

Beschreibung neuer Enzymvarianten zur selektiven Oxidation
von Fettsäuren

Synthese von Prostaglandinen in Ganzzell-Biotransformationen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften

der Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Jan Christopher Guder

aus Göttingen

Frankfurt am Main

2014

(D 30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan/in: Prof. Dr. Meike Piepenbring

Gutachter: Prof. Dr. Jens Schrader

Prof. Dr. Eckard Boles

Datum der Disputation: 06.11.2014

Schriftenreihe des DECHEMA-Forschungsinstituts

Band 9

Jan Christopher Guder

**Beschreibung neuer Enzymvarianten zur selektiven
Oxidation von Fettsäuren**

Synthese von Prostaglandinen in Ganzzell-Biotransformationen

D30 (Diss. Universität Frankfurt am Main)

Shaker Verlag
Aachen 2015

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Frankfurt am Main, Univ., Diss., 2014

Copyright Shaker Verlag 2015

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-3630-5

ISSN 2197-6155

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

„Alles kommt in der Wissenschaft auf ein Gewährwerden dessen an, was den Erscheinungen zum Grunde liegt. Ein solches Gewährwerden ist bis ins Unendliche fruchtbar“

Johann Wolfgang von Goethe (1749 – 1832)

Publikationen

Guder JC, Buchhaupt M, Hannappel A, Huth I, Ferreirós N, Geisslinger G, Schrader J; „Biotechnological approach towards a highly efficient production of natural prostaglandins“; *Biotechnol Lett*; 2014; **36**; 11: 2193-2198

Vorträge

Guder JC; „Microbial oxidation of fatty acids“; 2. Stiftungstag des DECHEMA Forschungsinstituts; Frankfurt/Main; 2013

Posterbeiträge

Guder JC, Buchhaupt M, Schrader J; „Bioproduction of prostaglandins in recombinant *E. coli* cells“; 1st European conference on natural products; Frankfurt/Main; 2013

Guder JC, Buchhaupt M, Schrader J; „Bioproduction of prostaglandins in recombinant *E. coli* cells“; *Molecular Life Sciences*; Frankfurt/Main; 2013

Guder JC, Buchhaupt M, Schrader J; „Engineering yeast for the selective oxidation of fatty acids to produce valuable flavor and pharmaceutical compounds“; *Yeast Genetics & Molecular Biology Meeting*; Princeton, NY, USA; 2012

Guder JC, Buchhaupt M, Schrader J; „Yeast as a whole cell biocatalyst for the selective oxidation of fatty acids“; *DECHEMA VAAM Section Biotransformations*; Frankfurt/Main; 2012

Guder JC, Buchhaupt M, Schrader J; „Yeast as a whole cell biocatalyst for the selective oxidation of fatty acids“; *DECHEMA summer school Biotransformations 2011*; Bad Herrenalb; 2011

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Jens Schrader als meinem Doktorvater für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, das entgegengebrachte Vertrauen und die stetige Diskussionsbereitschaft zum Fortgang der Arbeit.

Ein besonderer Dank in diesem Zusammenhang gilt außerdem Dr. Markus Buchhaupt und Dr. Achim Hannappel für Stunden inspirierender Diskussionen und die ständige Hilfsbereitschaft.

Bei meinen Bürokollegen und allen Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die große Hilfsbereitschaft. In- und außerhalb des Instituts haben wir viele schöne Stunden erlebt; in schwierigen Situationen habe ich vielfältige Unterstützung erfahren. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Wilfried Schwab und Dr. Anja Preuss für die gute Zusammenarbeit. Für die bereitwillige Hilfe bei Fragen zur HPLC-Analytik danke ich besonders Ina Huth. Außerdem danke ich ihr und Karin Lintz für die Unterstützung bei der Probenaufarbeitung während zahlreicher Biotransformationsexperimente.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Nerea Ferreirós Bouzas vom Pharmazentrum Frankfurt/ZAFES für ihre unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der LC-MS-Analysen.

Für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen des Praktikums bedanke ich mich bei Christian Sachs und Paulina Jordan.

Ein herzliches Dankeschön gilt Bernhard Gödelmann und den Mitarbeitern der DECHEMA-Werkstatt für die schnelle Lösung und kreative Umsetzung technischer Fragen.

Den Korrekturlesern dieser Arbeit danke ich für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meiner Frau, ohne deren Unterstützung und Verständnis diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Oxylipine in verschiedenen Organismen	5
2.1.1 Oxylipinbiosynthese in Pflanzen	6
2.1.2 Oxylipinbiosynthese in tierischen Organismen	9
2.2 α -Dioxygenasen – Struktur, enzymatische Katalyse und kommerzielle Bedeutung der Reaktionsprodukte	11
2.2.1 Struktur und enzymatische Katalyse	12
2.2.2 Kommerzielle Bedeutung der Reaktionsprodukte	14
2.3 Prostaglandin Endoperoxid H-Synthasen – Struktur und enzymatische Katalyse	15
2.4 Biologie der Prostaglandine	18
2.4.1 Prostaglandin H_2	20
2.4.2 Prostaglandin E_2 und Prostaglandin D_2	20
2.4.3 Prostaglandin $F_{2\alpha}$	21
2.4.4 Prostaglandin I_2 und Thromboxan A_2	22
2.4.5 Weitere Prostaglandine	23
2.5 Prostaglandine in der klinischen Anwendung	23
2.6 Synthese von Prostaglandinen – Chemie vs. Biotechnologie	26
3. AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	28
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	29
4.1 Prostaglandin Endoperoxid H-Synthase aus <i>Gracilaria vermiculophylla</i>	29
4.1.1 Bioinformatische Identifizierung und Charakterisierung von PGHS	29
4.1.1.1 Datenbank- und Sequenzanalysen	29

4.1.1.2 Primär- und Sekundärstrukturanalysen von gvPGHS und neProt.....	32
4.1.2 Biochemische Charakterisierung von gvPGHS	39
4.1.2.1 Optimierung der Expression von gvPGHS in <i>E. coli</i>	39
4.1.2.2 Affinitätschromatographische Reinigung der gvPGHS	41
4.1.2.3 Analyse des Substratspektrums	43
4.1.2.4 Inhibitor-Screening.....	44
4.1.3 Biotransformationen zur Produktion von Prostaglandinen.....	46
4.1.3.1 Expression verschiedener PGHS in <i>S. cerevisiae</i> und <i>E. coli</i>	46
4.1.3.2 <i>in vitro</i> Synthese von Prostaglandinen	54
4.1.3.3 Ganzzellbiotransformation von Arachidonsäure zu Prostaglandinen mit gvPGHS exprimierenden <i>E. coli</i> Zellen	57
4.1.4 Zusammenfassung und Diskussion	62
4.1.4.1 Bioinformatische Identifizierung und Charakterisierung von PGHS	62
4.1.4.2 Biochemische Charakterisierung von gvPGHS.....	66
4.1.4.3 Biotransformationen zur Produktion von Prostaglandinen	69
4.2 Putative bakterielle Fettsäure-Oxygenasen mit Ähnlichkeiten zu α-DOX... 76	
4.2.1 Bioinformatische Identifizierung und Charakterisierung putativer bakterieller Fettsäure-Oxygenasen.....	76
4.2.1.1 Datenbank- und Sequenzanalysen.....	76
4.2.1.2 Primär- und Sekundärstrukturanalysen von cyProt und ccProt.....	77
4.2.2 Funktionsanalyse der putativen bakteriellen Fettsäure-Oxygenase cyProt aus <i>Cyanothece sp.</i>	84
4.2.2.1 Expression von cyProt in <i>E. coli</i>	84
4.2.2.2 Analyse des Substratspektrums von cyProt.....	86
4.2.3 Zusammenfassung und Diskussion	90
4.2.3.1 Bioinformatische Identifizierung und Charakterisierung putativer bakterieller Fettsäure-Oxygenasen	90
4.2.3.2 Funktionsanalyse der putativen bakteriellen Fettsäure-Oxygenase cyProt aus <i>Cyanothece sp.</i>	91

4.3 Untersuchung und Etablierung analytischer Nachweismethoden zur Charakterisierung fettsäureoxidierender Enzyme.....	95
4.3.1 Luminol-Chemilumineszenz	96
4.3.1.1 Etablierung des Luminol-Chemilumineszenznachweises	96
4.3.1.2 Sekundäre Effekte im Luminol-Chemilumineszenznachweis.....	98
4.3.2 Sauerstoffverbrauchsnachweis.....	102
4.3.3 Zusammenfassung und Diskussion	105
5. MATERIAL UND METHODEN	109
5.1 Material	109
5.1.1 Chemikalien	109
5.1.2 Medien und Medienzusätze	109
5.1.3 Puffer und Lösungen.....	113
5.1.4 Mikroorganismen und Expressionsplasmide.....	116
5.1.5 Plasmide, Gene und Oligonukleotide.....	120
5.1.6 Geräte und Kits.....	124
5.1.7 EDV – Programme und Datenbanken.....	126
5.2 Molekularbiologische Methoden	127
5.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	127
5.2.2 Restriktion.....	128
5.2.3 Ligation.....	128
5.2.4 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	129
5.2.5 Transformation.....	129
5.2.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	130
5.2.7 DNA-Sequenzierung.....	131
5.3 Biochemische Methoden	131
5.3.1 Proteinexpression	131
5.3.2 Gewinnung zellfreier Proteinextrakte	132
5.3.3 Proteinisolierung von gvPGHS-GST	133

5.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	134
5.3.5 Rekonstitution isolierter Prostaglandin Endoperoxid H-Synthase	134
5.4 Biotransformationen	135
5.4.1 <i>in vitro</i> Biotransformation mit zellfreien Proteinextrakten	135
5.4.2 Ganzzellbiotransformation	135
5.5 Analytische Methoden	136
5.5.1 Luminol-Chemilumineszenz	136
5.5.2 Sauerstoffverbrauchsmessung.....	136
5.5.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	137
5.5.4 Lichtstreuendetektor (ELSD).....	138
5.6 Bioinformatische Methoden	139
5.6.1 BLASTP-Analysen	139
5.6.2 Erstellen von Sequenzalignments und Berechnung von Sekundärstrukturmodellen	139
6. LITERATURVERZEICHNIS	141
7. ANHANG	165
7.1 Ergebnis der BLASTP-Analyse der gvPGHS-Aminosäuresequenz	165
7.2 Ergebnis der BLASTP-Analyse der os α -DOX-Aminosäuresequenz.....	167
7.3 Luminol Chemilumineszenz	168
7.4 Gensequenzen	169
7.4.1 Artifizielle Gensequenz von cyProt aus <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142..	169
7.5 Fettsäuren - Nomenklatur und Struktur.....	170
LEBENS LAUF	173