen entweder mit oder ohne CAAX-Motiv markiert. Die Rekombination wurde genau wie für die Konstrukte im vorherigen Abschnitt durchgeführt. Für *alcA::rib3* wurden insgesamt drei Fragmente benötigt (Tabelle 24). Diese wurden mit den Primerkombinationen *Linker_alcA_f* und *alcA_Rib3_re*; *Rib3_fwd* und *Rib3_re*; sowie *Rib3_argB_fwd* und *argB_Linkers_re* mittels PCR amplifiziert. Aus den Fragmenten und dem Vektor pRS426 entstand der Vektor pAH51. Dieser wurde zusammen mit

pAH39 (*alcA::rib4*; Ko-Transformation) in den *A. nidulans* Stamm GR5 transformiert (SAH56). Für *alcA::rib3::CAAX* wurden ebenfalls drei Fragmente benötigt. Diese wurden mit den Primerkombinationen Linker_alcA_f und alcA_Rib3_re; Rib3_fwd und Rib3_CAAX_re; sowie CAAX_argB_fwd und argB_Linkers_re amplifiziert. Aus den Fragmenten und dem Vektor pRS426 entstand der Vektor pAH52. Dieser wurde zusammen mit pAH40 (*alcA::rib4::CAAX*; Ko-Transformation) in den *A. nidulans* Stamm GR5 transformiert (SAH53).

Die Überexpressionen von *rib4* und *rib5* wurden durch Amplifikation der Gene mittels PCR, darauf folgender Ligation und Transformation des entstandenen Plasmides in *A. nidulans* erreicht. *rib4* wurde mit den Primern KpnI_Rib4_fwd und Rib4_PacI_re mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Das PCR-Produkt und der Vektor pAH09 (pMCB17apx mit *alcA(p)::acvA 1 kb N-term*; *pyr4*; ohne GFP) wurden mit den Enzymen *KpnI* und *PacI* verdaut und ligiert. Das daraus entstandene Plasmid pAH39 wurde in *A. nidulans* SRF200 transformiert und es entstand SAH39. Für eine zusätzliche C-terminale Fusion mit dem CAAX-Motiv wurde *rib4* mit den Primern KpnI_Rib4_fwd und PacI_Rib4_CAAX_r aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert, mit den Enzymen *KpnI* und *PacI* verdaut und in den Vektor pAH09 ligiert. Der entstandene Vektor pAH40 wurde in den *A. nidulans*-Stamm SRF200 transformiert (SAH49). *rib5* wurde mit den Primern KpnI_Rib5_fwd und Rib5_PacI_re mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Das PCR-Produkt und der Vektor pAH09 wurden mit den Enzymen *KpnI* und *PacI* verdaut und ligiert. Das daraus entstandene Plasmid pAH43 wurde in *A. nidulans* SRF200 transformiert und es entstand SAH40. Für eine zusätzliche C-terminale Fusion mit dem CAAX-Motiv wurde *rib5* mit den Primern KpnI_Rib5_fwd und PacI_Rib5_CAAX_r aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert, mit den Enzymen *KpnI* und *PacI* verdaut und in den Vektor pAH09 ligiert. Der entstandene Vektor pAH44 wurde in den *A. nidulans*-Stamm SRF200 transformiert (SAH52).

Um die Produktion von FFR bei Kombinationen verschiedener überexprimierter Gene zu ermitteln und den Einfluss einer Lokalisation an der Membran auch in dieser Situation zu bestimmen, wurden mehrere Ko-Transformationen in *A. nidulans* durchgeführt. Nicht nur die schon beschriebenen Stämme SAH53 und SAH56, sondern auch Transformationen von pAH39 mit pAH43 in *A. nidulans* SRF200 ergaben SAH43 und pAH40 mit pAH44 in SRF200 ergaben SAH51.

Riboflavin-Assay

Riboflavin-Produktionsmedium (RPM) wurde nach folgendem Rezept hergestellt. „Corn steep solids“, 20 g/L; Salzstammlösung (20-fach), 50 mL; Saccharose, 40 g/L; Glukose oder Threonin, 20 g/L; Glyzin, 4 g/L; Asparagin, Uracil und Uridin je 1 g/L; Tween80, 1 mL; Vitamine (1000-fach) ohne Riboflavin, 0,5 mL; Spurenelemente (1000-fach), 0,5 mL wurden in 500 mL destilliertem Wasser gelöst. Der pH

wurde mit NaOH auf 6,5 eingestellt und das Medium autoklaviert. Danach wurden steriles Pyridoxin (1000x, 0,1 g/100 mL H₂O) und Arginin (100x, 1,2 g/ 100 mL H₂O) hinzugegeben.

4 x 10⁶ Sporen jedes Stammes wurden in 50 mL RPM (100 mL Kolben) bei 28°C und 200 rpm für 5 Tage inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Myzel durch Filtration mit Miracloth geerntet und bei Raumtemperatur 48 Stunden getrocknet. Ein immer gleicher Teil des Myzels (1 g Nassgewicht) wurden mit flüssigem Stickstoff gemörsert und die immer gleiche Menge Myzel in 1 mL Puffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer; 50 mM NaCl) aufgenommen. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Proben zwei Mal 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen, durch einen 1 µm Filter gefiltert und für die endgültige Analyse gelagert. Der Überstand nach der anfänglichen Filtration wurde 10 Minuten bei 2340 xg zentrifugiert und durch einen 1 µm Filter gefiltert. Proben wurden in dunkle Eppendorfgeläße abgefüllt und bei 4 °C dunkel gelagert bis sie per HPLC gemessen wurden. Generell wurde der kürzest mögliche Zeitraum bis zur Messung durch HPLC gewählt.

HPLC-Messung

Die HPLC-Messungen (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie; englisch "high performance liquid chromatography") der Proben des Riboflavin-Assays wurden mit einem Gerät von Knauer "Smartline" durchgeführt bei 25°C. Die Trennung erfolgte mit einer Phenomenex Luna 5u C18 Säule (250 x 4,6 mm). Detektiert wurden die Proben mit einem RF-20A Fluoreszenzdetektor der Firma Shimadzu (USA). Mobile Phase A bestand aus 20 mM Ammoniumformiat (pH 3,7; 1,26 g/L; LP) und mobile Phase B aus 100% Methanol. Pro Durchgang wurden 20 µL Probe eingespritzt. Zuerst wurde ein Gradient von 80% auf 60% LP in vier Minuten gefahren. Danach wurde das Mischverhältnis für zwei Minuten nicht verändert (isokrater Lauf). Dann wurde ein Gradient von 60% LP zurück auf 80% innerhalb von zwei Minuten gefahren und danach isokrat bis der Lauf bei insgesamt 15 Minuten gestoppt wurde. Die Extinktionswellenlänge für FAD, FMN und Riboflavin liegt bei 445 nm (Angaben Hochschule Mannheim). Detektiert wurden die Messungen bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm. Die Fläche der "Peaks" wurde mit der Software "ChromStar 7" der Firma SCPA ermittelt und für die Quantifizierung verwendet.

Enzymassay für Riboflavin-Synthase (Rib5)

Für die Proteinextraktion wurden die Stämme wie für die HPLC-Analyse inkubiert und die Proteine wie die Myzelproben für die HPLC-Analyse präpariert.

4×10^6 Sporen jedes Stammes wurden in 50 mL RPM (100 mL Kolben) bei 28°C und 200 rpm für 5 Tage inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Myzel durch Filtration mit Miracloth geerntet und bei Raumtemperatur 48 Stunden getrocknet. Ein immer gleicher Teil des Myzels (1 g Nassgewicht) wurden mit flüssigem Stickstoff gemörsert und die immer gleiche Menge Myzel in 1 mL Puffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer; 50 mM NaCl; 3 mM Benzamidin) gegeben. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Proben zwei Mal 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen. Danach wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Es wurden dafür das Roti®-Quant Reagenz von Roth (Karlsruhe) und Acryl-Küvetten (Sarstedt, Nürnberg) verwendet. Diese Messung basiert auf dem Coomassie® Brilliant Blue G-250 Farbstoff. 200µl Roti®-Quant Reagenz wurden zu den Proben (1 µl Proteinprobe / 800 µl ddH₂O) gegeben und gut durchmischt. Nach 5 Minuten wurde die Absorption mit einem Photometer (Pharmacia LKB, UltraspecIII) bei 595nm gemessen. Die Standardkurve wurde mit BSA erstellt. Daraus ergab sich der Faktor 23,4. Dieser, multipliziert mit der OD₅₉₅ von 1 µL Probe, ergab die Proteinkonzentration in mg/mL.

Die Riboflavin-Synthase katalysiert die Dismutation von zwei DMRL Molekülen zu Riboflavin. Die Umsetzung kann spektrophotometrisch verfolgt werden. Die Methode wurde modifiziert nach (Bacher *et al.*, 1997). Die Reaktion beinhaltet 40 µL DMRL (6,7-dimethyl-8-ribityllumazin, 15 mM); 20 µL EDTA (0,5 M); 20 µL β-Merkaptoethanol (375 mM); 0,6 mg/mL Protein; aufgefüllt auf 1 mL mit Wasser. Die Reaktion wurde mit der Zugabe der Proteine gestartet. Die gesamte Messung lief 40 min bei OD₄₇₀ und bei einer Temperatur von 37°C.

Zur Berechnung wurde folgende Formel angewandt:

$$\frac{\Delta OD (40 \text{ min})}{\frac{\epsilon \frac{1}{\text{mol} \times \text{cm}}}{1000} \times 40 \text{ min} \times \frac{1 \text{ mL}}{x \text{ mL}} \times 1 \text{ cm}} = \frac{\Delta OD (40 \text{ min})}{\frac{9100}{1000} \times 40 \times \frac{1}{x} \times 1} = \frac{U}{\text{mg}}$$

ε ist dabei der Extinktionskoeffizient von Riboflavin, der für eine OD von 470 bekannt ist. Er beträgt $9100 \frac{1}{\text{M} \times \text{cm}}$. Die OD errechnet sich aus der Differenz nach 40 min und der Start-OD. 1 mL war das Probenvolumen und die Küvette war 1 cm dick. Das x steht für das eingesetzte Volumen an Protein um 0,6 mg/mL Protein zu erreichen. Durch diese Formel ließ sich also errechnen wie viele Einheiten ("Units", U) pro mg Protein im jeweiligen Stamm vorhanden waren.

Literaturverzeichnis

Adrio, J. L. & Demain, A. L. (2003). Fungal biotechnology. *Int Microbiol* **6**, 191-199.

Agne, B., Meindl, N. M., Niederhoff, K., Einwachter, H., Rehling, P., Sickmann, A., Meyer, H. E., Girzalsky, W. & Kunau, W. H. (2003). Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol Cell* **11**, 635-646.

Aharonowitz, Y., Cohen, G. & Martin, J. F. (1992). Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. *Annu Rev Microbiol* **46**, 461-495.

Aharonowitz, Y., Av-Gay, Y., Schreiber, R. & Cohen, G. (1993). Characterization of a broad-range disulfide reductase from *Streptomyces clavuligerus* and its possible role in beta-lactam antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol* **175**, 623-629.

Alvarez, E., Cantoral, J. M., Barredo, J. L., Diez, B. & Martin, J. F. (1987). Purification to homogeneity and characterization of acyl coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. *Antimicrob Agents Chemother* **31**, 1675-1682.

Alvarez, E., Meesschaert, B., Montenegro, E., Gutierrez, S., Diez, B., Barredo, J. L. & Martin, J. F. (1993). The isopenicillin-N acyltransferase of *Penicillium chrysogenum* has isopenicillin-N amidohydrolase, 6-aminopenicillanic acid acyltransferase and penicillin amidase activities, all of which are encoded by the single penDE gene. *Eur J Biochem* **215**, 323-332.

Andersen, M. R., Nielsen, J. B., Klitgaard, A. & other authors (2013). Accurate prediction of secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E99-107.

Archer, D. B. (2000). Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 478-483.

Arnstein, H. R. & Morris, D. (1960). The structure of a peptide, containing alpha-amino adipic acid, cystine and valine, present in the mycelium of *Penicillium chrysogenum*. *Biochem J* **76**, 357-361.

Ast, J., Stiebler, A. C., Freitag, J. & Bolker, M. (2013). Dual targeting of peroxisomal proteins. *Front Physiol* **4**, 297.

Atoui, A., Kastner, C., Larey, C. M., Thokala, R., Etxebeste, O., Espeso, E. A., Fischer, R. & Calvo, A. M. (2010). Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **47**, 962-972.

Azevedo, J. E. & Schliebs, W. (2006). Pex14p, more than just a docking protein. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 1574-1584.

Bacher, A. & Lingens, F. (1970). Biosynthesis of riboflavin. Formation of 2,5-diamino-6-hydroxy-4-(1'-D-ribitylamino)pyrimidine in a riboflavin auxotroph. *J Biol Chem* **245**, 4647-4652.

Bacher, A. & Mailander, B. (1973). Biosynthesis of riboflavin. The structure of the purine precursor. *J Biol Chem* **248**, 6227-6231.

Bacher, A., Baur, R., Eggers, U., Harders, H. D., Otto, M. K. & Schnepfle, H. (1980). Riboflavin synthases of *Bacillus subtilis*. Purification and properties. *J Biol Chem* **255**, 632-637.

Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Mortl, S., Kis, K., Kugelbrey, K., Scheuring, J. & Schott, K. (1997). Biosynthesis of riboflavin: lumazine synthase and riboflavin synthase. *Methods Enzymol* **280**, 389-399.

Barredo, J. L., Diez, B., Alvarez, E. & Martin, J. F. (1989). Large amplification of a 35-kb DNA fragment carrying two penicillin biosynthetic genes in high penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr Genet* **16**, 453-459.

BASF (1996). Vitamin B2 production comes to Ludwigshafen: Press release P 462.

Bennett, J. W. (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J Biotechnol* **66**, 101-107.

Berezovskii, V. M. (1973). Khimiya vitaminov (Chemistry of Vitamins). Moscow: Pishchevaya promyshlennost'.

Bergh, K. T., Litzka, O. & Brakhage, A. A. (1996). Identification of a major cis-acting DNA element controlling the bidirectionally transcribed penicillin biosynthesis genes *acvA* (*pcbAB*) and *ipnA* (*pcbC*) of *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **178**, 3908-3916.

Bernal, V., Castano-Cerezo, S., Gallego-Jara, J., Ecija-Conesa, A., de Diego, T., Iborra, J. L. & Canovas, M. (2014). Regulation of bacterial physiology by lysine acetylation of proteins. *Nat Biotechnol* **31**, 586-595.

Bigelis (1989). Industrial products of biotechnology: application of gene technology. *Biotechnol.*

Birkenmeier, M., Neumann, S. & Roder, T. (2014). Kinetic modeling of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* under production conditions. *Biotechnol Lett* **36**, 919-928.

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

Brakhage, A. A., Browne, P. & Turner, G. (1992). Regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis and penicillin biosynthesis genes *acvA* and *ipnA* by glucose. *J Bacteriol* **174**, 3789-3799.

Brakhage, A. A. (1998). Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 547-585.

Brakhage, A. A. & Caruso, M. (2004). Biotechnical genetics of antibiotic biosynthesis. Heidelberg: Springer.

Brakhage, A. A., Sprote, P., Al-Abdallah, Q., Gehrke, A., Plattner, H. & Tuncher, A. (2004). Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **88**, 45-90.

Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol* **11**, 21-32.

Brooke, A. G., Dijkhuizen, L. & Harder, W. (1986). Regulation of flavin biosynthesis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Microbiology* **145**, 62-70.

Brown, D. W., Yu, J. H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H. & Leonard, T. J. (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1418-1422.

Brown, S. D., Guss, A. M., Karpinets, T. V. & other authors (2011). Mutant alcohol dehydrogenase leads to improved ethanol tolerance in *Clostridium thermocellum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 13752-13757.

Brunner, R., Rohr, M. & Zinner, M. (1968). [On the biosynthesis of penicillin. Studies on the enzymatic activation of phenylacetic acid and phenoxyacetic acid as well as the formation of penicillin from 6-aminopenicillanic acid and activated side chain acids by mycelial homogenates and cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*]. *H-S Z Physiol Chem* **349**, 95-103.

Buchel, F., Rodriguez, N., Swainston, N. & other authors (2013). Path2Models: large-scale generation of computational models from biochemical pathway maps. *BMC Syst Biol* **7**, 116.

Burrows, R. B. & Brown, G. M. (1978). Presence of *Escherichia coli* of a deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin. *J Bacteriol* **136**, 657-667.

Calvo, A. M. (2008). The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol* **45**, 1053-1061.

Cerqueira, G. C., Arnaud, M. B., Inglis, D. O. & other authors (2014). The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Res* **42**, D705-710.

Chen, S. C., Shen, C. Y., Yen, T. M., Yu, H. C., Chang, T. H., Lai, W. L. & Liaw, S. H. (2013). Evolution of vitamin B2 biosynthesis: eubacterial RibG and fungal Rib2 deaminases. *Acta Crystallogr D* **69**, 227-236.

Cho, H., Uehara, T. & Bernhardt, T. G. (2014). Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell* **159**, 1300-1311.

Choi, O., Wu, C. Z., Kang, S. Y., Ahn, J. S., Uhm, T. B. & Hong, Y. S. (2011). Biosynthesis of plant-specific phenylpropanoids by construction of an artificial biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**, 1657-1665.

Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H. & Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119-122.

Clark, R. (1985). The Life of Ernst Chain: Penicillin and Beyond.

Cohen, G., Argaman, A., Schreiber, R., Mislovati, M. & Aharonowitz, Y. (1994). The thioredoxin system of *Penicillium chrysogenum* and its possible role in penicillin biosynthesis. *J Bacteriol* **176**, 973-984.

Contasti, V. & Bahar, S. (1988). Riboflavin production by *Candida guilliermondii* from liquid brewery waste. *Acta Cient Venez* **39**, 69-74.

Coquard, D., Huecas, M., Ott, M., van Dijk, J. M., van Loon, A. P. & Hohmann, H. P. (1997). Molecular cloning and characterisation of the *ribC* gene from *Bacillus subtilis*: a point mutation in *ribC* results in riboflavin overproduction. *Mol Gen Genet* **254**, 81-84.

Dahl, R. H., Zhang, F., Alonso-Gutierrez, J. & other authors (2013). Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters. *Nat Biotechnol* **31**, 1039-1046.

Dammai, V. & Subramani, S. (2001). The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* **105**, 187-196.

Dansen, T. B., Wirtz, K. W., Wanders, R. J. & Pap, E. H. (2000). Peroxisomes in human fibroblasts have a basic pH. *Nat Cell Biol* **2**, 51-53.

Degenkolb, T., von Dohren, H., Nielsen, K. F., Samuels, G. J. & Bruckner, H. (2008). Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chem Biodivers* **5**, 671-680.

Demain, A. L. & Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **69**, 1-39.

Diggins, F. W. (1999). The true history of the discovery of penicillin, with refutation of the misinformation in the literature. *Br J Biomed Sci* **56**, 83-93.

Duan, Y. X., Chen, T., Chen, X. & Zhao, X. M. (2010). Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase enhances riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1907-1914.

Eitinger, T., Rodionov, D. A., Grote, M. & Schneider, E. (2011). Canonical and ECF-type ATP-binding cassette cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 3-67.

Elander, R. P. (2003). Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 385-392.

Erickson, H. P. (2009). Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biol Proced Online* **11**, 32-51.

Fawcett, P. A., Usher, J. J. & Abraham, E. P. (1975). Behaviour of tritium-labelled isopenicillin N and 6-aminopenicillanic acid as potential penicillin precursors in an extract of *Penicillium chrysogenum*. *Biochem J* **151**, 741-746.

Fawcett, P. A., Usher, J. J., Huddleston, J. A., Bleaney, R. C., Nisbet, J. J. & Abraham, E. P. (1976). Synthesis of delta-(alpha-aminoadipyl)cysteinylylvaline and its role in penicillin biosynthesis. *Biochem J* **157**, 651-660.

Felenbok, B. (1991). The ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*: the alcA-alcR system as a tool for the expression of recombinant proteins. *J Biotechnol* **17**, 11-17.

Fernandez-Canon, J. M. & Penalva, M. A. (1995). Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **246**, 110-118.

Fischer, M., Romisch, W., Saller, S., Illarionov, B., Richter, G., Rohdich, F., Eisenreich, W. & Bacher, A. (2004). Evolution of vitamin B2 biosynthesis: structural and functional similarity between pyrimidine deaminases of eubacterial and plant origin. *J Biol Chem* **279**, 36299-36308.

Fischer, M. & Bacher, A. (2005). Biosynthesis of flavocoenzymes. *Nat Prod Rep* **22**, 324-350.

Fisher, A. K., Freedman, B. G., Bevan, D. R. & Senger, R. S. (2014). A review of metabolic and enzymatic engineering strategies for designing and optimizing performance of microbial cell factories. *Comput Struct Biotechnol J* **11**, 91-99.

Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* **10**(3): 226–236.

Florey, H. (1949). Antibiotics. *Practitioner* **162**, 67-75.

Foor, F. & Brown, G. M. (1975). Purification and properties of guanosine triphosphate cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **250**, 3545-3551.

Foor, F. & Brown, G. M. (1980). GTP cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **66**, 303-307.

Freitag, J., Ast, J. & Bolker, M. (2012). Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature* **485**, 522-525.

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C. & other authors (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105-1115.

Gao, J., Liao, J. & Yang, G. Y. (2009). CAAX-box protein, prenylation process and carcinogenesis. *Am J Transl Res* **1**, 312-325.

Garcia-Estrada, C., Vaca, I., Fierro, F., Sjollem, K., Veenhuis, M. & Martin, J. F. (2008). The unprocessed preprotein form IATC103S of the isopenicillin N acyltransferase is transported inside peroxisomes and regulates its self-processing. *Fungal Genet Biol* **45**, 1043-1052.

Garcia-Ramirez, J. J., Santos, M. A. & Revuelta, J. L. (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* RIB4 gene codes for 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase involved in riboflavin biosynthesis. Molecular characterization of the gene and purification of the encoded protein. *J Biol Chem* **270**, 23801-23807.

Gatenbeck, S. & Brunsberg, U. (1968). Biosynthesis of penicillins. I. Isolation of a 6-aminopenicillanic acid acyltransferase from *Penicillium chrysogenum*. *Acta Chem Scand* **22**, 1059-1061.

Gerhardt, S., Haase, I., Steinbacher, S., Kaiser, J. T., Cushman, M., Bacher, A., Huber, R. & Fischer, M. (2002a). The structural basis of riboflavin binding to *Schizosaccharomyces pombe* 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *J Mol Biol* **318**, 1317-1329.

Gerhardt, S., Schott, A. K., Kairies, N. & other authors (2002b). Studies on the reaction mechanism of riboflavin synthase: X-ray crystal structure of a complex with 6-carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazine. *Structure* **10**, 1371-1381.

Ghozlan, H. A. (1994). Utilization of beet molasses for riboflavin production by *Mycobacterium phlei*. *J Basic Microbiol* **34**, 157-162.

Girzalsky, W., Platta, H. W. & Erdmann, R. (2009). Protein transport across the peroxisomal membrane. *Biol Chem* **390**, 745-751.

Glover, J. R., Andrews, D. W. & Rachubinski, R. A. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10541-10545.

Goel, A., Wortel, M. T., Molenaar, D. & Teusink, B. (2012). Metabolic shifts: a fitness perspective for microbial cell factories. *Biotechnol Lett* **34**, 2147-2160.

- Gomez-Pardo, E. & Penalva, M. A. (1990).** The upstream region of the IPNS gene determines expression during secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **89**, 109-115.
- Gould, S. J., Keller, G. A., Hosken, N., Wilkinson, J. & Subramani, S. (1989).** A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* **108**, 1657-1664.
- Haase, I., Grawert, T., Illarionov, B., Bacher, A. & Fischer, M. (2014).** Recent advances in riboflavin biosynthesis. *Methods Mol Biol* **1146**, 15-40.
- Hales, T. C. (2000).** Cannonballs and Honeycombs. *NOTICES OF THE AMS* **47**, 440-449.
- Hartl, F. U., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. (2011).** Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324-332.
- Harvey, R. A. & Plaut, G. W. (1966).** Riboflavin synthetase from yeast. Properties of complexes of the enzyme with lumazine derivatives and riboflavin. *J Biol Chem* **241**, 2120-2136.
- Harzer, G., Rokos, H., Otto, M. K., Bacher, A. & Ghisla, S. (1978).** Biosynthesis of riboflavin. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine 5'-phosphate is not a substrate for riboflavin synthase. *Biochim Biophys Acta* **540**, 48-54.
- Hasan, S., Platta, H. W. & Erdmann, R. (2013).** Import of proteins into the peroxisomal matrix. *Front Physiol* **4**, 261.
- Heap, J. T., Ehsaan, M., Cooksley, C. M., Ng, Y. K., Cartman, S. T., Winzer, K. & Minton, N. P. (2012).** Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker. *Nucleic Acids Res* **40**, e59.
- Heiland, I. & Erdmann, R. (2005).** Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J* **272**, 2362-2372.
- Hemberger, S., Pedrolli, D. B., Stolz, J., Vogl, C., Lehmann, M. & Mack, M. (2011).** RibM from *Streptomyces davawensis* is a riboflavin/roseoflavin transporter and may be useful for the optimization of riboflavin production strains. *BMC Biotechnol* **11**, 119.
- Henry, C. S., DeJongh, M., Best, A. A., Frybarger, P. M., Lindsay, B. & Stevens, R. L. (2010).** High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models. *Nat Biotechnol* **28**, 977-982.
- Herr, A. (2011).** Diplomarbeit: Untersuchung einer neuen Rolle von Peroxisomen in der Entstehung von Mikrotubuli und MTOCs. KIT, IAB
- Herr, A. & Fischer, R. (2014).** Improvement of *Aspergillus nidulans* penicillin production by targeting AcvA to peroxisomes. *Metab Eng* **25**, 131-139.
- Hicke, L. & Riezman, H. (1996).** Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* **84**, 277-287.
- Hickey, R. J. (1945).** The inactivation of iron by 2,2'-bipyridine and its effect on riboflavin synthesis by *Clostridium acetobutylicum*. *Arch Biochem* **8**, 439-447.
- Hill, T. W. & Käfer, E. (2001).** Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *FungalGenetNewslett* **48**, 20-21.

Hoffmeister, D. & Keller, N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat Prod Rep* **24**, 393-416.

Huffer, S., Clark, M. E., Ning, J. C., Blanch, H. W. & Clark, D. S. (2011). Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. *Appl Environ Microbiol* **77**, 6400-6408.

Hümbelin, M., Griesser, V., Keller, T. & other authors (1999). GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase are rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production. *J Ind Microbiol Biot* **22**.

Iatsishin, V., Fedorovich, D. V. & Sibirnyi, A. A. (2009). [The microbial synthesis of flavin nucleotides: a review]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **45**, 133-142.

Islinger, M., Cardoso, M. J. & Schrader, M. (2010). Be different--the diversity of peroxisomes in the animal kingdom. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 881-897.

Ivanova, C., Baath, J. A., Seiboth, B. & Kubicek, C. P. (2013). Systems analysis of lactose metabolism in *Trichoderma reesei* identifies a lactose permease that is essential for cellulase induction. *PLoS One* **8**, e62631.

Jarboe, L. R., Royce, L. A. & Liu, P. (2013). Understanding biocatalyst inhibition by carboxylic acids. *Front Microbiol* **4**, 272.

Jeong, B. Y., Wittmann, C., Kato, T. & Park, E. Y. (2015). Comparative metabolic flux analysis of an *Ashbya gossypii* wild type strain and a high riboflavin-producing mutant strain. *J Biosci Bioeng* **119**, 101-106.

Kalingan, A. E. & Liao, C. M. (2002). Influence of type and concentration of flavinogenic factors on production of riboflavin by *Eremothecium ashbyii* NRRL 1363. *Bioresour Technol* **82**, 219-224.

Kaminskyj, S. G. & Hamer, J. E. (1998). hyp loci control cell pattern formation in the vegetative mycelium of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **148**, 669-680.

Kato, N., Brooks, W. & Calvo, A. M. (2003). The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell* **2**, 1178-1186.

Kato, T. & Park, E. Y. (2012). Riboflavin production by *Ashbya gossypii*. *Biotechnol Lett* **34**, 611-618.

Keller, N. P., Turner, G. & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* **3**, 937-947.

Kerfeld, C. A., Heinhorst, S. & Cannon, G. C. (2010). Bacterial microcompartments. *Annu Rev Microbiol* **64**, 391-408.

Kiel, J. A., van der Klei, I. J., van den Berg, M. A., Bovenberg, R. A. & Veenhuis, M. (2005). Overproduction of a single protein, Pc-Pex11p, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet Biol* **42**, 154-164.

Kis, K. & Bacher, A. (1995). Substrate channeling in the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **270**, 16788-16795.

Kis, K., Volk, R. & Bacher, A. (1995). Biosynthesis of riboflavin. Studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Biochemistry* **34**, 2883-2892.

Kleinkauf, H. & Von Dohren, H. (1996). A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur J Biochem* **236**, 335-351.

Koch, M., Breithaupt, C., GerhardtHaase, S., Weber, S., Cushman, M., Huber, R., Bacher, A. & Fischer, M. (2004). Structural basis of charge transfer complex formation by riboflavin bound to 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Eur J Biochem* **271**, 3208-3214.

Kolasa, M., Ahring, B. K., Lubeck, P. S. & Lubeck, M. (2014). Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. *Bioresour Technol* **169**, 143-148.

Konomi, T., Herchen, S., Baldwin, J. E., Yoshida, M., Hunt, N. A. & Demain, A. L. (1979). Cell-free conversion of delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine into an antibiotic with the properties of isopenicillin N in *Cephalosporium acremonium*. *Biochem J* **184**, 427-430.

Kopke, K., Hoff, B., Bloemendal, S., Katschorowski, A., Kamerewerd, J. & Kuck, U. (2013). Members of the *Penicillium chrysogenum* velvet complex play functionally opposing roles in the regulation of penicillin biosynthesis and conidiation. *Eukaryot Cell* **12**, 299-310.

Kosalkova, K., Marcos, A. T., Fierro, F., Hernando-Rico, V., Gutierrez, S. & Martin, J. F. (2000). A novel heptameric sequence (TTAGTAA) is the binding site for a protein required for high level expression of *pcbAB*, the first gene of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J Biol Chem* **275**, 2423-2430.

Kück U., R. J., Nowrousian M. , Hoff B., Engh I. (2009). Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung: Springer Verlag.

Ladenstein, R., Schneider, M., Huber, R., Bartunik, H. D., Wilson, K., Schott, K. & Bacher, A. (1988). Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Crystal structure analysis of the icosahedral beta 60 capsid at 3.3 Å resolution. *J Mol Biol* **203**, 1045-1070.

Ladenstein, R., Ritsert, K., Huber, R., Richter, G. & Bacher, A. (1994). The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. X-ray structure analysis of hollow reconstituted beta-subunit capsids. *Eur J Biochem* **223**, 1007-1017.

Ladenstein, R., Fischer, M. & Bacher, A. (2013). The lumazine synthase/riboflavin synthase complex: shapes and functions of a highly variable enzyme system. *FEBS J* **280**, 2537-2563.

Le Trong, I. & Stenkamp, R. E. (2008). Alternative models for two crystal structures of *Candida albicans* 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Acta Crystallogr D* **64**, 219-220.

Leathers, T. D. (2003). Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 468-473.

Ledesma-Amaro, R., Kerkhoven, E. J., Revuelta, J. L. & Nielsen, J. (2014). Genome scale metabolic modeling of the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Biotechnol Bioeng* **111**, 1191-1199.

Li, G. W., Burkhardt, D., Gross, C. & Weissman, J. S. (2014). Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell* **157**, 624-635.

Lim, S. H., Choi Jong, S. S. & Park, E. Y. (2001). Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famate*: An overview. *Biotechnol Bioprocess Eng* **6**: 75-88.

Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T. & Penttilä, M. E. (2005). Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 877-896.

Lingwood, D. & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50.

Litzka, O., Bergh, K. T. & Brakhage, A. A. (1995). Analysis of the regulation of the *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis gene *aat* (*penDE*), which encodes acyl coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase. *Mol Gen Genet* **249**, 557-569.

Litzka, O., Then Bergh, K., Van den Brulle, J., Steidl, S. & Brakhage, A. A. (1999). Transcriptional control of expression of fungal beta-lactam biosynthesis genes. *A Van Leeuw J Microb* **75**, 95-105.

Lo, H.-C. (2008). Secondary metabolites of *Aspergillus nidulans*. In *School of Pharmacy*. Los Angeles: University of Southern California.

Luengo, J. M., Iriso, J. L. & Lopez-Nieto, M. J. (1986). Direct evaluation of phenylacetyl-CoA: 6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *Penicillium chrysogenum* by bioassay. *J Antibiot (Tokyo)* **39**, 1565-1573.

Lv, Z., Sun, J. & Liu, Y. (2013). Structural and functional insights into *Saccharomyces cerevisiae* riboflavin biosynthesis reductase RIB7. *PLoS One* **8**, e61249.

MacLaren, J. (1952). The effects of certain purines and pyrimidines upon the production of riboflavin by *Eremothecium ashbyii*. *J Bacteriol* **63**, 233-241.

Manstein, D. J. & Pai, E. F. (1986). Purification and characterization of FAD synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *J Biol Chem* **261**, 16169-16173.

Martin, M. F. & Liras, P. (1989). Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* **43**, 173-206.

Marx, H., Mattanovich, D. & Sauer, M. (2008). Overexpression of the riboflavin biosynthetic pathway in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **7**, 23.

Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M. & Porro, D. (2012). Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol Biol* **824**, 329-358.

McAnulty, M. J. & Wood, T. K. (2014). YeeO from *Escherichia coli* exports flavins. *Bioengineered* **5**, 386-392.

McNew, J. A. & Goodman, J. M. (1994). An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J Cell Biol* **127**, 1245-1257.

Meade RE, P. H., Rodgers NE (1947). US Patent 2,433,680.

Meijer, W. H., Gidijala, L., Fekken, S., Kiel, J. A., van den Berg, M. A., Lascaris, R., Bovenberg, R. A. & van der Klei, I. J. (2010). Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5702-5709.

Meining, W., Mortl, S., Fischer, M., Cushman, M., Bacher, A. & Ladenstein, R. (2000). The atomic structure of pentameric lumazine synthase from *Saccharomyces cerevisiae* at 1.85 Å resolution reveals the binding mode of a phosphonate intermediate analogue. *J Mol Biol* **299**, 181-197.

Meyer, V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi--progress, obstacles and future trends. *Biotechnol Adv* **26**, 177-185.

Meyer, V., Wanka, F., van Gent, J., Arentshorst, M., van den Hondel, C. A. & Ram, A. F. (2011). Fungal gene expression on demand: an inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* **77**, 2975-2983.

Milne, C. B., Kim, P. J., Eddy, J. A. & Price, N. D. (2009). Accomplishments in genome-scale in silico modeling for industrial and medical biotechnology. *Biotechnol J* **4**, 1653-1670.

Miyata, N. & Fujiki, Y. (2005). Shuttling mechanism of peroxisome targeting signal type 1 receptor Pex5: ATP-independent import and ATP-dependent export. *Mol cell biol* **25**, 10822-10832.

Morris, V. K. & Sunde, M. (2013). Formation of amphipathic amyloid monolayers from fungal hydrophobin proteins. *Methods Mol Biol* **996**, 119-129.

Mortl, S., Fischer, M., Richter, G., Tack, J., Weinkauf, S. & Bacher, A. (1996). Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**, 33201-33207.

Muller, W. H., Bovenberg, R. A., Groothuis, M. H., Kattevilder, F., Smaal, E. B., Van der Voort, L. H. & Verkleij, A. J. (1992). Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1116**, 210-213.

Na, D., Yoo, S. M., Chung, H., Park, H., Park, J. H. & Lee, S. Y. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. *Nat Biotechnol* **31**, 170-174.

Nakagawa, S., Igarashi, A., Ohta, T., Hagihara, T., Fujio, T. & Aisaka, K. (1995). Nucleotide sequence of the FAD synthetase gene from *Corynebacterium ammoniagenes* and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**, 694-702.

Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557-1566.

Neubauer, O., Alfandega, A., Schoknecht, J., Sternberg, U., Pohlmann, A. & Eitinger, T. (2009). Two essential arginine residues in the T components of energy-coupling factor transporters. *J Bacteriol* **191**, 6482-6488.

Neuberger, G. & Bacher, A. (1986). Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *Biochem Biophys Res Commun* **139**, 1111-1116.

Nicolay, K., Veenhuis, M., Douma, A. C. & Harder, W. (1987). A ³¹P NMR study of the internal pH of yeast peroxisomes. *Arch Microbiol* **147**, 37-41.

Niederhoff, K., Meindl-Beinker, N. M., Kerssen, D., Perband, U., Schafer, A., Schliebs, W. & Kunau, W. H. (2005). Yeast Pex14p possesses two functionally distinct Pex5p and one Pex7p binding sites. *J Biol Chem* **280**, 35571-35578.

Nielsen, P. & Bacher, A. (1981). Biosynthesis of riboflavin. Characterization of the product of the deaminase. *Biochim Biophys Acta* **662**, 312-317.

Nutzmann, H. W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K. & other authors (2011). Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14282-14287.

Nutzmann, H. W., Fischer, J., Scherlach, K., Hertweck, C. & Brakhage, A. A. (2013). Distinct amino acids of histone H3 control secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol* **79**, 6102-6109.

O'Sullivan, J., Bleaney, R. C., Huddleston, J. A. & Abraham, E. P. (1979). Incorporation of 3H from delta-(L-alpha-amino (4,5-3H)adipyl)-L-cysteinyl-D-(4,4-3H)valine into isopenicillin N. *Biochem J* **184**, 421-426.

Olczyk, C. (1978). n-alkanes as a substratum for riboflavin production. I. Investigations of the dynamics of the flavinogenesis in chosen yeasts of the genus candida. *Pol J Pharmacol Pharm* **30**, 83-88.

Olempska-Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D. & DiNovi, M. J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms--a review. *Regul Toxicol Pharmacol* **45**, 144-158.

Osterlehner, A., Simmeth, S. & Gopfert, U. (2011). Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant Chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnol Bioeng* **108**, 2670-2681.

Otero, J. M., Cimini, D., Patil, K. R., Poulsen, S. G., Olsson, L. & Nielsen, J. (2013). Industrial systems biology of *Saccharomyces cerevisiae* enables novel succinic acid cell factory. *PLoS One* **8**, e54144.

Ottenheim, C., Verdejo, C., Zimmermann, W. & Wu, J. C. (2014). Hemicellulase production by *Aspergillus niger* DSM 26641 in hydrothermal palm oil empty fruit bunch hydrolysate and transcriptome analysis. *J Biosci Bioeng* **118**, 696-701.

Ozcengiz, G. & Demain, A. L. (2013). Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. *Biotechnol Adv* **31**, 287-311.

Park, E. Y., Ito, Y., Nariyama, M., Sugimoto, T., Lies, D. & Kato, T. (2011). The improvement of riboflavin production in *Ashbya gossypii* via disparity mutagenesis and DNA microarray analysis. *Appl Microbiol Biot* **91**, 1315-1326.

Park, J. T. & Strominger, J. L. (1957). Mode of action of penicillin. *Science* **125**, 99-101.

Perez-Esteban, B., Orejas, M., Gomez-Pardo, E. & Penalva, M. A. (1993). Molecular characterization of a fungal secondary metabolism promoter: transcription of the *Aspergillus nidulans* isopenicillin N synthetase gene is modulated by upstream negative elements. *Mol Microbiol* **9**, 881-895.

Perkins, J. B., J. G. Pero, and A. Sloma (1991). Riboflavin overproducing strains of bacteria. In *European patent application*.

- Perlman (1979).** Microbial Process for riboflavin production. *Microbial technology* **1**, 521-527.
- Perry, D., Abraham, E. P. & Baldwin, J. E. (1988).** Factors affecting the isopenicillin N synthetase reaction. *Biochem J* **255**, 345-351.
- Persson, K., Schneider, G., Jordan, D. B., Viitanen, P. V. & Sandalova, T. (1999).** Crystal structure analysis of a pentameric fungal and an icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis for differences in assembly. *Protein Sci* **8**, 2355-2365.
- Pfleger, B. F., Pitera, D. J., Smolke, C. D. & Keasling, J. D. (2006).** Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. *Nat Biotechnol* **24**, 1027-1032.
- Pires, J. R., Hong, X., Brockmann, C., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., Oschkinat, H. & Erdmann, R. (2003).** The ScPex13p SH3 domain exposes two distinct binding sites for Pex5p and Pex14p. *J Mol Biol* **326**, 1427-1435.
- Platta, H. W., Grunau, S., Rosenkranz, K., Girzalsky, W. & Erdmann, R. (2005).** Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat Cell Biol* **7**, 817-822.
- Platta, H. W. & Erdmann, R. (2007).** Peroxisomal dynamics. *Trends Cell Biol* **17**, 474-484.
- Platta, H. W., El Magraoui, F., Baumer, B. E., Schlee, D., Girzalsky, W. & Erdmann, R. (2009).** Pex2 and pex12 function as protein-ubiquitin ligases in peroxisomal protein import. *Molecular and cellular biology* **29**, 5505-5516.
- Plaut, G. W. (1960).** Studies on the stoichiometry of the enzymic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J Biol Chem* **235**, PC41-42.
- Plaut, G. W. (1963).** Studies on the nature of the enzymic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J Biol Chem* **238**, 2225-2243.
- Plaut, G. W., Beach, R. L. & Aogaichi, T. (1970).** Studies on the mechanism of elimination of protons from the methyl groups of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by riboflavin synthetase. *Biochemistry* **9**, 771-785.
- Poirier, Y., Antonenkov, V. D., Glumoff, T. & Hiltunen, J. K. (2006).** Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 1413-1426.
- Polizeli, M. L., Rizzatti, A. C., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. & Amorim, D. S. (2005).** Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 577-591.
- Pruess, D. L. & Johnson, M. J. (1967).** Penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum*. *J Bacteriol* **94**, 1502-1508.
- Rajendran, L. & Simons, K. (2005).** Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* **118**, 1099-1102.
- Rawat, H. K., Ganaie, M. A. & Kango, N. (2015).** Production of inulinase, fructosyltransferase and sucrase from fungi on low-value inulin-rich substrates and their use in generation of fructose and fructo-oligosaccharides. *A Van Leeuw J Microb.*
- Ritsert, K., Huber, R., Turk, D., Ladenstein, R., Schmidt-Base, K. & Bacher, A. (1995).** Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*: crystal structure analysis of

reconstituted, icosahedral beta-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* **253**, 151-167.

Roach, P. L., Clifton, I. J., Hensgens, C. M., Shibata, N., Schofield, C. J., Hajdu, J. & Baldwin, J. E. (1997). Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. *Nature* **387**, 827-830.

Rodionov, D. A., Hebbeln, P., Eudes, A. & other authors (2009). A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. *J Bacteriol* **191**, 42-51.

Rothberg, K. G., Ying, Y. S., Kamen, B. A. & Anderson, R. G. (1990). Cholesterol controls the clustering of the glycospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J Cell Biol* **111**, 2931-2938.

Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**, 725-738.

Roy, A., Yang, J. & Zhang, Y. (2012). COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Res* **40**, W471-477.

Royce, L. A., Liu, P., Stebbins, M. J., Hanson, B. C. & Jarboe, L. R. (2013). The damaging effects of short chain fatty acids on *Escherichia coli* membranes. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 8317-8327.

Roze, L. V., Chanda, A. & Linz, J. E. (2011). Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genet Biol* **48**, 35-48.

Sabry, S. A., Ghanem, K. M. & Ghazlan, H. A. (1993). Riboflavin production by *Aspergillus terreus* from beet-molasses. *Microbiologica* **9**, 118-124.

Sagt, C. M., ten Haaf, P. J., Minneboo, I. M. & other authors (2009). Peroxycytion: a novel secretion pathway in the eukaryotic cell. *BMC Biotechnol* **9**, 48.

Sahm, H., Antranikian, G., Stahmann, K.-P. & Takors, R. (2012). Industrielle Mikrobiologie: Springer Verlag.

Salis, H. M., Mirsky, E. A. & Voigt, C. A. (2009). Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nat Biotechnol* **27**, 946-950.

Sambrook, J. & Russel, D. W. (1999). Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Samson, S. M., Belagaje, R., Blankenship, D. T. & other authors (1985). Isolation, sequence determination and expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium*. *Nature* **318**, 191-194.

Sandeman, R. A., Hynes, M. J., Fincham, J. R. & Connerton, I. F. (1991). Molecular organisation of the malate synthase genes of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* **228**, 445-452.

Santos, M. A., Garcia-Ramirez, J. J. & Revuelta, J. L. (1995). Riboflavin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, characterization, and expression of the *RIB5* gene encoding riboflavin synthase. *J Biol Chem* **270**, 437-444.

- Santos, M. A., Jimenez, A. & Revuelta, J. L. (2000).** Molecular characterization of FMN1, the structural gene for the monofunctional flavokinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 28618-28624.
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Hohmann, H. P., Manneberg, M., van Loon, A. P. & Bailey, J. E. (1996).** Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3687-3696.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A. & Charlier, P. (2008).** The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 234-258.
- Scheckhuber, C. Q., Veenhuis, M. & van der Klei, I. J. (2013).** Improving penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* by glyoxalase overproduction. *Metab Eng* **18**, 36-43.
- Schell-Steven, A., Stein, K., Amoros, M., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R., Rottensteiner, H. & Erdmann, R. (2005).** Identification of a novel, intraperoxisomal pex14-binding site in pex13: association of pex13 with the docking complex is essential for peroxisomal matrix protein import. *Mol cell biol* **25**, 3007-3018.
- Schier, N., Liese, R. & Fischer, R. (2001).** A Pcl-like cyclin of *Aspergillus nidulans* is transcriptionally activated by developmental regulators and is involved in sporulation. *Molecular and cellular biology* **21**, 4075-4088.
- Schiestl, R. H. & Gietz, R. D. (1989).** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**, 339-346.
- Schlosser, T., Wiesenburg, A., Gatgens, C., Funke, A., Viets, U., Vijayalakshmi, S., Nieland, S. & Stahmann, K. P. (2007).** Growth stress triggers riboflavin overproduction in *Ashbya gossypii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 569-578.
- Schrader, M. & Fahimi, H. D. (2008).** The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol* **129**, 421-440.
- Schrödinger, L. (2010).** The AxPyMOL Molecular Graphics Plugin for Microsoft PowerPoint, Version 1.1.
- Schuck, S. & Simons, K. (2004).** Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* **117**, 5955-5964.
- Simons, K. & Toomre, D. (2000).** Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39.
- Singh, M., Kumar, P., Yadav, S., Gautam, R., Sharma, N. & Karthikeyan, S. (2013).** The crystal structure reveals the molecular mechanism of bifunctional 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II (Rv1415) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**, 1633-1644.
- Singh, M. V. & Weil, P. A. (2002).** A method for plasmid purification directly from yeast. *Anal Biochem* **307**, 13-17.
- Smith, C. G., G. A. Smith, and Z. Papadoupoulou (1961).** Effect of surface active agents on the biosynthesis of riboflavin by *Ashbya gossypii*. *Biochem Biophys Acta* **47**: 344-349.

Spencer, B. & Maung, C. (1970). Multiple activities of penicillin acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. *Biochem J* **118**, 29P-30P.

Sprote, P., Brakhage, A. A. & Hynes, M. J. (2009). Contribution of peroxisomes to penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **8**, 421-423.

St-Pierre, F., Cui, L., Priest, D. G., Endy, D., Dodd, I. B. & Shearwin, K. E. (2013). One-step cloning and chromosomal integration of DNA. *ACS Synth Biol* **2**, 537-541.

Stahmann, K. P., Revuelta, J. L. & Seulberger, H. (2000). Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 509-516.

Stehlik, T., Sandrock, B., Ast, J. & Freitag, J. (2014). Fungal peroxisomes as biosynthetic organelles. *Curr Opin Microbiol* **22C**, 8-14.

Steinberg, G. & Schuster, M. (2011). The dynamic fungal cell. *fungal biology reviews* **25**, 14-37.

Stepanov, A. I., Beburow, M. Y. & Zhdanov, V. G. (1974). Mutants of *Eremothecium ashbyii* resistant to 8-azaguanine. Communication I. Isolation of mutants and study of the level of riboflavin biosynthesis. *Sov Genet* **8**, 729-733.

Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bodnar, A. G., Rachubinski, R. A. & Subramani, S. (1991). A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J* **10**, 3255-3262.

Szczesniak, T., Karabin, L., Szczepankowska, M. & Wituch, K. (1971a). Biosynthesis of riboflavin by *Ashbya gossypii*. I. The influence of fats of the animal origin on the riboflavin production. *Acta Microbiol Pol B* **3**, 29-34.

Szczesniak, T., Karabin, L., Szczepanowska, M. & Wituch, K. (1971b). Biosynthesis of riboflavin by *Ashbya gossypii*. II. The influence of animal proteins on the riboflavin biosynthesis. *Acta Microbiol Pol B* **3**, 91-95.

Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* **1**, 3111-3120.

Takehita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S. & Fischer, R. (2008). Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**, 339-351.

Takehita, N., Mania, D., Herrero, S., Ishitsuka, Y., Nienhaus, G. U., Podolski, M., Howard, J. & Fischer, R. (2013). The cell-end marker TeaA and the microtubule polymerase AlpA contribute to microtubule guidance at the hyphal tip cortex of *Aspergillus nidulans* to provide polarity maintenance. *J Cell Sci* **126**, 5400-5411.

ter Beek, J., Duurkens, R. H., Erkens, G. B. & Slotboom, D. J. (2011). Quaternary structure and functional unit of energy coupling factor (ECF)-type transporters. *J Biol Chem* **286**, 5471-5475.

ThomsonScientific (2007). Making Penicillin Possible: Norman Heatley Remembers.

Thykaer, J. & Nielsen, J. (2003). Metabolic engineering of beta-lactam production. *Metab Eng* **5**, 56-69.

Tipper, D. J. & Strominger, J. L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**, 1133-1141.

Todd, R. B., Davis, M. A. & Hynes, M. J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc* **2**, 811-821.

Tomas, C. A., Welker, N. E. & Papoutsakis, E. T. (2003). Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4951-4965.

Upshall, A., Gilbert, T., Saari, G., O'Hara, P. J., Weglenski, P., Berse, B., Miller, K. & Timberlake, W. E. (1986). Molecular analysis of the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Molecular & general genetics : MGG* **204**, 349-354.

van de Kamp, M., Driessen, A. J. & Konings, W. N. (1999). Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. *A Van Leeuw J Microb* **75**, 41-78.

Volk, R. & Bacher, A. (1990). Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. *J Biol Chem* **265**, 19479-19485.

Volk, R. & Bacher, A. (1991). Biosynthesis of riboflavin. Studies on the mechanism of L-3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *J Biol Chem* **266**, 20610-20618.

Volland, C., Urban-Grimal, D., Geraud, G. & Haguenaer-Tsapis, R. (1994). Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J Biol Chem* **269**, 9833-9841.

Wacker, H., Harvey, R. A., Winestock, C. H. & Plaut, G. W. (1964). 4-(1'-D-Ribitylamino)-5-Amino-2,6-Dihydropyrimidine, the second product of the riboflavin synthetase reaction. *J Biol Chem* **239**, 3493-3497.

Walton, P. A., Hill, P. E. & Subramani, S. (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol Biol Cell* **6**, 675-683.

Wang, J. F., Xiong, Z. Q., Li, S. Y. & Wang, Y. (2013). Enhancing isoprenoid production through systematically assembling and modulating efflux pumps in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 8057-8067.

Weber, S. S., Polli, F., Boer, R., Bovenberg, R. A. & Driessen, A. J. (2012). Increased penicillin production in *Penicillium chrysogenum* production strains via balanced overexpression of isopenicillin N acyltransferase. *Appl Environ Microbiol* **78**, 7107-7113.

White, R. L., John, E. M., Baldwin, J. E. & Abraham, E. P. (1982). Stoichiometry of oxygen consumption in the biosynthesis of isopenicillin from a tripeptide. *Biochem J* **203**, 791-793.

Williams, C., van den Berg, M., Sprenger, R. R. & Distel, B. (2007). A conserved cysteine is essential for Pex4p-dependent ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *J Biol Chem* **282**, 22534-22543.

Williams, C., van den Berg, M., Geers, E. & Distel, B. (2008). Pex10p functions as an E3 ligase for the Ubc4p-dependent ubiquitination of Pex5p. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 620-624.

- Willke, T. & Vorlop, K. D. (2001).** Biotechnological production of itaconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 289-295.
- Wilson, A. C. & Pardee, A. B. (1962).** Regulation of flavin synthesis by *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **28**, 283-303.
- Wolf, J., Schliebs, W. & Erdmann, R. (2010).** Peroxisomes as dynamic organelles: peroxisomal matrix protein import. *FEBS J* **277**, 3268-3278.
- Wolkow, T. D., Harris, S. D. & Hamer, J. E. (1996).** Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis. *J Cell Sci* **109 (Pt 8)**, 2179-2188.
- Wu, M., Repetto, B., Glerum, D. M. & Tzagoloff, A. (1995).** Cloning and characterization of FAD1, the structural gene for flavin adenine dinucleotide synthetase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol cell biol* **15**, 264-271.
- Yamada, Y., Merrill, A. H., Jr. & McCormick, D. B. (1990).** Probable reaction mechanisms of flavokinase and FAD synthetase from rat liver. *Arch Biochem Biophys* **278**, 125-130.
- Yelton, M. M., Hamer, J. E. & Timberlake, W. E. (1984).** Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *P Natl Acad Sci USA* **81**, 1470-1474.
- You, C., Myung, S. & Zhang, Y. H. (2012).** Facilitated substrate channeling in a self-assembled trifunctional enzyme complex. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**, 8787-8790.
- Young, E. M., Comer, A. D., Huang, H. & Alper, H. S. (2012).** A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* **14**, 401-411.
- Zekert, N., Veith, D. & Fischer, R. (2010).** Interaction of the *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs. *Eukaryot Cell* **9**, 795-805.
- Zhang, P., Wang, J. & Shi, Y. (2010).** Structure and mechanism of the S component of a bacterial ECF transporter. *Nature* **468**, 717-720.
- Zhang, Y. & Skolnick, J. (2004).** Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins* **57**, 702-710.
- Zhang, Y. (2008).** I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40.
- Zhang, Y. H. (2014).** Production of biofuels and biochemicals by in vitro synthetic biosystems: Opportunities and challenges. *Biotechnol Adv.*

Publikationsliste

Kongresse:

- 09/13 XI International Fungal Biology Conference
Karlsruhe
- 03/13 27th Fungal Genetics Conference
Kalifornien, USA
- 03/12 European Conference on Fungal Genetics 2012
Marburg, Deutschland
- 04/11 VAAM Jahrestagung
Karlsruhe

Veröffentlichungen:

Erstautor:

Herr, A. & Fischer, R. (2014). Improvement of *Aspergillus nidulans* penicillin production by targeting AcvA to peroxisomes. *Metab Eng* **25**, 131-139.

Koautor:

Pruss, S., Fetzner, R., Seither, K., Herr, A., Pfeiffer, E., Metzler, M., Lawrence, C. B. & Fischer, R. (2014). Role of the *Alternaria alternata* blue-light receptor LreA (white-collar 1) in spore formation and secondary metabolism. *Appl Environ Microbiol* **80**, 2582-2591.

Fetzner, R., Seither, K., Wenderoth, M., Herr, A. & Fischer, R. (2014). *Alternaria alternata* transcription factor CmrA controls melanization and spore development. *Microbiology* **160**, 1845-1854.

Curriculum vitae Andreas Herr

andreas.herr@gmx.info

Geburtsdatum 18. April 1986
 Geburtsort Heilbronn, Deutschland
 Staatsangehörigkeit Deutsch



Berufserfahrung

- 11/11 - 04/15 **Projektassistent** am Karlsruher Institut für Technologie (KIT),
 Themenbereich der Doktorarbeit: Produktionssteigerung von
 Primär- und Sekundär-Metaboliten in *Aspergillus nidulans*.
 Durchgeführt im Forschungsverbund "Katalytische Nanokomplexe"
 (NANOKAT).
- Erfahrung im Bereich Projektmanagement, Design und Durchführung von Experimenten
 - Molekularbiologisches Arbeiten, Biochemisches Verständnis, Präsentation von wissenschaftlichen Daten auf internationalen Konferenzen;
 - Mehrere Publikationen in wissenschaftlichen Journalen
- 02/11 - 10/11 **Diplomarbeit** am Karlsruher Institut für Technologie
 Thema: Untersuchung einer neuen Rolle von Peroxisomen

Akademische Ausbildung

- 11/11 – 04/15 Promotion auf dem Gebiet **Biotechnologie** am Karlsruher Institut für Technologie, Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Mikrobiologie
 Abschluss: voraussichtliche Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften im April 2015
- 10/06 – 02/11 Diplomstudium der **Biologie** am Karlsruher Institut für Technologie
 Schwerpunkt: Mikrobiologie
 Nebenfächer: Genetik und Zoologie
 Abschluss: Diplom (mit Auszeichnung)

Schulbildung

07/96 – 04/05 Robert-Mayer-Gymnasium in Heilbronn, Deutschland
Abschluss: Abitur

Sonstige berufliche Aktivitäten

05/12 - 12/13 Fächer Residenz Karlsruhe; Hilfskraft Küche
07/08 - 10/08 Saar Hartmetall und Werkzeuge GmbH, Saarland, Deutschland
Herstellung von Schnittwerkzeugen
04/06 - 07/06 Agentur für Arbeit Heilbronn; EDV Tätigkeiten
07/05 - 03/06 Zivildienst am Gesundheitszentrum Bad Wimpfen
Aufgaben: Logistische Koordination und Organisation

Sprachkenntnisse

Deutsch Muttersprache
Englisch sehr gut in Wort und Schrift
Französisch Grundkenntnisse
Spanisch Grundkenntnisse (Hochschulkurs Stufe 1)

EDV-Kenntnisse

Windows, Mac OS X sehr gute Kenntnisse
MS Office, iWork sehr gute Kenntnisse
Bioinformatische Kenntnisse

Zusatzqualifikationen

10/13 - 06/14 Hochschulkurs BWL und Management an der Euro-FH, Hamburg
Abschlussnote: 1,6
05/09/13 GMP-Schulung

Führerschein Klasse B seit 04/04
Ersthelferausbildung und aktiver Ersthelfer am Inst. für Angew.
Biowissenschaften (IAB) am KIT

Lehrtätigkeit

11/11 – 12/14 Betreuung von Bachelor- und Diplomstudenten sowie Doktoranden
unterschiedlicher Nationalitäten; Leitung von Laborpraktika

Danksagung

In erster Linie will ich meinem Betreuer Prof. Dr. Reinhard Fischer danken für die Möglichkeit an diesem Projekt zu arbeiten, die vielen interessanten Diskussionen und die gute Betreuung. Wenn er mich nicht auf den Kongress nach Asilomar gelassen hätte, hätte ich meine Frau wahrscheinlich nie kennen gelernt. Dafür ein besonderes Dankeschön :)

Für weitere Denkanstöße und zusätzliche Expertisen danke ich Prof. Dr. Jörg Kämper, Prof. Dr. Natalia Requena und Prof. Dr. Matthias Mack. Dr. Oleksandra Fokina, Kristin Seither und Elke Wohlmann, sowie dem ganzen IAB danke ich für die nette Laboratmosphäre und gute Zusammenarbeit.

Frau Honig aus der Gruppe Metzler danke ich für ihre Expertise und die Hilfe bei der Nutzung der HPLC-Geräte. Anja Vetter half mir bei der Erstellung der dreidimensionalen Grafiken der Peroxisomen und der Hyphen.

Meinen Eltern will ich besonders danken, denn sie haben mir den langen Weg bis zu dieser Arbeit ermöglicht und mich immer unterstützt.

Meine Frau Christa schenkt mir immer wieder aufs Neue Energie und Lebensfreude. Etwas wertvolleres gibt es bei der Erstellung einer solchen Arbeit nicht!

Anhang

Die Produktion von FFR wurde in dieser Arbeit als Gesamtproduktion (Addition aus intrazellulärer und extrazellulärer Produktion) dargestellt. Die getrennten Ansichten sind hier aufgeführt.

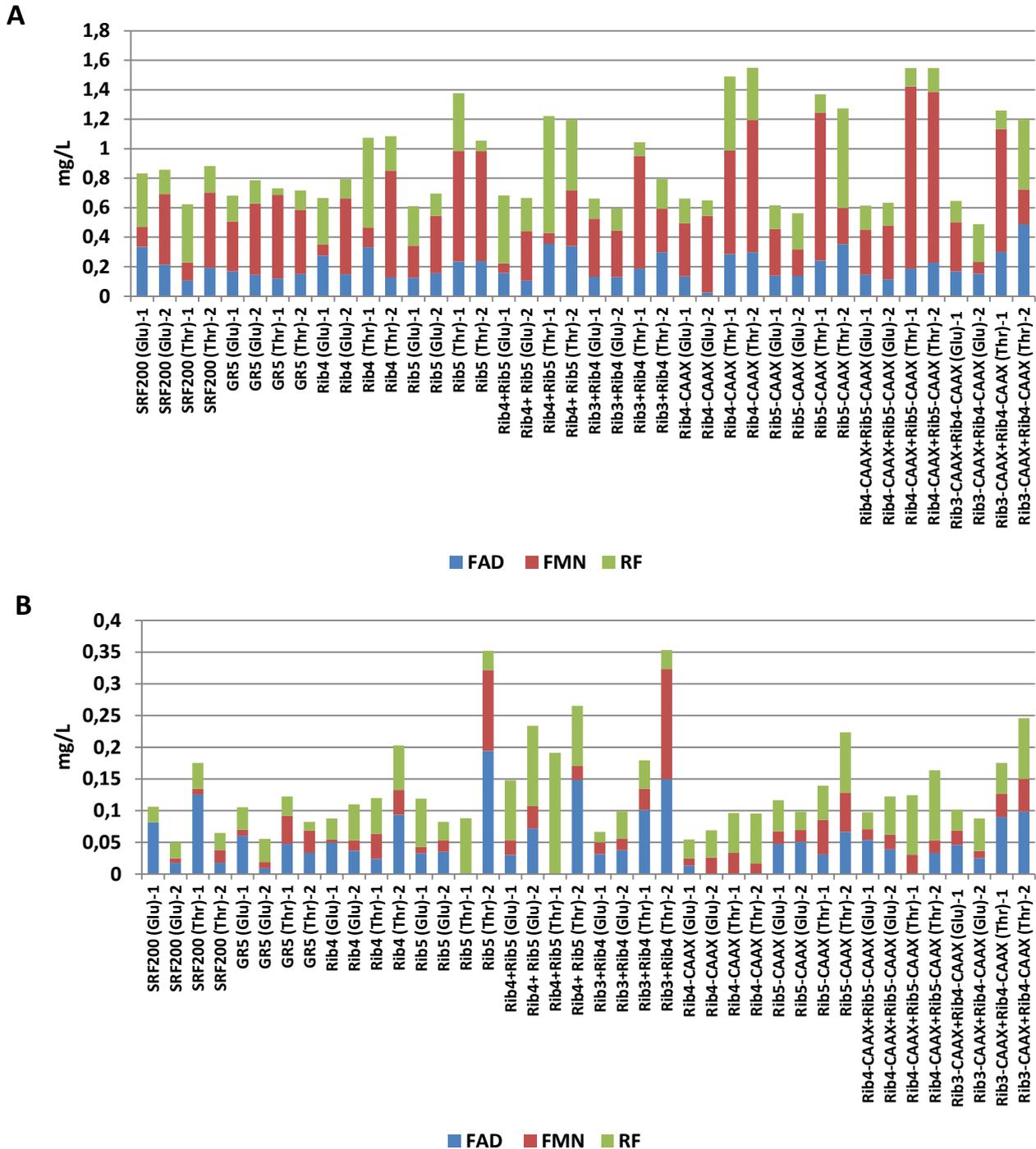


Abbildung 36: Darstellung der (A) intrazellulären und (B) extrazellulären Produktion von FFR. Diese wurde mittels HPLC ermittelt. Nach der Messung wurden die Flächen der Peaks in die jeweilige Standardkurve für FMN, FAD und Riboflavin eingesetzt und das Trockengewicht mit eingerechnet ($\mu\text{M/g}$ Trockengewicht). Durch die Berücksichtigung der molaren Masse konnte die Menge pro Liter in Abhängigkeit des Trockengewichtes des Myzels ermittelt werden (mg/L). Die Bezeichnung 1 und 2 stellt jeweils zwei biologische Replikate des Stammes dar. Jeder Balken stellt eine Addition der Konzentrationen von FMN, FAD und Riboflavin (FFR) dar. Gezeigt sind alle in Teil II verwendeten Stämme. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der X-Achse.