



Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Charakterisierung und Modifizierung der Kohlenwasserstoffproduktion in Mikrokokken

Maximilian Josef Surger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. h. c. Ingrid Kögel-Knabner

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Wolfgang Liebl

2. Prof. Dr. Dieter Langosch

Die Dissertation wurde am 15.05.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan am 16.07.2018 angenommen.

*Ich widme diese Doktorarbeit
meinen Eltern*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	5
2.1. Mikrobielle Kohlenwasserstoffe als industrielle Produkte.....	5
2.2. Olefine: Der Syntheseweg und seine Enzyme	7
2.3. Strategien zur Optimierung des Olefin-Substratstoffwechsels.....	12
2.4. Phylogenetische Verbreitung der Olefinsynthese.....	15
2.5. <i>Micrococcus luteus</i>	17
3. Zielsetzung der Arbeit	18
4. Material und Methoden	19
4.1. Bakterien-Stämme und Plasmide	19
4.2. Medien.....	29
4.3. Pufferlösungen	30
4.4. Chemikalien	32
4.5. Zellanzucht und Stammhaltung.....	32
4.5.1. Anzuchtbedingungen.....	32
4.5.2. Bestimmung der Zelldichte.....	32
4.5.3. Stammhaltung und Reinheitskontrolle.....	33
4.6. Methoden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	33
4.6.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	33
4.6.2. Analytische und präparative Agarosegel-Elektrophorese.....	34
4.6.3. Präparation genomischer DNA aus <i>M. luteus</i>	35
4.6.4. Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> und <i>M. luteus</i>	35
4.6.5. Schnellpräparation von Plasmiden aus <i>M. luteus</i>	36
4.6.6. Analytischer und präparativer Plasmidverdau	36
4.6.7. (Kolonie-) Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
4.6.8. Aufreinigung von PCR-Produkten	39
4.6.9. Klonierung über „Gibson Assembly“	39
4.6.9.1. Klonierungsstrategien.....	41
4.6.10. Sequenzierung von PCR-Produkten	42
4.6.11. Extraktion und weitere Verarbeitung von RNA (Ribonukleinsäuren).....	42
4.6.12. qPCR (Quantitative PCR).....	44
4.7. Transformationstechniken.....	45
4.7.1. Transformation von <i>M. luteus</i>	45

4.7.2. Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation.....	46
4.7.3. Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	46
4.7.4. Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> durch Hitzeschock	46
4.8. Methoden für das Arbeiten mit Proteinen.....	47
4.8.1. Bestimmung der Proteinkonzentration	47
4.8.2. SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese	48
4.8.3. Expression von OleA- Proteinen in <i>E. coli</i>	49
4.8.4. His-Tag Affinitätschromatographie.....	50
4.8.5. Größenausschluss-Chromatographie	51
4.8.6. Enzymassays.....	51
4.8.6.1. OleA <i>in vitro</i> Aktivitätsassay/DTNB-Assay	51
4.8.6.2. Dichlorphenolindophenol (DCPIP) -Assay.....	52
4.8.6.3. Bestimmung von L-Glutaminsäure- und D-Glukose-Konzentration im Medium	52
4.9. Organische Extraktions-, Derivatisierungs- und Analyse-Methoden	53
4.9.1. Zellfraktionierung von <i>M. luteus</i>	53
4.9.2. Extraktion von Olefinen	54
4.9.3. Hydrierung von Olefinen.....	54
4.9.4. Extraktion von freien und Lipid-Fettsäuren	55
4.9.5. Acyl-CoA-Synthese aus freien Fettsäuren	55
4.9.6. GC/MS Analyse	57
5. Ergebnisse.....	59
5.1. Grundlegende Betrachtungen zur Olefinproduktion in <i>M. luteus</i>	59
5.1.1. Der zeitliche Verlauf der Olefinproduktion in <i>M. luteus</i>	59
5.1.2. Bestimmung des produzierten Olefinprofils von <i>M. luteus</i>	60
5.1.2.1. Annotation der Olefine.....	60
5.1.2.2. Das produzierte Olefinprofil von <i>M. luteus</i>	65
5.1.3. Lokalisation der Olefine innerhalb der Bakterienzelle.....	66
5.1.3.1. Optimierung des Olefin-Speichers der Bakterienzelle	67
5.1.4. <i>M. luteus</i> als Vertreter der Olefinproduktion seiner phylogenetischen Ordnung ..	67
5.1.5. Physiologische Rolle der Olefine in <i>M. luteus</i>	71
5.1.5.1. Olefine als Wachstum bestimmender Faktor.....	71
5.1.5.2. Der Kohlenstoffbedarf der Olefinproduktion.....	73
5.1.6. Einflussfaktoren auf die Olefinproduktion in <i>M. luteus</i>	75
5.1.6.1. Die Bedingung „Oberflächenwachstum“.....	76
5.1.6.2. Der Faktor „Stickstoffangebot“	77

5.1.6.3. Der Faktor „Temperatur“	79
5.2. Optimierung des Stoffwechsels von <i>M. luteus</i> zur Olefinproduktion	80
5.2.1. Ungezielte Optimierung der Olefinsynthese.....	80
5.2.1.1. Überprüfung von Regulator-Deletions-Mutanten	80
5.2.1.2. RNA-Sequenzierung von Regulator-Mutanten.....	94
5.2.2. Gezielte Optimierung der Olefinsynthese durch Überexpression der OleABCD-Enzyme.....	97
5.2.3. Gezielte Optimierung der Olefinsynthese durch Manipulation der Substratverfügbarkeit	99
5.2.3.1. Die Reaktion der Acetyl-CoA-Carboxylase (AccABCD).....	99
5.2.3.2. Die Reaktion der β -Ketoacyl-Synthase III (FabH)	102
5.2.3.3. Der Abbau der verzweigten Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin	105
5.2.3.4. Die Reaktion der Acyl-ACP-Thioesterase (Tes).....	121
5.2.3.5. Die Reaktion der Acyl-CoA-Synthetase (FadD).....	126
5.2.3.6. Die Reaktion der Acyl-CoA-Dehydrogenase (FadE).....	128
5.2.3.7. Die Reaktion der NADH-Kinase	134
5.2.3.8. Die Kombination identifizierter Optimierungsmöglichkeiten der Olefinsynthese	136
5.3. Die Substratspezifität der Olefinsynthese in <i>M. luteus</i>	141
5.3.1. Supplementierung mit Carbonsäuren verschiedener Kettenlänge.....	141
5.3.2. Supplementierung mit ungesättigten Carbonsäuren.....	144
5.3.3. Supplementierung mit kurzkettigen, unterschiedlich verzweigten Carbonsäuren	145
5.3.4. Die <i>oleA</i> -Austausch-Stämme (<i>olex</i> -Stämme)	153
5.3.5. Expression von OleA-Proteinen der <i>Micrococcales</i>	155
5.3.6. <i>In silico</i> -Analyse der OleA-Substratkanäle der <i>Micrococcales</i>	157
6. Diskussion	161
6.1. Grundlegende Betrachtungen zur Olefinproduktion in <i>M. luteus</i>	161
6.1.1. Das Olefinprofil von <i>M. luteus</i>	161
6.1.2. <i>M. luteus</i> als Vertreter der Olefinproduktion seiner phylogenetischen Ordnung	162
6.1.3. Der zeitliche Verlauf der Olefinproduktion in <i>M. luteus</i>	163
6.1.4. Die Olefine als Strukturelement der Zellmembran	164
6.1.5. Die physiologische Rolle der Olefine für <i>M. luteus</i>	165
6.2. Optimierung des Stoffwechsels von <i>M. luteus</i> zur Olefinproduktion	167
6.2.1. Ungezielte Optimierung der Olefinsynthese.....	167
6.2.2. Gezielte Optimierung der Olefinsynthese durch Überexpression der OleABCD-Enzyme.....	170

6.2.3. Gezielte Optimierung der Olefinsynthese durch Manipulation der Substrat-Stoffwechsel.....	170
6.2.3.1. Die Reaktion der Acetyl-CoA-Carboxylase (AccABCD).....	172
6.2.3.2. Die Reaktion der β -Ketoacyl-Synthase III (FabH).....	173
6.2.3.3. Der Abbau der verzweigten Aminosäuren: Isoleucin, Leucin und Valin	175
6.2.3.4. Die Reaktion der Acyl-ACP-Thioesterase (Tes).....	179
6.2.3.5. Die Reaktion der Acyl-CoA-Synthetase (FadD).....	183
6.2.3.6. Die Reaktion der Acyl-CoA-Dehydrogenase (FadE).....	184
6.2.3.7. Die Reaktion der NADH-Kinase	189
6.3. Die Substratspezifität der Olefinsynthese in <i>M. luteus</i>	190
6.3.1. Supplementierung mit Carbonsäuren verschiedener Kettenlänge.....	190
6.3.2. Supplementierung mit ungesättigten Carbonsäuren.....	192
6.3.3. Supplementierung mit kurzkettigen unterschiedlich verzweigten Carbonsäuren.....	193
6.3.4. Die <i>oleA</i> -Austausch-Stämme (<i>olex</i> -Stämme)	195
6.3.5. <i>In silico</i> -Analyse der OleA-Substratkanäle der <i>Micrococcales</i>	198
7. Im Rahmen der Dissertation entstandene Veröffentlichungen	201
7.1. Zeitschriftenartikel	201
7.2. Poster-Präsentationen auf internationalen Fachkonferenzen	201
7.3. Vorträge auf internationalen Fachkonferenzen	201
8. Literaturangaben	202
9. Anhang.....	210
9.1. Olefin- und Fettsäureprofile aller <i>Micrococcales</i> -Stämme	210
9.2. Isomeren-Verteilung der Mutante <i>trpE16 ope</i> Δ 02880-90:kan	214
9.3. RNA-Sequenzierungsergebnis: Starke Promotoren	215
9.4. Primer-Tabellen für Klonierungen	217

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung

ADP	Adenosin-Diphosphat
<i>ai</i>	<i>anteiso</i>
AS	Aminosäuren
ATCC	„American tissue cell culture“
ATP	Adenosin-Triphosphat
blastp	Proteinsequenz-Blasten
bp	Basenpaare
<i>br</i>	verzweigte Fettsäuren
<i>brbr</i>	an beiden Enden verzweigte Olefine
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CaCl ₂	Calcium-di-chlorid
CBS	„Centraal Bureau voor Schimmelcultures“, Utrecht, The Netherlands
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CT	„Threshold cycle“
Cys	Cystein
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-Triphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eV	Elektronen-Volt
FAD/FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAME	Fettsäure-Methylester
FeSO ₄ *7H ₂ O	Eisensulfat-Heptahydrat
g	Gramm
GA	„Gibson-Assembly“
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
gDNA	Genomische DNA
h	Stunde
H ⁺	Proton
HCl	Chlorwasserstoff
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
His	Histidin
hyg	Hygromycin-Kassette
H ₂ O	Wasser
ID	Innendurchmesser
i.d.R.	in der Regel

Abkürzung

<i>Iso-g</i>	<i>Iso</i> -geradzahlig
Iso Puffer	isothermaler Puffer
<i>Iso-ug</i>	<i>Iso</i> -ungeradzahlig
kan	Kanamycin-Kassette
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHCO ₃	Kalium-Hydrogencarbonat
K ₂ HPO ₄	Di-Kalium- Hydrogenphosphat
L	Liter
LB	„Lysogeny broth“
M	Molar
m	Meter
µF	Mikrofarad
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesium-di-chlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min.	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
mM	Millimolar
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
MnCl ₂	Mangan-di-chlorid
mRNA	„Messenger-RNA“
m/z	Masse/Ladung
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺ /NADH	Nicotinsäureamid-Adenin- Dinukleotid
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin- Dinukleotid-Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
Nay	Naylor-Medium
Na ₂ EDTAx2H ₂ O	Di-Natrium-EDTA-Dihydrat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natrium- Hydrogenphosphat
NCTC	“National Collection of Type Cultures”, Central Public Health Laboratory, London, England
NEB	“New England Biolabs”
NH ₄	Ammoniak
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
Ni	Nickel
nm	Nanometer
Ω	Ohm
OD	Optische Dichte
olex	<i>oleA</i> -Austausch
ORF	„Open reading frame“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Abkürzung

PEG	Polyethylenglykol
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
P _i	anorganisches Phosphat
PIPES	1,4-Piperazin-Diethansulfonsäure
PTFE	Polytetrafluorethylen
qPCR	quantitative PCR
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RPKM	„Reads per kilobase pair of transcript per million mapped reads“
rpm	„Revolutions per minute“
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse Transkription-qPCR
sc	unverzweigt

Abkürzung

SDS	„Sodium Dodecyl Sulphate“
sek.	Sekunde
ssRNA	einzelsträngige RNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
Trp	Tryptophan
TUM	Technische Universität München
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter Anderem
<i>un</i>	ungesättigt
ü.N.	über Nacht
<i>xsc</i>	an einem oder beiden Enden unverzweigte Olefine zum Beispiel
z.B.	
%	Prozent

1. Zusammenfassung

Die Produktion mikrobieller Kohlenwasserstoffe stellt eine nachhaltige und ethisch konfliktfreie Alternative zur Nutzung von Kohlenwasserstoffen aus Erdöl dar. In dieser Hinsicht ist das leicht handhabbare und genetisch manipulierbare Aktinobacterium *Micrococcus luteus* ein geeigneter Ausgangspunkt für Anstrengungen dessen natürliche Produktion von Olefinen (langkettige Alkene) in Menge und physikalischen Eigenschaften mit Blick auf eine mögliche biotechnologische Nutzung zu optimieren. In dieser Arbeit konnte durch optimierte organische Extraktions- und Derivatisierungsmethoden sowie mithilfe verschiedener Gas-Chromatographie-Massenspektrometer-Geräte und -Konfigurationen das natürliche Olefinprofil von *M. luteus* lückenlos beschrieben werden. Die Verbreitung der Bildung von Olefinen in der Gram-positiven Ordnung der *Micrococcales* konnte umfassender und detaillierter als je zuvor beschrieben werden. Es wurden die Olefinprofile einer Vielzahl von *Micrococcus*-, *Kocuria*-, *Arthrobacter*- und *Brevibacterium*-/*Curtobacterium*-Stämme sowie erstmals von *Microbacterium*-, *Rothia*-, *Dermacoccus*-, *Paenarthrobacter*-, *Glutamicibacter*- und *Pseudarthrobacter*-Stämmen beschrieben. Durch Zellfraktionierung und Monitoring der Olefinproduktion im Verlauf des Wachstums konnten erste Einblicke in die zeitliche und räumliche Organisation der Olefinsynthese in *M. luteus* generiert werden. Die Rolle der Olefine als Bestandteil der Zellmembran und stabilisierender Faktor für das Wachstum von *M. luteus* wurde durch Wachstumsexperimente bei unterschiedlichen Temperaturen in Stämmen mit und ohne Olefinproduktion herausgestellt. Das Screening der Fettsäure- und Olefinproduktion in einer Sammlung von *M. luteus* Mutanten mit ungezielt ausgeschalteten Regulatorgenen sowie der Vergleich von Transkriptionsmustern über RNA-Sequenzierung lieferte Hinweise auf bislang unbekannte Regulationsnetzwerke, die die Olefinsynthese in *M. luteus* betreffen. So unterdrückt der Transkriptions-Regulator Mlut_02880 den Isoleucin-/Valin-Abbau und die β -Oxidation und trägt damit wesentlich zu Substratmenge und -spektrum für die Olefinsynthese bei. Die Steigerung der Olefinsyntheserate durch Überexpression der Ole-Enzyme alleine zeigte begrenztes Optimierungspotential für die Olefinproduktion in *M. luteus* und wies die Substratverfügbarkeit als wesentliche Limitierung aus.

Es wurden diverse bioinformatische Hilfsmittel genutzt um Gene bzw. Enzyme des Stoffwechsels der Substrate der Olefinsynthese zu identifizieren und zu vergleichen. Mutationen des Fettsäurestoffwechsels, des Aminosäureabbaus und der Olefinsynthese wurden in *M. luteus* durch Klonierung von (heterologen) Genkonstrukten mittels natürlicher Transformation und homologer Rekombination erzeugt. Es konnten mit Ausnahme der nativen Acyl-ACP-Thioesterase die Gene vermutlich aller relevanten Enzymreaktionen des *M. luteus* Stoffwechsels der Substrate der Olefinsynthese sowie teilweise ihre regulatorische Kontrolle identifiziert und ihre Bedeutung für die Olefinsynthese in *M. luteus* herausgestellt werden. Mit dem Ziel die Olefinproduktion in *M. luteus* zu maximieren, wurde damit begonnen, für die Substratverfügbarkeit förderliche Mutationen markerfrei in einem Stamm zu kombinieren. Die Überexpression der Gene für OleABCD, AccABCD und FabH lieferte eine 7,5fache Steigerung (in LB-Medium), die Überexpression der Gene für OleABCD und BCKA-Dehydrogenase eine 13,6fache Steigerung der Olefinproduktion (in Naylor-Medium). In dieser Arbeit konnten Erkenntnisse über die Substratspezifität des OleA-Proteins in *M. luteus* gewonnen werden indem Carbonsäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge und Verzweigung supplementiert wurden und das native *oleA*-Gen gegen Homologe aus aktinobakteriellen Verwandten ausgetauscht wurde. Die Grenzen der Substratspezifität für Kettenlängen bzw. Kettenlängenkombinationen und die Relevanz der Position, Zahl und Größe der Verzweigungen wurden angedeutet. *In silico*-Vergleiche der Aminosäuresequenzen aktinobakterieller OleA-Proteine lieferten Anhaltspunkte für die biochemische Grundlage dieser Substratspezifitäten. Die Messung der *in vitro*-Aktivität von rekombinant produzierten *Kocuria*- und *Kytococcus*-OleA-Proteinen und ihre künftige Strukturanalyse sollten hilfreich sein die Ausprägung und biochemische Grundlage der OleA-Substratspezifitäten besser zu beschreiben. Diese Arbeit zeigt optimale Kulturbedingungen, das phylogenetische Potential und die physiologische Rolle der natürlichen Olefinsynthese in *M. luteus* auf. Bekannte und bislang unbekannte Ziele des metabolischen Engineerings des Substratstoffwechsels wurden identifiziert und teilweise bereits zur Optimierung der Olefinsynthese in *M. luteus* angewendet. Die Untersuchung der aktinobakteriellen OleA-Substratspezifitäten liefert weitere Modulierungsansätze der Olefinsynthese.

Somit stellt diese Arbeit die Grundlage für weitere Verbesserungen mit dem Ziel einer wirtschaftlichen Produktion einer Art von mikrobiellen Kohlenwasserstoffen dar.

Summary

The production of microbial hydrocarbons represents a sustainable and ethically conflict-free alternative to the use of hydrocarbons obtained from fossil oil. In this regard, the undemanding and genetically accessible actinobacterium *Micrococcus luteus* is a possible starting point for efforts to optimize its natural production of olefins (long-chain alkenes), in terms of amount and physical properties, for possible future biotechnological application. In this work, the natural olefin product pattern of *M. luteus* could be completely described using different gas chromatograph-mass spectrometer devices and set-ups. The distribution of olefin production within the Gram-positive order *Micrococcales* could be described more completely and more detailed than ever before. The olefin pattern of a multitude of *Micrococcus*, *Kocuria*, *Arthrobacter*, and *Brevibacteria/Curtobacteria* strains, and for the first time also of *Microbacterium*, *Rothia*, *Dermacoccus*, *Paenarthrobacter*, *Glutamicibacter*, and *Pseudarthrobacter* strains could be described. Using cell fractionation and monitoring of olefin production along the growth curve, insights into the temporal and spatial organization of the olefin synthesis in *M. luteus* could be generated. The role of olefins as elements of the cell membrane and as a stabilizing factor for the growth of *M. luteus* could be described using growth experiments at different temperatures with strains able or not able to produce olefins. The screening of fatty acid and olefin production in a collection of *M. luteus* mutants with untargeted regulator gene deletions as well as the comparison of gene transcription patterns, using RNA sequencing, yielded information on so far unknown regulation networks, which have influence on olefin synthesis in *M. luteus*. In this regard the transcriptional regulator Mlut_02880 represses the isoleucine/valine degradation and the β -oxidation pathways and determines fundamentally the amounts and types of substrate compounds available for olefin synthesis. The overexpression of the OleABCD enzymes led to a moderate improvement of olefin production in *M. luteus* and revealed the supply of substrate compounds as a crucial limitation.

Various bioinformatic tools and databases were used to identify and compare genes or enzymes of the pathways of substrate provision for olefin biosynthesis. Mutants of the fatty acid metabolism, the amino acid catabolism and the olefin biosynthesis in *M. luteus* were generated via cloning of (heterologous) gene constructs using natural transformation and homologous recombination. Apart from the native acyl-ACP thioesterase, the genes encoding probably all relevant enzymatic reactions of the pathways providing the substrates for olefin synthesis in *M. luteus* as well as in part their regulation schemes could be identified and their roles in olefin synthesis in *M. luteus* could be highlighted. With the objective of maximizing the olefin production in *M. luteus*, combinations of beneficial mutations were introduced as marker-free modifications into one strain. The overexpression of the genes encoding OleABCD, AccABCD, and FabH enzymes led to 7.5-fold higher olefin production in complex medium, and the overexpression of the genes encoding OleABCD and BCKA-dehydrogenase enzymes led to 13.6-fold higher olefin production in minimal medium. Insights into the substrate specificity of *M. luteus* OleA could be gained by supplementation experiments with carboxylic acids of various chain lengths and branching patterns as well as by exchange of the *M. luteus oleA* gene against homologs of actinobacterial relatives. The substrate specificity boundaries concerning chain lengths and chain length combinations as well as the importance of position, number, and size of substrate branching could be indicated. *In silico* comparison of amino acid sequences of actinobacterial OleA proteins led to clues about the biochemical basis of OleA substrate specificity. The measurement of the *in vitro*-activity of recombinantly produced *Kocuria* and *Kytococcus* -OleA proteins and their structural analysis in the future should be helpful to improve description of the characteristic and biochemical basis of substrate specificities. This work indicates optimal culture conditions, the phylogenetical potential and the physiological role of natural olefin synthesis in *M. luteus*. Known as well as unknown targets of metabolic engineering of the pathways providing the substrates for olefin synthesis were identified and used in part for the optimization of olefin biosynthesis in *M. luteus*. The investigation of the actinobacterial OleA substrate specificities showed new manipulation targets for improvement of olefin synthesis. To summarize, this work provides the basis for further improvements with the aim of an economical production of one valuable type of microbial hydrocarbons.

2. Einleitung

2.1. Mikrobielle Kohlenwasserstoffe als industrielle Produkte

Die Stoffklasse der Kohlenwasserstoffe beinhaltet organische Verbindungen die nur aus Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen aufgebaut sind. Sie alle verbindet ihr hydrophober Charakter. Anhand der Zahl ihrer Kohlenstoffatome und der damit verbundenen physikalischen Eigenschaften können sie in die niederen, mittleren und hohen Kohlenwasserstoffe sowie verschiedene Anwendungsbereiche eingeteilt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung der Kohlenwasserstoffe nach physikalischen Eigenschaften und Anwendungsbereichen [1]-[3].

Kohlenwasserstoff-Kategorie		Eigenschaften	Anwendungsbereiche
Niedere	aliphatische ungesättigte aliphatische	Gase und Flüssiggase C ₁ -C ₄ -Ketten Flammpunkt < -100 °C Siedepunkt < -40 °C	Heiz- und Brennstoff Kunststoff- und Waschmittel-Bausteine
	aliphatische	Flüssigkeiten C ₅ -C ₁₂ -Ketten Flammpunkt < 80 °C Siedepunkt < 230 °C	Benzin-Kraftstoffe Lampen-Öl
Mittlere	zyklische aliphatische, aromatische	Flüssigkeiten C ₁₃ -C ₁₈ -Ketten Siedepunkt < 300 °C	Benzin-Kraftstoffe Lösungs- und Extraktionsmittel Klebstoff- und Kunststoff-Bausteine
	aliphatische	Flüssigkeiten C ₁₉ -C ₃₂ -Ketten Siedepunkt < 500 °C	Diesel-Kraftstoffe Heiz-Öl
Höhere	aliphatische	zähe Flüssigkeiten C ₁₉ -C ₃₂ -Ketten Siedepunkt < 500 °C	Schmiermittel Kerzenwachs Kosmetika-Zusätze

Diese nützlichen Kohlenwasserstoffe werden heute hauptsächlich direkt aus fossilem Erdgas und durch Destillation als Fraktionen von fossilem Erdöl gewonnen bzw. durch verschiedene Veredelungsverfahren ineinander umgewandelt und aufgereinigt. Die Gewinnung und Nutzung fossiler Gas- und Ölprodukte hat wegen des weltweiten Rückgangs der Vorkommen bei gleichzeitig steigendem Bedarf und der zunehmenden Kritik an der zusätzlichen Freisetzung von CO₂ sowie der damit verbundenen Förderung des Klimawandels ein Ablaufdatum [1], [4]. Eine erste dadurch verursachte Entwicklung war neben dem Aufschwung der industriellen Produktion von Bioethanol die verstärkte Nutzung von Biogas-Anlagen, in der anaerobe acetogene, anaerobe hydrogenotrophe methanogene und anaerobe acetoklastische methanogene Bakterien die biotische Bildung von Erdgas nachstellen, die allerdings nur für einen geringen Anteil der heute vorhandenen Erdgasvorkommen verantwortlich ist [5].

Als Substrate der Biogas-Anlagen wie der Bioethanol-Produktion dienen Kohlenhydrat-haltige Nahrungsmittelpflanzen wie Zuckerrüben, Mais oder Weizen, die wiederum Anbaufläche auf Kosten von Naturwäldern benötigen. Dies widerspricht der gewünschten Nachhaltigkeit und steht in ethischem sowie ökonomischen Konflikt mit der Nahrungsmittelproduktion [6]–[8]. Ein weiterer Entwicklungsschritt ist erforderlich [1]. Im Zentrum dieser Entwicklung stehen weiterhin Mikroorganismen, also Bakterien aber auch Hefen, die als Reaktionsraum mit einer genetisch manipulierbaren Ausstattung von Enzymen möglichst einfache und ubiquitär vorkommende Substrate, wie Cellulose-Abbauprodukte (Hexosen, Pentosen) oder Industrieabfälle, in hochwertige Kohlenwasserstoffe in wirtschaftlichen Mengen umsetzen sollen [9]. Als Stoffwechselgrundlage für die Produktion mikrobieller Kohlenwasserstoffe hat neben der Isoprenoid-Synthese der Fettsäure-Stoffwechsel mancher Mikroorganismen das größte Interesse geweckt [1], [10]. Hier können durch Decarbonylierung langkettiger Aldehyd-Intermediate oder durch Reduktion langkettiger Acyl-ACPs zu Aldehyden und anschließender Abspaltung von Formaldehyd C_4 - C_{23} -Alkane/Alkene gewonnen werden [4], [9], [11]–[13]. Weitere Möglichkeiten bilden die Decarboxylierung von langkettigen Fettsäuren zu terminalen Alkenen (terminale bzw. α -Olefine) [14], [15] und die Kondensation von zwei langkettigen Acyl-CoAs zu Alkenen (Olefinen) mit interner Doppelbindung und Kettenlängen von C_{22} - C_{31} [16].

Trotz des gegebenen wirtschaftlichen Interesses für diese mikrobiellen Stoffwechselprodukte ist die Rentabilität der Produktionsprozesse noch nicht ausreichend. Der Fettsäurestoffwechsel der Mikroorganismen kann gewisse Produktionshürden aufweisen, die einen großtechnischen Einsatz sowie eine Maximierung des Kohlenstoffflusses vom Substrat zum Kohlenwasserstoff verhindern. So geht die Fettsäureproduktion oft einher mit Energieüberschuss, also Akkumulation von Redox-Äquivalenten wie NADH, die aufgrund des Zwangs zur Redox-Neutralität in alternativen Stoffwechselrouten abgebaut werden müssen und dabei zusätzlich Kohlenstoff verbrauchen [1], [17]. Außerdem ist der Fettsäurestoffwechsel ein energetisch aufwendiger Prozess und daher in vielen Organismen stark kontrolliert. Die Regulationsmechanismen limitieren den Kohlenstofffluss in gewünschte Produkte.

Es ist unwahrscheinlich, dass die Anreicherung der unreaktiven Alkane bzw. Alkene toxische Wirkung auf die mikrobielle Zelle haben, da sie jedoch in der Zelle akkumuliert werden, ist die Produktion durch die Speicherkapazität eingeschränkt [18]. Daraus ergibt sich als weiteres Problem, dass zumindest mittlere und höhere Kohlenstoffprodukte nicht sekretiert werden, was zusätzlichen Aufwand durch Extraktion erfordert [19]. Schließlich senken mangelnde Robustheit gegenüber großtechnischen Kulturbedingungen und häufig geringe Wachstumsraten die Produktivität der Organismen [1], [9]. Aufgrund der Diversität der Mikroorganismen kann davon ausgegangen werden, dass möglicherweise ein robuster, hocheffizienter, natürlicher Produzent für jede Art von Kohlenwasserstoff existiert, der Cellulose bzw. seine Abbauprodukte verwerten kann und sein Produkt unkontrolliert freisetzt. Die Suche nach diesem idealen Organismus verspricht jedoch weniger Erfolg als die Idee sich der Fortschritte des metabolischen Engineerings zu bedienen und einen genetisch zugänglichen Organismus auszuwählen, der die gewünschte Stoffwechselroute bereits besitzt bzw. die genetische Grundlage der gewünschten Stoffwechselroute in diesen zu übertragen und auch alle anderen Eigenschaften eines idealen Produzenten künstlich einzubringen [19]–[21].

2.2. Olefine: Der Syntheseweg und seine Enzyme

Die Synthese langkettiger Alkene (Olefine) mit interner Doppelbindung wurde bereits Ende der 60er Jahre in *Sarcina lutea* (heute *Kocuria rizophilia*) beobachtet. Es wurde ihr Anteil an der Lipidfraktion bestimmt [22] und eine Verbindung mit dem Fettsäurestoffwechsel wurde hergestellt [23]. Die Struktur der gebildeten Olefine wurde aufgeklärt [24]. Als zentrale Elemente der Olefinsynthese wurde eine „Head-to-Head“-Kondensation von zwei Fettsäuren-Derivaten und die Decarboxylierung einer der beiden Substrate postuliert und bestätigt [25], [26]. Als Hinweis auf beteiligte Enzyme wurden *in vitro* die Cofaktor- und pH-Ansprüche der Olefinsynthese beschrieben [27].

Erst Beller *et al.* [29] lieferte 2010 in *Micrococcus luteus* ATCC 4698 (DSM20030), einem nahen Verwandten von *Kocuria rhizophila*, erste Einblicke in die zugrundeliegenden biochemischen Mechanismen der Olefinsynthese. Beller *et al.* griff die Beobachtungen zur „Head-to-Head“-Kondensation und Decarboxylierung von Fettsäurederivaten auf und postulierte die Beteiligung von Enzymen, die homolog zu den kondensierenden Enzymen FabF und FabH aus dem Fettsäurestoffwechsel sind (biosynthetische Thiolasen). Die heterologe Expression des FabF-Homologs Mlut_09290 sowie der FabH-Homologe Mlut_09310 und Mlut_13230 von *M. luteus* in *E. coli* lieferte nur für Mlut_13230 die Produktion von langkettigen Monoketonen. Im Folgenden führte die Expression des gesamten *M. luteus*-Genclusters Mlut_13230-13250 (nachfolgend *oleABCD* genannt [28]) zur Produktion der entsprechenden langkettigen Olefine. *In vitro* produzierte das exprimierte Protein von Mlut_13230 (OleA) in einem *E. coli*-Lysat mit Acyl-CoAs Monoketone. Als FabH-Homolog postulierten Beller *et al.* für die kondensierende Thiolase OleA die Decarboxylierung eines durch β -Oxidationsschritte gebildeten β -KetoAcyl-CoAs/ACPs (gestützt durch das Erfordernis des *E. coli*-Lysats *in vitro*) und den nukleophilen Angriff des entstehenden Carbanions auf ein zweites Acyl-CoA/ACP, also eine decarboxylierende „Head-to-Head“-Claisen-Kondensation. Die dabei entstehenden Diketone konnte er jedoch nicht nachweisen, außerdem konnte er auch durch weitere hypothetische Enzymprozessierungen das zusätzliche Auftreten einer Doppelbindung zwischen Monoketonen und Olefinen nicht erklären. Die Rolle des als α -/ β -Hydrolase identifizierten Proteins OleB, des als AMP-abhängige Synthase/Ligase identifizierten Proteins OleC und des als Dehydrogenase identifizierten Proteins OleD blieb offen [29].

Sukovich *et al.* [30] postulierte als alternativen Reaktionsmechanismus von OleA die nicht-decarboxylierende „Head-to-Head“-Claisen-Kondensation (Abbildung 1B). Es wurde argumentiert, dass es in der Superfamilie der kondensierenden Thiolasen, zu der FabH und OleA zählen, auch nicht-decarboxylierende Thiolasen gibt und eine Unterscheidung durch Konservierung der Aminosäure-Sequenz nicht möglich ist. Auch führt die nicht-decarboxylierende Kondensation über eine β -Ketosäure und spontane Decarboxylierung zu einem Monoketon, was in *oleBCD*-Deletionsmutanten von *Shewanella oneidensis* *in vivo* beobachtet wurde [16], [30].

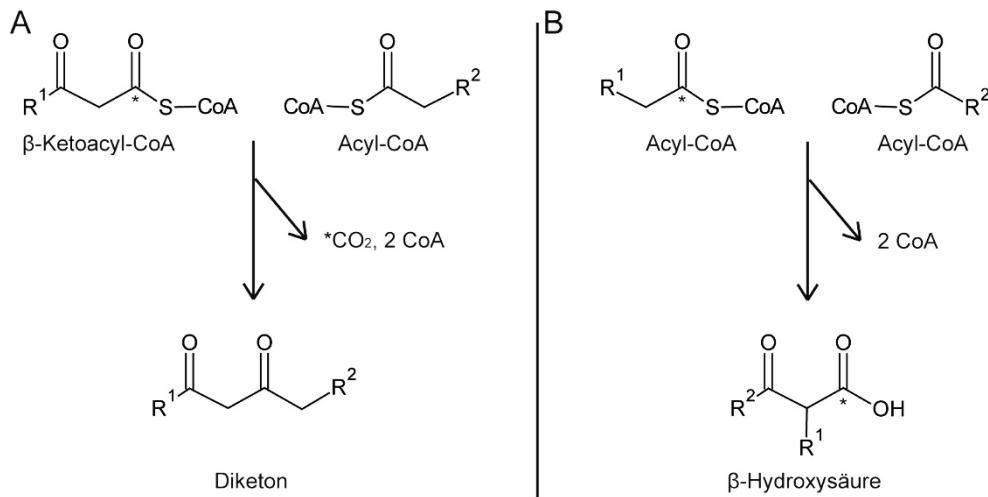


Abbildung 1: Gegenüberstellung der decarboxylierenden (A) und nicht-decarboxylierenden (B) „Head-to-Head“-Claisen-Kondensationsmechanismen postuliert durch Beller *et al.* bzw. Sukovich *et al.* [31].

Frias *et al.* [31] bewiesen die nicht-decarboxylierende „Head-to-Head“-Claisen-Kondensation. In *in vitro*-Studien wurde gezeigt, dass aufgereinigtes OleA aus *X. campestris* Acyl-CoAs zunächst zu β -Ketosäuren umsetzt bevor diese zunehmend in Monoketone weiterreagieren. Außerdem wurde beobachtet, dass selbst synthetisierte β -Ketosäuren ohne OleA die gleiche spontane Decarboxylierung zu Monoketonen durchliefen sowie mithilfe von aufgereinigtem OleC und OleD in Olefine umgewandelt werden konnten. OleC und OleD reagierten dagegen nicht mit dem Monoketon. In der Folge postulierten Frias *et al.* exakte Reaktionsschritte des OleA-Enzyms: Demnach wird ein erstes Acyl-CoA-Substrat im aktiven Zentrum durch einen Cystein-Rest am Carbonyl-Kohlenstoff gebunden. Dabei wird das erste Coenzym A freigesetzt. Das α -Kohlenstoffatom des gebundenen Substrats wird durch einen basischen Rest deprotoniert und ein Carbanion gebildet. Das Carbanion wiederum greift den Carbonyl-Kohlenstoff eines zweiten Acyl-CoAs nukleophil an, wobei das zweite Coenzym A freigesetzt wird. Die β -Ketosäure wird durch Hydrolyse aus dem aktiven Zentrum freigesetzt (Abbildung 2). Weiterhin unklar war die Unterbindung spontaner Decarboxylierung in der OleABCD-Reaktionsabfolge sowie die genaue Lage des aktiven Zentrums und der Alkyl-Ketten-Bindungsstellen in OleA zur Bestätigung der postulierten Reaktionsschritte [31].

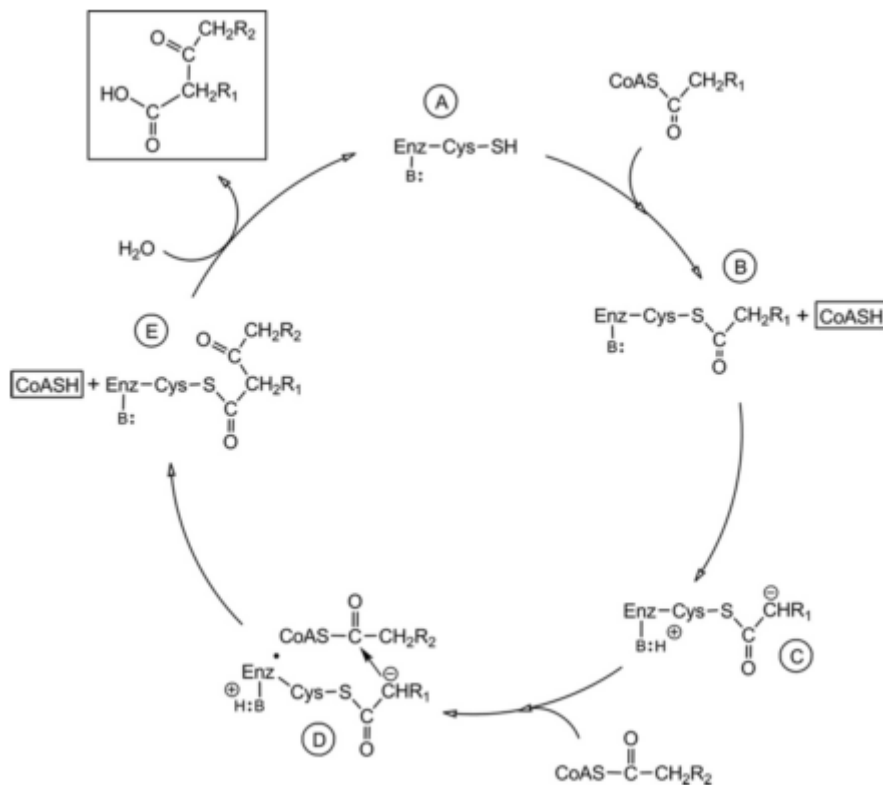


Abbildung 2: Reaktionsmechanismus von OleA, postuliert von Frias *et al.* [31]. In (A) ist das unbesetzte aktive Zentrum gezeigt. In (B) wird ein erstes Acyl-CoA durch ein Cystein am Carbonyl-Kohlenstoff gebunden. In (C) wird der α -Kohlenstoff durch einen basischen Rest des aktiven Zentrums deprotoniert. In (D) greift das gebundene Carbanion das zweite Acyl-CoA am Carbonyl-Kohlenstoff an. In (E) wird die β -Ketosäure durch Hydrolyse aus dem aktiven Zentrum freigesetzt [31]. Abkürzungen: Cys, Cystein; B, basischer Rest.

Später löste Goblirsch *et al.* [32] erstmals die Kristallstruktur eines OleA-Proteins (*X. campestris*) auf. Dabei konnte die Position des katalytischen Zentrums mit dem angesprochenen essentiellen Cystein-Rest und einem deprotonierenden Glutamat bestimmt werden. Außerdem konnte für OleA-Proteine, im Gegensatz zu anderen kondensierenden Thiolasen, neben dem Pantethein-Kanal zur Entlassung von Coenzym A statt einem zwei orthogonal angeordnete Alkyl-Kanäle bestimmt werden. Darin konnte durch gebundene Substrate, Intermediate und Inhibitoren der Ping-Pong-Mechanismus, mit dem die Acyl-CoAs umgesetzt werden, beschrieben werden [32], [33].

Christenson *et al.* [34] widmeten sich intensiver der Rolle der drei verbliebenen Enzyme OleBCD. Dabei wurde die bisher angenommene Reaktionsabfolge hinterfragt: Die durch OleA gebildete β -Ketosäure wird durch OleD NADPH-abhängig zu einer stabileren β -Hydroxysäure umgesetzt, die wiederum durch die AMP-abhängige Synthase/Ligase OleC in einer decarboxylierenden Dehydratisierung zum Olefin umgesetzt wird. OleB besitzt keine aktive Rolle.

Christenson *et al.* konnten die Beobachtung von Olefinen als Produkt der OleC-Reaktion als Fehlinterpretation durch die Benutzung von GC/MS-Analytik widerlegen. Unter Benutzung von NMR-Analytik wurde *in vitro* für die Reaktion von aufgereinigtem OleC verschiedener Gram-negativer Bakterien die Bildung von hitzelabilen β -Laktonen nachgewiesen. Die Reaktion von aufgereinigtem OleBC-Fusionsprotein von *M. luteus* dagegen führte auch zu Spuren von Olefinen. Sequenzvergleiche wiesen OleC abschließend als β -Lacton-Synthetase aus [34]. Später konnte Christenson *et al.* [35] u.a. durch unterschiedliche Arrangements von Affinitätstags an rekombinanten OleA-, OleC- und OleD-Proteinen von *X. campestris*, die gemeinsame Elution von OleBCD als ein Proteinkomplex nachweisen sowie durch Beobachtung der Co-Elution von Spuren von OleA dessen schwache Assoziation mit dem OleBCD-Komplex feststellen. Durch Gelfiltration und Elektronenmikroskopie aufgereinigter OleBCD-Komplexe konnte deren Größe sowie durch Vergleich mit Standardkurven in SDS-Acrylamid-Gelen von einzeln aufgereinigten Proteinen die stöchiometrische Zusammensetzung bestimmt werden. Damit erklärt sich wie in der OleABCD-Reaktionsabfolge die spontane Decarboxylierung der β -Ketosäure verhindert sowie das hochreaktive β -Lakton-Intermediat von der Zellumgebung abgeschirmt wird [35]. Zuletzt konnte Christenson *et al.* [36] das zuvor als α -/ β -Hydrolase annotierte OleB als β -Lakton-Decarboxylase beschreiben. Dies zeigte er durch die NMR-Analytik der *in vitro*-Reaktion von aufgereinigtem OleB aus *X. campestris* selektiv mit cis- β -Laktonen sowie von aufgereinigtem OleBC aus *M. luteus* selektiv mit cis- β -Hydroxysäuren zu cis-Olefinen [36]. In Abbildung 3 ist die durch Christenson *et al.* vervollständigte Reaktionsabfolge der OleABCD-Enzyme gezeigt.

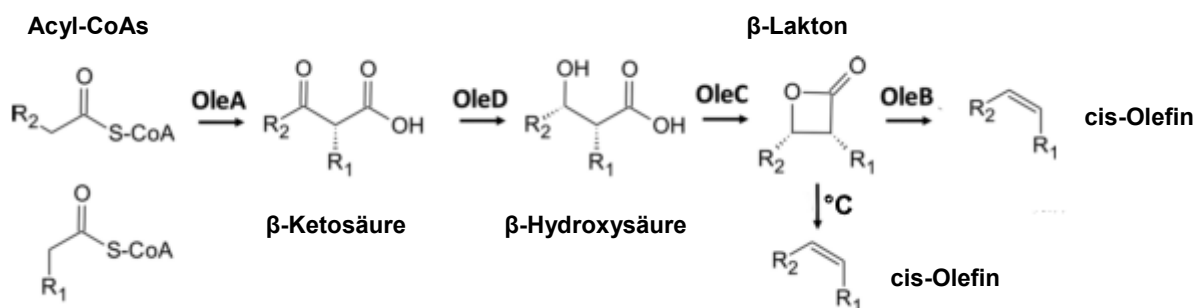


Abbildung 3: Reaktionsabfolge der OleABCD-Enzyme nach Christenson *et al.* [36]. Die Thiolase OleA setzt zwei Acyl-CoAs in einer nicht-decarboxylierenden „Head-to-Head“-Claisen-Kondensation zu einer β -Ketosäure um. Die Dehydrogenase OleD reduziert die β -Ketosäure NADPH-abhängig zur β -Hydroxysäure. Die β -Lakton-Synthetase OleC wandelt die β -Hydroxysäure in ein hitzelabiles β -Lakton um. OleB decarboxyliert schließlich das β -Lakton zum cis-Olefin [36].

2.3. Strategien zur Optimierung des Olefin-Substratstoffwechsels

Mit der Entwicklung und stetigen Verbesserung der Werkzeuge des metabolischen Engineerings in den genetisch-zugänglichen Modelorganismen *E. coli*, *B. subtilis* und *S. cerevisiae* bildeten sich ubiquitär anwendbare Strategien zur Optimierung der für die Olefinsynthese relevanten Substratstoffwechsel heraus.

Zur Optimierung der für die Olefinsynthese zur Verfügung stehenden Menge an Fettsäuren sind „Push and Pull“-Mechanismen auf die Fettsäurebiosynthese anzuwenden sowie native regulatorische Elemente und Konkurrenzreaktionen auszuschalten (Abbildung 4, grüne Rahmen und rote Pfeile).

Bewährt hat sich zur Implementierung eines „Push“-Effekts die Überexpression der Acetyl-CoA-Carboxylase (AccABCD). Das Enzym setzt zu Beginn der Fettsäurebiosynthese Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA um, steht damit in Konkurrenz zum Citrat-Zyklus um das gemeinsame Substrat und bestimmt die Flussrate durch die Fettsäurebiosynthese. Als „Pull“-Effekt ist der Abzug des Produkts zur Unterbindung einer produktabhängigen Inhibition der Fettsäurebiosynthese zu verstehen. Dies kann durch Fettsäureexport geschehen, also durch Expression heterologer Exportsysteme oder im Fall der Olefinproduktion durch Überexpression der Olefin-synthetisierenden Enzyme OleABCD, was zum Abzug von Fettsäuren bzw. Acyl-CoAs führt. Die Konkurrenzreaktionen zur Olefinsynthese sind zum einen die Lipidsynthese und zum anderen die β -Oxidation. Die Lipidsynthese ist wachstumsrelevant und daher schwer zu limitieren. Zur Fettsäureüberproduktion hat sich die Abschaltung der β -Oxidation durch Ausschaltung der FadD-Reaktion, die normalerweise zur Aktivierung der Fettsäuren für die β -Oxidation führt oder die Ausschaltung der FadE-Reaktion bei Bedarf von Acyl-CoAs als Substrate für die finale Produktbildung, wie bei der Olefinsynthese, durchgesetzt. Der Abbau von Acyl-ACPs am Ende der Fettsäurebiosynthese ist auch wesentlich für die Maximierung der Menge freier Fettsäuren. Langkettige Acyl-ACPs und -CoAs sind ein zentrales Element von allgemein beobachteten Regulationsmechanismen des Fettsäurestoffwechsels. Sie hemmen die Enzyme der Fettsäurebiosynthese und aktivieren Enzyme der β -Oxidation. Ausführlich beschrieben ist die allosterische Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase, die die Flussrate der Fettsäurebiosynthese bestimmt, durch langkettige Acyl-CoAs auf Proteinebene.

Aminosäure- und Fettsäure-Stoffwechsel zur Olefinsynthese

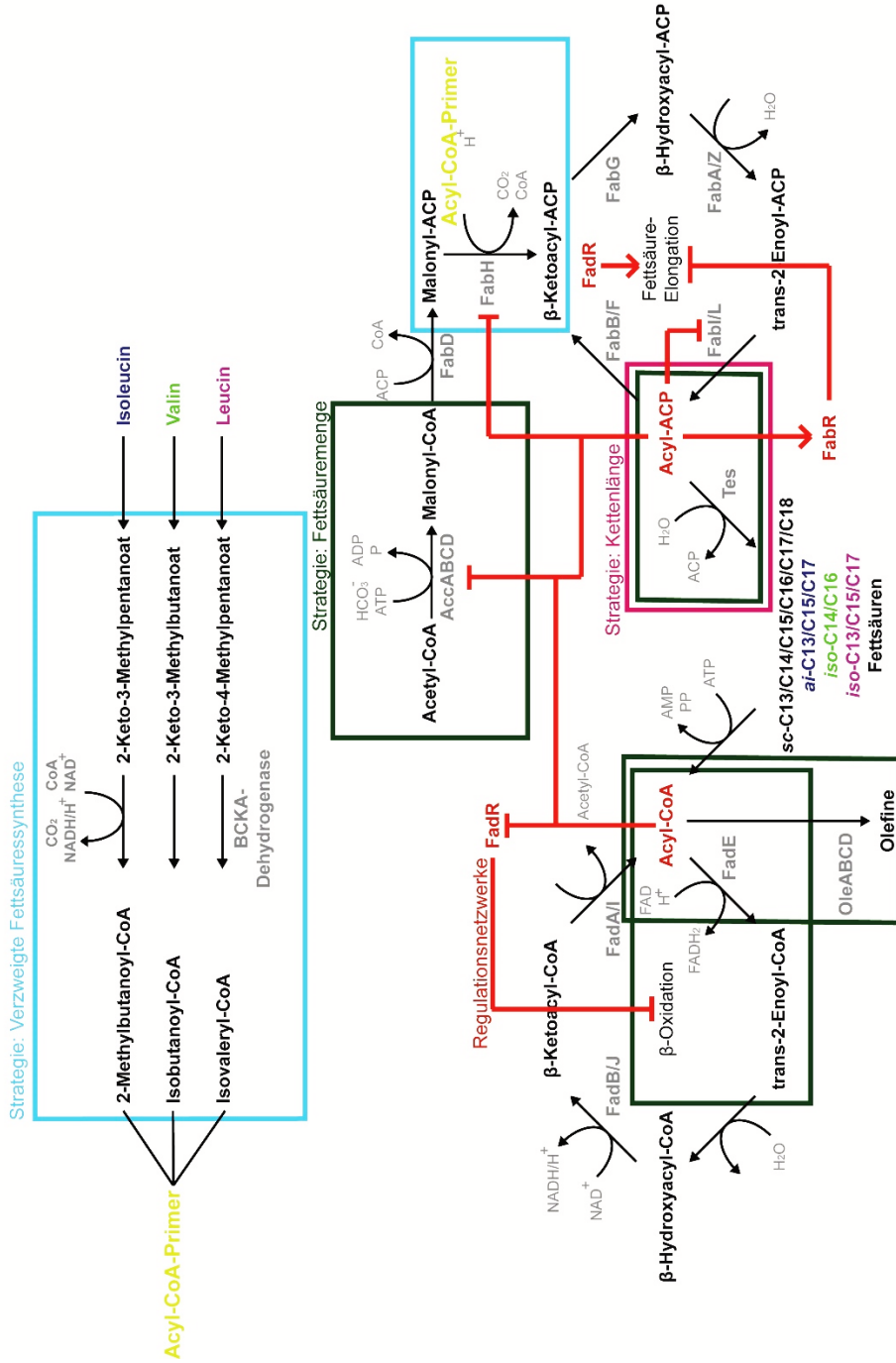


Abbildung 4: Übersicht der allgemein gültigen Stoffwechselwege für Substrate der Olefinsynthese. Diese besteht aus dem Anfang des Abbaus der verzweigten Aminosäuren (Isoleucin, Valin und Leucin) und dem Fettsäure-Stoffwechsel. Welche verzweigte Aminosäure Grundlage für welche Art von Fettsäuren ist, ist durch gleiche Einföhrung hervorzuheben. Die wirksamen Regulationsnetzwerke des Fettsäurestoffwechsels (rote Pfeile) und die metabolischen Manipulationsziele von drei Strategien zur Optimierung der Substrat-Stoffwechsel (grüne Rahmen), Kettenlänge (violette Rahmen) bzw. zur Implementierung verzweigter Fettsäuresynthese (blaue Rahmen) sind hervorgehoben. Abkürzungen: Acc, Acetyl-CoA-Carboxylase; BCKA, "Branched chain α -Ketoacid"; FabD, Malonyl-CoA-Acyl-Carrier-Protein Transacylase; FabH, β -Ketoacyl-Synthase III; FabG, β -Ketoacyl-Reduktase; FabA/Z, β -Hydroxyacyl-Dehydratase; FabI/L, Enoyl-ACP-Acyl-Carrier-Synthase I/II; FadE, Acyl-CoA-Dehydrogenase; FadB/J, β -Hydroxyacyl-Dehydrogenase; FadA/I, β -Ketoacyl-Thioesterase; FadR, Transkriptioneller Regulator des Fettsäurestoffwechsels; FabR, Transkriptioneller Regulator der ungesättigten Fettsäure-Biosynthese; Ole, Olefine synthetisierende Enzyme.

Außerdem stimuliert die Zusammensetzung aus gesättigten und ungesättigten Acyl-ACPs den Regulator FabR, der wiederum weitere Gene der Fettsäurebiosynthese transkriptionell hemmen kann. Zur Aufhebung dieser Limitierung ist entweder die native Acyl-ACP-Thioesterase zu identifizieren und zu überexprimieren oder heterologe hochaktive Thioesterasen zusätzlich einzubringen. Des Weiteren hebt die Bindung langkettiger Acyl-CoAs, abhängig von ihrer Konzentration, die kontinuierliche Repression der Gene der β -Oxidation und Aktivierung der Gene der Fettsäurebiosynthese durch den transkriptionellen Regulator FadR auf. Sollte unter Ausschaltung der FadE-Reaktion eine Maximierung von Acyl-CoAs angestrebt werden, so ist trotzdem die Aktivität eines FadR-artigen Regulators auf die Biosynthese zu unterbinden [37]–[39].

Wird eine Änderung des Kettenlängen-Spektrums der Fettsäure-Substrate für die Olefinsynthese angestrebt, so zielen routinemäßige Manipulationsversuche auf die Reaktion der Acyl-ACP-Thioesterase ab (Abbildung 4, violette Rahmen). Bakterielle und pflanzliche Acyl-ACP-Thioesterasen haben eine große Diversität von Kettenlängen-Spezifitäten gezeigt. Die native Thioesterase, sofern identifiziert, kann gegen ein heterologes Enzym ausgetauscht oder eine heterologe Thioesterase zusätzlich exprimiert werden um eine vollständige Änderung des Kettenlängenprofils zu erreichen [4], [40].

Die Implementierung der verzweigten Fettsäuresynthese in Gram-negativen Bakterien oder Eukaryonten ist durch den Einbau von zwei Gram-positiven Enzymen (Abbildung 4, blaue Rahmen) möglich. Das FabH-Enzym der Gram-negativen Bakterien und Eukaryonten bringt ausschließlich die unverzweigten Acyl-CoA-Primer Acetyl- und Propionyl-CoA in die Fettsäure-Elongation ein. Das Gram-positive Gegenstück setzt dagegen auch die verzweigten Acyl-CoA-Primer 2-Methylbutanoyl-, Isobutanoyl- und Isovaleryl-CoA um. Dies ist die Grundvoraussetzung einer verzweigten Fettsäuresynthese. Alle nachfolgenden Enzyme der Elongation prozessieren unspezifisch verzweigte sowie unverzweigte Acyl-ACP-Intermediate. Unabhängig davon wird die verzweigte Fettsäuresynthese in Gram-negativen Bakterien und Eukaryonten durch zu geringe Bereitstellung der verzweigten Acyl-CoA-Primer aus dem Abbau verzweigter Aminosäuren limitiert. Die zusätzliche heterologe Expression der Gram-positiven BCKA-Dehydrogenase, die die verzweigten Acyl-CoA-Primer produziert, kann diese Limitierung aufheben [4], [41].

Weitere Strategien zur Optimierung und Manipulation der Aminosäure- und Fettsäure-Stoffwechsel, die durch stetige Weiterentwicklung der Werkzeuge des metabolischen Engineering und unseres Verständnisses mikrobieller Kohlenstoffflüsse möglich werden, sehen die Einzelstoffwechsel in immer größeren metabolischen Zusammenhängen. Beispiele hierfür sind die Rolle des Fettsäurestoffwechsels sowie die Wirkung auf den Fettsäurestoffwechsel bei Kohlenstoffmangel („Stringent Response“) oder bei Wahrung der Redox-Neutralität [17], [39], [42].

2.4. Phylogenetische Verbreitung der Olefinsynthese

In silico wurden vollständige *oleABCD*-Gencluster (*ole*, Olefin synthetisierende Enzyme) in 5,2 % aller untersuchten bakteriellen Genome (1331 Genome) identifiziert. In Genomen von Eukaryonten (2143 Genome) oder Archaeen (84 Genome) wurden bislang keine homologen Gencluster gefunden. Die meisten Genome Gram-negativer Bakterien mit identifiziertem *oleABCD*-Gencluster gehören zum Phylum der *Proteobacteria*, allerdings konnten *ole*-Cluster auch für einzelne Gattungen der Phyla *Chloroflexi*, *Verucomicrobia* und *Planctomycetes* erfasst werden [16]. Dies deutet für Gram-negative Bakterien ein phylogenetisch weitgefächertes Vorkommen der Olefinsynthese an.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei Gram-positiven Genomen mit nachgewiesenem *oleABCD*-Gencluster bislang grundsätzlich um Gattungen des Phylums *Actinobacteria*, die 30 % der insgesamt identifizierten bakteriellen Genome mit *ole*-Clustern ausmachen [16][34]. Darunter sind vor allem Vertreter der Ordnung *Micrococcales*, u.a. *Kocuria rizophila* und *Micrococcus luteus*, in denen die Olefinsynthese zuerst beschrieben wurde.

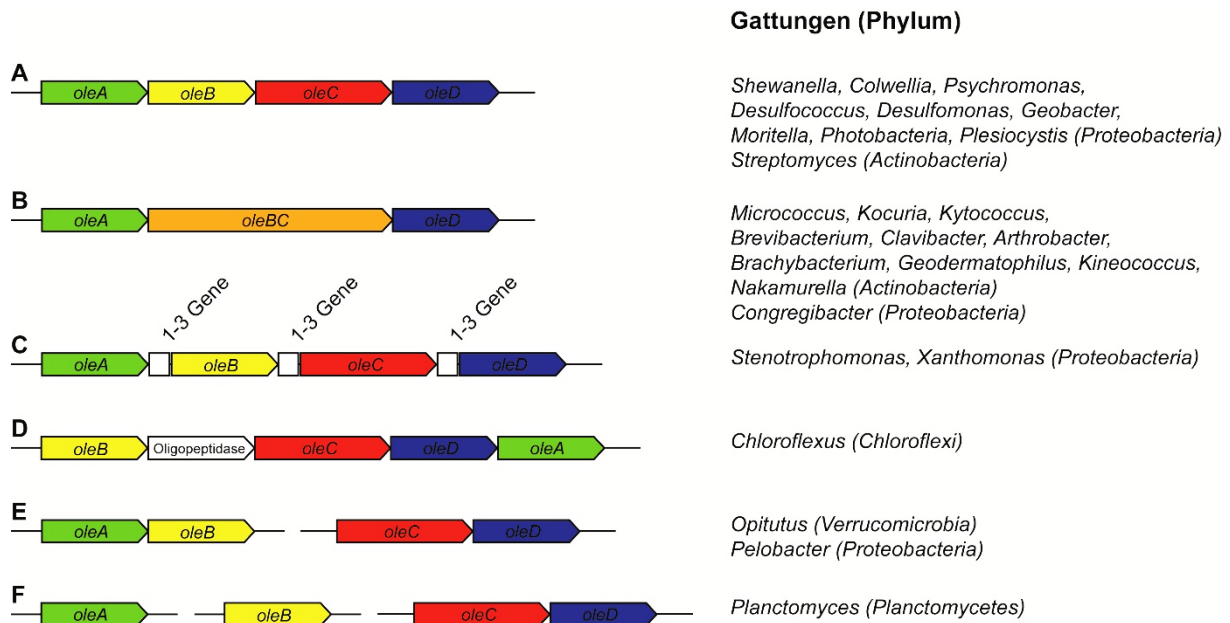


Abbildung 5: Konfigurationen der *oleABCD*-Gencluster in verschiedenen Bakterien. Auf der linken Seite sind die möglichen Konfigurationen dargestellt und auf der rechten Seite sind die bakteriellen Gattungen (Phyla) gelistet in deren Genomen sie gefunden wurden. Bei weißen Genen bzw. Genabschnitten wird keine Beteiligung an der Olefinsynthese angenommen. In (E) und (F) befinden sich *oleAB* bzw. *oleA* und *oleB* in anderen Bereichen des Genoms als *oleCD* [16].

Abbildung 5 zeigt die verschiedenen beobachteten Konfigurationen an *oleABCD*-Clustern in bakteriellen Genomen. Für die *Proteobacteria* kann in der Mehrheit der Fälle ein zusammenhängender Cluster mit co-linearer Anordnung von vier Einzelgenen beobachtet werden. Für *Actinobacteria* kann mehrheitlich ein zusammenhängender Cluster mit co-linearer Anordnung von drei Einzelgenen gefunden werden. Die Gene *oleB* und *oleC* sind hier fusioniert. Die Olefinextraktion liefert für Gram-negative Bakterien, basierend auf ihrer ausgeprägten Fähigkeit zur Synthese ungesättigter Fettsäuren, i.d.R. ein einzelnes Olefin mit einer Kette von 31 Kohlenstoffatomen und neun Doppelbindungen (C_{31:9} Δ^{3,6,9,12,15,19,22,25,28}). Eine diversere Olefinproduktion besitzen die Gram-negativen Gattungen *Xanthomonas* und *Stenotrophomonas* mit Kettenlängen von C₂₈₋₃₁ und 1-3 Doppelbindungen. Die Gram-positiven *Actinobacteria* bilden ein noch breiteres Spektrum von Olefinen mit C_{22-C30} Kettenlängen und *isoiso*-, *isoai*- bzw. *aiai*-Verzweigungen, begründet in der Fähigkeit zur verzweigten Fettsäuresynthese [16], [25], [43]–[45].

2.5. *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus, aus dem Phylum und der Klasse der *Actinobacteria* sowie aus der Ordnung der *Micrococcales* und aus der Familie der *Micrococcaceae*, besitzt den Typstamm *M. luteus* ATCC 4698 (DSM 20030, NCTC 2665). Diese Arbeit benutzt ein Tryptophan-auxotrophes Derivat von *M. luteus* ATCC 27141 (JCM 3347), *M. luteus* trpE16 genannt, als Ausgangsstamm aller Untersuchungen und Manipulationen.

M. luteus bietet sich bei der Untersuchung Gram-positiver Olefinproduktion an, da er neben weiteren Vertretern der *Micrococcales* eine natürliche Olefinsynthese besitzt. Die biochemischen Grundlagen der Olefinproduktion, der *oleABCD*-Gencluster und die exprimierten Proteine wurden durch Beller *et al.* erstmals in *M. luteus* beschrieben [29]. Der *ole*-Gencluster in *M. luteus* trpE16, dem in der vorliegenden Arbeit vorwiegend untersuchten Stamm, ist in Abbildung 6 dargestellt.

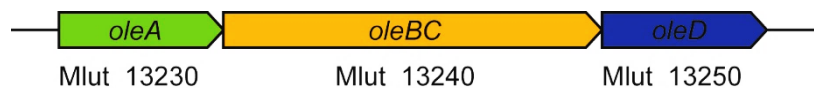


Abbildung 6: Organisation des *oleABCD*-Genclusters in *M. luteus*. Unter den Genen sind die jeweiligen ORF-Bezeichnungen vermerkt.

Trotz dieser Vorarbeiten wurden bislang keine Versuche unternommen die Olefinsynthese in *M. luteus* in wirtschaftlichem Sinne zu optimieren.

Neben der Synthese langkettiger Monoalkene, die in alle Ausgangsprodukte der Erdöl-Industrie umwandelbar sind, liefert *M. luteus* mit seiner natürlichen Isoprenoid-Synthese weitere industrielle Anwendungsmöglichkeiten [46], [47]. Das Interesse wird bestärkt durch die Berichte über Toleranz hoher Salz- und Metall-Konzentrationen, die eine großtechnische Anwendung vereinfachen [48]–[50].

M. luteus besitzt aufgrund seines mesophilen und aeroben Charakters bei fehlender Sporenbildung eine einfache Handhabung. Erleichtert wird das Arbeiten mit *M. luteus* durch die Kenntnis der Sequenz des nur 2501 kb großen Genoms [51] sowie die gute genetische Zugänglichkeit, aufgrund natürlicher Kompetenz. Weitere praktische Eigenschaften sind die hohe Sensitivität gegenüber Lysozym [52], die den einfachen Aufschluss von *M. luteus* erlaubt und die Sensitivität gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika (Penicillin, Streptomycin, Neomycin, Chloramphenicol u.a.), die Sicherheit beim Umgang mit *M. luteus* und potentielle Marker für genetische Manipulationen bietet [51], [53], [54].

3. Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit soll die Grundlage für die großtechnische Produktion von Olefinen mittlerer Kettenlänge als Ersatz für Dieselkraftstoffe bzw. längerer Kettenlänge als Ersatz für fossile Paraffine durch *M. luteus* ausloten. Dafür sollten die Bedingungen, die Organisation, das Produktspektrum im phylogenetischen Vergleich und die Funktion der natürlichen Olefinsynthese in *M. luteus* untersucht werden. Dies sollte Rückschlüsse auf optimale Kulturbedingungen, extrazelluläre Auslöser, intrazelluläre Regulation und das metabolische Potenzial der Olefinsynthese erlauben. Ein zweites Aufgabenfeld stellte die Optimierung der Substratverfügbarkeit, also des Fettsäure- und Aminosäurestoffwechsels, für die Olefinsynthese in *M. luteus* dar. Dabei sollten gezielte und ungezielte Strategien des metabolischen Engineerings genutzt werden um zum einen limitierende Stoffwechselreaktionen zu identifizieren und in der Folge die absolute Substratmenge für die Olefinsynthese zu maximieren, zum anderen sollten Stellschrauben der Substratstoffwechsel identifiziert werden, die es erlauben das Olefin-Produkt bezüglich Kettenlängen und Verzweigungen, also in seinen physikalischen Eigenschaften, zu manipulieren. Ein weiterer Teil dieser Arbeit zielt auf die Ermittlung der Substratspezifität und des Substratspektrums des OleA-Enzyms sowie der biochemischen Grundlage dafür in *M. luteus* ab. Dazu sollte *in vivo* die Supplementierung von Carbonsäuren und der Austausch von *oleA*-Genen, *in vitro* die Analyse der Aktivität und Struktur exprimierter OleA-Proteine und *in silico* Untersuchungen von OleA-Aminosäure-Sequenzen untersucht werden.

4. Material und Methoden

4.1. Bakterien-Stämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien-Stämme sind in den Tabellen 2-4 zusammengefasst. Die verwendeten Plasmide werden in Tabelle 5 beschrieben.

Tabelle 2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten *Micrococcus luteus*-Stämme. Abkürzungen: Ade⁻, Adenin Auxotrophie; Em^r, Erythromycin-Resistenz; Trp⁻, Tryptophan-Auxotrophie; Kan^r, Kanamycin-Resistenz; Hyg^r, Hygromycin-Resistenz; AcrR, Regulator einer Efflux-Pumpe zur Kontaktinhibition; AraC, Arabinose-Abbau Repressor; ArgP, Regulator des Arginin-/Lysin-Stoffwechsels; ArsR, Arsen-Resistenz-Repressor; AsnC, Regulator des Aminosäure-Stoffwechsels; crp, DNA-Bindungsdomäne von Regulatoren; DeoR, Repressor des DNA-Abbaus; FadR, Regulator des Fettsäurestoffwechsels; FixJ, Regulator der Stickstoff-Fixierung; GntR, Repressor des Gluconsäure-Operons; IciR, Glyoxylat-Zyklus regulierendes Protein; IscR, Regulator der Fe-S-Cluster-Biogenese; KO, Deletion; Lacl, Repressor des Laktose-Abbaus; LexA, Repressor der SOS-Antwort auf DNA-Schäden; LuxR, Aktivator der „Quorum Sensing“-Kontrolle der Lumineszenz in *Vibrio fischeri*; LysR, Lysin-Biosynthese Aktivator; MarR, „Multiple antibiotic resistance“ Regulator; MerR, Quecksilber-Resistenz Regulator; NarL, Regulator der Nitrat/Nitrit-Antwort; NrdR, Repressor von Ribonukleotid Reduktasen; OmpR, „Outer membrane protein“ Regulator; OV, Verstärkte Transkription; Rrf2, Regulator des hmc-Operons in *Desulfovibrio vulgaris*; sdh, Succinat-Dehydrogenase; TetR, Tetracyclin-Repressor.

Stammbezeichnung	Merkmale	Hersteller
<i>M. luteus</i> ATCC 27141-5/-1	Ade ⁻ , Em ^r , Trp ⁻ , pMEC2 ⁺	W. Liebl, <i>et al.</i> (2002) [55]
<i>M. luteus</i> trpE16	Trp ⁻	W. E. Kloos, <i>et al.</i> (1970) [56]
<i>M. luteus</i> trpE16 ope	Trp ⁻ , OV Mlut_13230	Dr. A. Angelov
<i>M. luteus</i> trpE16 ope AFB123	Trp ⁻ , OV Mlut_13230, KO Mlut_19230, OV Mlut_19260 und OV Mlut_05890	M. Übelacker
<i>M. luteus</i> trpE16 ope AFB1234	Trp ⁻ , OV Mlut_13230, KO Mlut_19230, OV Mlut_19260, OV Mlut_05890 und OV Mlut_09300-20	M. Übelacker
<i>M. luteus</i> trpE16 ope AFB12345	Trp ⁻ , OV Mlut_13230, KO Mlut_19230, OV Mlut_19260, OV Mlut_05890, OV Mlut_09300-20 und OV Mlut_06800	M. Übelacker
<i>M. luteus</i> trpE16 ope olex-sdh-2148:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und Austausch des nativen <i>oleA</i> gegen <i>oleA</i> von <i>Micrococcus luteus</i> 2148	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope olex-sdh-20319:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und Austausch des nativen <i>oleA</i> gegen <i>oleA</i> von <i>Kocuria palustris</i> DSM 20319	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope olex-sdh-3352:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und Austausch des nativen <i>oleA</i> gegen <i>oleA</i> von <i>Kocuria sp.</i> 3352	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope olex-sdh-TW93:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und Austausch des nativen <i>oleA</i> gegen <i>oleA</i> von <i>Kytococcus sedentarius</i> TW93	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope P _{up} 14220:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und OV NADH-Kinase	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope P _{up} 09320:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und OV Mlut_09300-20	Dr. A. Angelov
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02440:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Acyl-CoA-Dehydrogenase Kandidat	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02780-90:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Mlut_02780-90	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02820:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Acyl-CoA-Dehydrogenase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Mlut_02880	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ02430:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_02430	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ02440:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_02440 Acyl-CoA-Dehydrogenase	diese Arbeit

Stammbezeichnung	Merkmale	Hersteller
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ02820:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_02820 Acyl-CoA-Dehydrogenase	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ02900:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_02900 Acyl-CoA-Dehydrogenase	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ03070:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_03070 Acyl-CoA-Dehydrogenase	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ06870:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_06870 Acyl-CoA-Dehydrogenase	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ11700:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_11700 Acyl-CoA-Dehydrogenase	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ13180:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_13180	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ17630:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_17630	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ19550:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_19550	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ19560:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_19560 Acyl-CoA-Dehydrogenase	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ20330:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_20330	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ20370:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_20370	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ23170:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Hyg ^r , OV Mlut_13230, KO Mlut_02880 und KO Mlut_23170 Acyl-CoA-Dehydrogenase	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880-90:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Mlut_02880-90	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02900 ΔfadE2	Trp ⁻ , OV Mlut_13230, KO Mlut_02900, KO Mlut_11700 und KO Mlut_19560	M. Übelacker
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02900 ΔfadE2 Δ02880:kan	Trp ⁻ , OV Mlut_13230, KO Mlut_02900, KO Mlut_11700, KO Mlut_19560 und KO Mlut_02880	M. Übelacker
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02900 ΔfadE4	Trp ⁻ , OV Mlut_13230, KO Mlut_02900, KO Mlut_11700, KO Mlut_19560, KO Mlut_03070 und KO Mlut_23170	M. Übelacker
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02900 ΔfadE4 AFB123	Trp ⁻ , OV Mlut_13230, KO Mlut_02900, KO Mlut_11700, KO Mlut_19560, KO Mlut_03070, KO Mlut_23170, KO Mlut_19230, OV Mlut_19260 und OV Mlut_05890	M. Übelacker
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02900 ΔfadE4 AFB1234	Trp ⁻ , OV Mlut_13230, KO Mlut_02900, KO Mlut_11700, KO Mlut_19560, KO Mlut_03070, KO Mlut_23170, KO Mlut_19230, OV Mlut_19260, OV Mlut_05890 und OV Mlut_09300-20	M. Übelacker
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02900 ΔfadE4 AFB12345	Trp ⁻ , OV Mlut_13230, KO Mlut_02900, KO Mlut_11700, KO Mlut_19560, KO Mlut_03070, KO Mlut_23170, KO Mlut_19230, OV Mlut_19260, OV Mlut_05890, OV Mlut_09300-20 und OV Mlut_06800	M. Übelacker
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02900 ΔfadE4 Δ02880:kan	Trp ⁻ , OV Mlut_13230, KO Mlut_02900, KO Mlut_11700, KO Mlut_19560, KO Mlut_03070, KO Mlut_23170 und KO Mlut_02880	M. Übelacker
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02900:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Acyl-CoA-Dehydrogenase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ03070:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Acyl-CoA-Dehydrogenase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ04420:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Mlut_04420	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ06840:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Transkriptions-Regulator der TetR Familie	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ06870:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Acyl-CoA-Dehydrogenase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ07570:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Mlut_07570	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ09760:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Mlut_09760	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ11700:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Acyl-CoA-Oxidase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ19390::bacTE:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und OV Acyl-ACP-Thioesterase aus <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	S. Kessler

Stammbezeichnung	Merkmale	Hersteller
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ19390::cav1:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und Austausch von Mlut_19390 gegen <i>caveolin-1</i> -Gen aus <i>Canis lupus familiaris</i>	S. Kessler
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ19390::closTE:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und Austausch von Mlut_19390 gegen Acyl-ACP-Thioesterase-Gen aus <i>Clostridium thermocellum</i>	S. Kessler
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ19390::cpTE:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und Austausch von Mlut_19390 gegen Acyl-ACP-Thioesterase-Gen aus <i>Cuphea palustris</i>	S. Kessler
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ19390::ucTE:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und Austausch von Mlut_19390 gegen Acyl-ACP-Thioesterase-Gen aus <i>Umbellularia californica</i>	S. Kessler
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ19420:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Mlut_19420	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ19560:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Acyl-CoA-Dehydrogenase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ22190:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Mlut_22190	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ22730:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Mlut_22730	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ23170:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230 und KO Acyl-CoA-Dehydrogenase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 ope:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13230	Dr. A. Angelov
<i>M. luteus</i> trpE16 P _{up} 05890:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Acetyl-CoA-Carboxyltransferase AccAD	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 P _{up} 06800:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_06800	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 P _{up} 13320:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_13320	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 P _{up} 17790-810:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_17810	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 P _{up} 19260:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Acetyl-CoA-/Biotin-Carboxylase AccBC	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 P _{up} 09320:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , OV Mlut_09300-20	Dr. A. Angelov
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ00270:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO nicht charakterisiertes Protein	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ00320:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der AraC Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ00350:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der TetR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ01070:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Fe ²⁺ /Zn ²⁺ Aufnahme regulierendes Protein	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ01360:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der LysR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ01480:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der MarR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02250:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der IclR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02430:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_02430	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02440:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Acyl-CoA-Dehydrogenase Kandidat	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02780-90:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_02780-90	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02820:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Acyl-CoA-Dehydrogenase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02880:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der MarR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02880-90:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_02880-90	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02890:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_02890	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02900:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Acyl-CoA-Dehydrogenase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02970:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Response-Regulator der LuxR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ03060:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der TetR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ03070:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Acyl-CoA-Dehydrogenase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ03350:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Response-Regulator	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ03360:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Histidin-Phosphatase	A. Lichev
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ03520:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der Rrf2 Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ04190:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ04340:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ04420:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_04420	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ05330:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_05330	diese Arbeit

Stammbezeichnung	Merkmale	Hersteller
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ06140:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der MerR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ06800-20:hyg	Trp ⁻ , Hyg ^r , KO Mlut_06800-20	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ06840:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der TetR Familie	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ06870:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Acyl-CoA-Dehydrogenase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ07330:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Repressor der LexA Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ07430:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der MarR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ07570:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_07570	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ07800:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Zn ²⁺ -Aufnahme-Regulator der Fur Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ08730:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der IciR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ09760:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_09760	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ10310:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der TetR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ10370:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der LysR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ11030:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Response-Regulator	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ11480:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der LexA Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ11700:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Acyl-CoA-Oxidase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ11710:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der TetR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ12370:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der DeoR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ13180:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_13180	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ13790:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_13790	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ13840:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der MerR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ13920:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der ArsR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ14110:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Response-Regulator	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ14630:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Histidin-Kinase	A. Lichev
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ15250:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der TetR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ16240:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Histidin-Kinase	A. Lichev
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ16250:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Response-Regulator der LuxR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ17340:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Response-Regulator der LuxR-/Sigma-Faktor der Sigma-70-Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ17360:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ17630:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_17630	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ17820:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der AsnC Familie	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ18240:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der GntR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ18280:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der crp Familie	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ18360:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Response-Regulator der OmpR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ18530:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Response-Regulator der NarL/FixJ Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ18780:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der MerR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19230:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der FadR Familie	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19420:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_19420	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19490:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der TetR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19550:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_19550	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19560:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Acyl-CoA-Dehydrogenase	P. Stier

Stammbezeichnung	Merkmale	Hersteller
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19880:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der FadR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19990:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der GntR Familie	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ20320:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der TetR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ20330:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_20330	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ20370:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_20370	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ20650:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der ArsR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ20720:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der IscR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ20750:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der LysR/ArgP Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ21070:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der MarR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ21850:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Response-Regulator der NarL/FixJ Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ21900:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Response-Regulator der LuxR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ21920:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , Transkriptions-Regulator der AcrR/TetR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22060:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Response-Regulator der OmpR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22190:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_22190	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22310:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der TetR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22460:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der LacI Familie	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22730:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_22730	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22810:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Mlut_22810	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22860:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der MerR Familie	diese Arbeit
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22960:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Transkriptions-Regulator der GntR Familie	P. Hornburg
<i>M. luteus</i> trpE16 Δ23170:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO Acyl-CoA-Dehydrogenase	P. Stier
<i>M. luteus</i> trpE16 Δole:kan	Trp ⁻ , Kan ^r , KO <i>oleABCD</i>	Dr. A. Angelov

Die zur Klonierung der Gibson-Assembly-Konstrukte bei Herstellung der in Tabelle 2 gelisteten Mutanten von *M. luteus* trpE16 verwendeten Primer sind in Tabelle 44 im Anhang gelistet. Die verwendeten Klonierungsstrategien können dem Abschnitt „4.6.9.1. Klonierungsstrategien“ entnommen werden.

Tabelle 3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli*-Stämme. Abkürzungen: Amp^R, Ampicillin-Resistenz; Cam^R, Chloramphenicol-Resistenz; rpf, „resuscitation promoting factor“; Str^R, Streptomycin-Resistenz.

Stammbezeichnung	Merkmale	Herkunft
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>endA1 deoR^r recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> Str ^R λ ⁻	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH10B pET19b- <i>oleA</i> .MAW843	Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pET19b, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>M. luteus</i> MAW843	diese Arbeit
<i>E. coli</i> PYY	F ⁻ <i>endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsLΔacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) cynX::[araC pBAD-redα EM7-redβ Tn5-gam]</i> λ ⁻	Zhang, Y.; et al. (2012) [57]
<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R)	Merck Millipore
<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b:: <i>oleA</i> .11925	Cam ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pET19b, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>Kocuria palustris</i> DSM 11925	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b:: <i>oleA</i> .20319	Cam ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pET19b, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>Kocuria palustris</i> DSM 20319	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b:: <i>oleA</i> .20320	Cam ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pET19b, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>Kocuria palustris</i> DSM 20320	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b:: <i>oleA</i> .2148	Cam ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pET19b, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>M. luteus</i> 2148	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b:: <i>oleA</i> .2228	Cam ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pET19b, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>M. luteus</i> 2228	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b:: <i>oleA</i> .3352	Cam ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pET19b, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>Kocuria</i> 3352	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b:: <i>oleA</i> .MAW843	Cam ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pET19b, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>M. luteus</i> MAW843	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b:: <i>oleA</i> .ML	Cam ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pET19b, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>M. luteus</i> trpE16	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b:: <i>oleA</i> .TW93	Cam ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pET19b, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>Kytococcus sedentarius</i> TW93	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b:: <i>rpf</i>	Cam ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pET19b, darin inseriert Mlut_14360 aus <i>M. luteus</i>	W. Liebl
<i>E. coli</i> Top10	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1</i> λ ⁻	Invitrogen
<i>E. coli</i> Top10 pBAD:: <i>oleA</i> .11925	Str ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pBAD/His A, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>Kocuria palustris</i> DSM 11925	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Top10 pBAD:: <i>oleA</i> .20319	Str ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pBAD/His A, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>Kocuria palustris</i> DSM 20319	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Top10 pBAD:: <i>oleA</i> .20320	Str ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pBAD/His A, darin inseriert <i>oleA</i> aus <i>Kocuria palustris</i> DSM 20320	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Top10 pBAD:: <i>oleA</i> .ML	Str ^R , Amp ^R , transformiert mit Expressionsvektor pBAD/His A, darin inseriert Mlut_14360 aus <i>M. luteus</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL-1 blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'⁺::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i>	Stratagene

Die zur Klonierung der Plasmid-Konstrukte bei Herstellung der in Tabelle 3 gelisteten Plasmid-Transformanten verwendeten Primer sind in Tabelle 45 im Anhang gelistet. Die verwendete Klonierungsstrategie kann dem Abschnitt „4.8.3. Expression von OleA-Proteinen in *E. coli*“ entnommen werden.

Tabelle 4: Liste auf Olefinproduktion untersuchter Bakterien-Stämme abgesehen von *M. luteus trpE16* und seinen Mutanten. * Stammbezeichnung wurde durch 16S rDNA-Sequenzierung bestätigt. Abkürzungen: CCM, "Czech Collection of Microorganisms", Masaryk University, Faculty of Science, Tvrđho, Czech Republic; DBM, "Collection of Yeasts and Industrial Microorganisms", Institute of Chemical Technology, Department of Biochemistry and Microbiology, Technická, Praha, Czech Republic; LMG, "Laboratorium voor Microbiologie" Universiteit Gent; NBRC, "Biological Resource Center", "National Institute of Technology and Evaluation" (NITE), Kazusakamatori, Kisarazu-shi, Chiba Pref., Japan; NCDO, "National Collection of Food Bacteria"; WS, Weihenstephaner Mikroorganismen-Sammlung.

Stammbezeichnung	Datenbank-Nr./Synonyme	Herkunft (Stamm-Nummer)
<i>Arthrobacter agilis</i>	CCM 1744, <i>Micrococcus agilis</i> (basonym)	Stammsammlung W. Liebl
<i>Arthrobacter agilis</i> *	<i>Micrococcus agilis</i> (basonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (614)
<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	LMG 3814, ATCC 13752	Stammsammlung K. H. Schleifer (454)
<i>Arthrobacter aurescens</i> (2)	DSM 20116, LMG 3815	Stammsammlung K. H. Schleifer (84/487)
<i>Arthrobacter citreus</i> (2)	LMG 16338, DSM 20133	Stammsammlung K. H. Schleifer (447/256)
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> (2)	LMG 3819, DSM 20117	Stammsammlung K. H. Schleifer (85/440)
<i>Arthrobacter globiformus</i>	DSM 20124, ATCC 8010	Stammsammlung K. H. Schleifer (87)
<i>Arthrobacter oxydans</i> (2)	LMG 3816, DSM 20119	Stammsammlung K. H. Schleifer (91/486)
<i>Arthrobacter pascens</i>	LMG 16255, DSM 20545	Stammsammlung K. H. Schleifer (444)
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	LMG 16679, DSM 20136	Stammsammlung K. H. Schleifer (522)
<i>Arthrobacter sp.</i> *	<i>Filibacter limicola</i> (Bezeichnung in Sammlung)	Stammsammlung K. H. Schleifer (424)
<i>Arthrobacter sulfureus</i>	LMG 16694, DSM 20167	Stammsammlung K. H. Schleifer (523)
<i>Arthrobacter uratoxydans</i>	LMG 16220, ATCC 21749	Stammsammlung K. H. Schleifer (461)
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	LMG 3812, DSM 20126	Stammsammlung K. H. Schleifer (441)
<i>Arthrobacter viscosus</i>	ATCC 19584, LMG 16473	Stammsammlung K. H. Schleifer (524)
<i>Brevibacterium casei</i>	ATCC 35513, NCDO 2048	Stammsammlung K. H. Schleifer (491)
<i>Brevibacterium casei</i>	NCDO 2050, WS 2124	Stammsammlung K. H. Schleifer (492)
<i>Brevibacterium defluvium</i>	WS 2163	Stammsammlung K. H. Schleifer (490)
<i>Brevibacterium sp.</i> Ap13	-	Fäkalienprobe, Laguna Aparejos, Argentinien
<i>Clavibacter michiganensis sp. nebraskensis</i>	DSM 7483	DSMZ
<i>Curtobacterium albidum</i>	LMG 8759, <i>Brevibacterium albidum</i> (homotypisches Synonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (465)
<i>Curtobacterium citreum</i>	LMG 8786, <i>Brevibacterium citreum</i> (homotypisches Synonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (457)
<i>Curtobacterium flaccumfaciens pv. betae</i>	LMG 3596, <i>Corynebacterium flaccumfaciens pv. Betae</i> (homotypisches Synonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (485)
<i>Curtobacterium luteum</i>	LMG 8787, <i>Brevibacterium luteum</i> (homotypisches Synonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (460)

Stammbezeichnung	Datenbank-Nr./Synonyme	Herkunft (Stamm-Nummer)
<i>Curtobacterium pusillum</i>	LMG 8788, <i>Brevibacterium pusillum</i> (homotypisches Synonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (449)
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	CCM 2140, DSM 20448, <i>M. nishinomiyaensis</i> (basonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (609)
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> SM22	ATCC 29093, DSM 20448, <i>M. nishinomiyaensis</i> (basonym)	Stammsammlung W. Liebl
<i>Dermacoccus</i> sp. blue KL114	<i>M. or blue</i> (Bezeichnung in Sammlung)	Stammsammlung K. H. Schleifer (606)
<i>Glutamicibacter nicotinae</i> (2)	DSM 20123, ATCC 15236, <i>Arthrobacter nicotinae</i> (basonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (451/86)
<i>Glutamicibacter protophormiae</i>	LMG 16324, DSM 20168, <i>Arthrobacter protophormiae</i> (basonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (467)
<i>Glutamicibacter uratoxydans</i>	LMG 16220, ATCC 21749, <i>Arthrobacter protophormiae</i> (basonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (461)
<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925	CCM 4949, NBRC 16318	DSMZ
<i>Kocuria palustris</i> DSM 20319 *	DBM 385, <i>Micrococcus varians</i>	DSMZ
<i>Kocuria palustris</i> DSM 20320 *	KH 113, <i>Micrococcus varians</i>	DSMZ
<i>Kocuria rosea</i>	ATCC 186, NCTC 7523, <i>Micrococcus roseus</i> (basonym)	Stammsammlung W. Liebl
<i>Kocuria rosea</i> *	ATCC 186, NCTC 7523, <i>Micrococcus roseus</i> (basonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (615)
<i>Kocuria</i> sp. 3312 *	-	Haut/Nagel/Schleimhaut, Klinik für Dermatologie und Allergologie, TUM, Dr. Köberle
<i>Kocuria</i> sp. 3352 *	-	Haut/Nagel/Schleimhaut, Klinik für Dermatologie und Allergologie, TUM, Dr. Köberle
<i>Kocuria</i> sp. MAW846M	<i>M. varians</i> (Bezeichnung in Sammlung)	Stammsammlung W. Liebl
<i>Kytococcus sedentarius</i> TW93	ATCC 14392, DSM 20547, <i>Micrococcus sedentarius</i> (basonym)	Stammsammlung W. Liebl
<i>M. luteus</i> ATCC 27141	JCM 3347	Stammsammlung W. Liebl
<i>M. aurantiacus</i>	ATCC 11731	Stammsammlung W. Liebl
<i>M. luteus</i> A31658	-	Stammsammlung W. Liebl
<i>Kocuria</i> sp. AT3343 *	<i>M. luteus</i> AT3343 (Bezeichnung in Sammlung)	Stammsammlung W. Liebl
<i>M. luteus</i> ATCC 15800	ML 53-40	Stammsammlung W. Liebl
<i>M. luteus</i> CCM 1339	-	Stammsammlung W. Liebl
<i>M. luteus</i> DAWN	-	Stammsammlung W. Liebl
<i>M. luteus</i> DSM 20030	ATCC 4698, CCM 169	Stammsammlung W. Liebl / Stammsammlung K. H. Schleifer (600)
<i>M. luteus</i> JW6	-	Stammsammlung W. Liebl
<i>M. luteus</i> MAW843	-	Stammsammlung W. Liebl
<i>M. luteus</i> MAW845M	-	Stammsammlung W. Liebl
<i>M. luteus</i> VM3	-	Stammsammlung W. Liebl
<i>M. lylae</i> TW226	ATCC 27566, DSM 20315	Stammsammlung W. Liebl
<i>Microbacterium imperiale</i>	WS 1959, <i>Brevibacterium imperiale</i> (basonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (489)
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 20030, ATCC 4698	Stammsammlung K. H. Schleifer (600)
<i>Micrococcus</i> sp. 1306 *	-	Haut/Nagel/Schleimhaut, Klinik für Dermatologie und Allergologie, TUM, Dr. Köberle
<i>Micrococcus</i> sp. 2105 *	-	Haut/Nagel/Schleimhaut, Klinik für Dermatologie und Allergologie, TUM, Dr. Köberle

Stammbezeichnung	Datenbank-Nr./Synonyme	Herkunft (Stamm-Nummer)
<i>Micrococcus sp.</i> 2148 *	-	Haut/Nagel/Schleimhaut, Klinik für Dermatologie und Allergologie, TUM, Dr. Köberle
<i>Micrococcus sp.</i> 2181 *	-	Haut/Nagel/Schleimhaut, Klinik für Dermatologie und Allergologie, TUM, Dr. Köberle
<i>Micrococcus sp.</i> 2228 *	-	Haut/Nagel/Schleimhaut, Klinik für Dermatologie und Allergologie, TUM, Dr. Köberle
<i>Micrococcus sp.</i> 2525 *	-	Haut/Nagel/Schleimhaut, Klinik für Dermatologie und Allergologie, TUM, Dr. Köberle
<i>Micrococcus sp.</i> 2559 *	-	Haut/Nagel/Schleimhaut, Klinik für Dermatologie und Allergologie, TUM, Dr. Köberle
<i>Micrococcus sp.</i> 3185 *	-	Haut/Nagel/Schleimhaut, Klinik für Dermatologie und Allergologie, TUM, Dr. Köberle
<i>Micrococcus sp.</i> 69	-	Dr. Julián Dib, Kristallprobe, Diamante Lake, Argentinien
<i>Micrococcus sp.</i> 70	-	Dr. Julián Dib, Kristallprobe, Diamante Lake, Argentinien
<i>Micrococcus sp.</i> 84	-	Dr. Julián Dib, Sedimentprobe, Socompa Lake, Argentinien
<i>Micrococcus sp.</i> A1	-	Dr. Julián Dib, Wasserprobe, Laugna Azul, Argentinien
<i>Micrococcus sp.</i> A7	-	Dr. Julián Dib, Wasserprobe, Laugna Azul, Argentinien
<i>Micrococcus sp.</i> D12	-	Dr. Julián Dib, Sedimentprobe, Laguna Diamante, Argentinien
<i>Micrococcus sp.</i> H5	-	Dr. Julián Dib, Wasserprobe, Laguna Huaca Huasi, Argentinien
<i>Micrococcus sp.</i> LCA5	-	Dr. Julián Dib, Wasserprobe, Salinas Grandes, Argentinien
<i>Micrococcus sp.</i> V7	-	Dr. Julián Dib, Wasserprobe, Laguna Vilama, Argentinien
<i>Ornithinococcus sp.</i> D40	-	Dr. Julián Dib, Argentinien
<i>Paenarthrobacter illicis</i> (2)	DSM 20138, LMG 3659, <i>Arthrobacter illicis</i> , <i>Corynebacterium illicis</i> (basonym)	Stammsammlung K. H. Schleifer (469/90)
<i>Pseudarthrobacter chlorophenicus</i>	DSM 12829	DSMZ
<i>Rothia sp.</i> *	DSM 20321, ATCC 27572, <i>Micrococcus kristinae</i> (Bezeichnung in Sammlung)	Stammsammlung W. Liebl

Tabelle 5: Liste verwendeter Plasmide.

Bezeichnung	Größe/ Modifikation	Referenz/ Verwendungszweck
pBAD/Myc-His A	4100 bp/ -	Novagen/ Insertion von <i>oleA</i> -Genen zur Expression in <i>E. coli</i> Top10, Negativ-Kontrolle bei Expression von OleA-Proteinen in <i>E.coli</i> Top10
pBAD:: <i>oleA</i> .11925	5098 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>Kocuria palustris</i> DSM 11925	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 in <i>E. coli</i> Top10
pBAD:: <i>oleA</i> .20319	5098 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>Kocuria palustris</i> DSM 20319	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>Kocuria palustris</i> DSM 20319 in <i>E. coli</i> Top10
pBAD:: <i>oleA</i> .20320	5098 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>Kocuria palustris</i> DSM 20320	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>Kocuria palustris</i> DSM 20320 in <i>E. coli</i> Top10
pBAD:: <i>oleA</i> .ML	5098 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>M. luteus</i>	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>M. luteus</i> in <i>E. coli</i> Top10
pET19b:: <i>oleA</i> .11925	6753 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>Kocuria palustris</i> DSM 11925	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 in <i>E. coli</i> Rosetta 2 oder <i>E. coli</i> DH10B
pET19b:: <i>oleA</i> .20319	6755 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>Kocuria palustris</i> DSM 20319	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>Kocuria palustris</i> DSM 20319 in <i>E. coli</i> Rosetta 2 oder <i>E. coli</i> DH10B
pET19b:: <i>oleA</i> .20320	6754 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>Kocuria palustris</i> DSM 20320	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>Kocuria palustris</i> DSM 20320 in <i>E. coli</i> Rosetta 2 oder <i>E. coli</i> DH10B
pET19b:: <i>oleA</i> .2148	6739 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>Micrococcus sp.</i> 2148	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>Micrococcus sp.</i> 2148 in <i>E. coli</i> Rosetta 2 oder <i>E. coli</i> DH10B
pET19b:: <i>oleA</i> .3352	6747 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>Kocuria sp.</i> 3352	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>Kocuria sp.</i> 3352 in <i>E. coli</i> Rosetta 2 oder <i>E. coli</i> DH10B
pET19b:: <i>oleA</i> .MAW843	6744 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>M. luteus</i> MAW843	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>M. luteus</i> MAW843 in <i>E. coli</i> Rosetta 2 oder <i>E. coli</i> DH10B
pET19b:: <i>oleA</i> .ML	6733 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>M. luteus</i>	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>M. luteus</i> in <i>E. coli</i> Rosetta 2 oder <i>E. coli</i> DH10B
pET19b:: <i>oleA</i> .TW93	6767 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>Kytococcus sedentarius</i> TW93	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>Kytococcus sedentarius</i> TW93 in <i>E. coli</i> Rosetta 2 oder <i>E. coli</i> DH10B
pET19b:: <i>rpf</i>	6263 bp/ Insertion der verkürzten Gensequenz des <i>rpf</i> -Faktors von <i>M. luteus</i>	W. Liebl/ Expression des <i>rpf</i> -Faktors von <i>M. luteus</i> in <i>E. coli</i> Rosetta 2 oder <i>E.coli</i> DH10B, Insertion von <i>oleA</i> -Genen zur Expression in <i>E. coli</i> Rosetta 2 oder <i>E. coli</i> DH10B, Negativ-Kontrolle bei Expression von OleA-Proteinen in <i>E.coli</i> Rosetta 2 oder <i>E. coli</i> DH10B
pET19b:: <i>oleA</i> .2228	6744 bp/ Insertion der Gensequenz des OleA Proteins von <i>Micrococcus sp.</i> 2228	diese Arbeit/ Expression des OleA Proteins von <i>Micrococcus sp.</i> 2228 in <i>E. coli</i> Rosetta 2 oder <i>E. coli</i> DH10B

Bezeichnung	Größe/ Modifikation	Referenz/ Verwendungszweck
pKOS6b	6689 bp/ -	D. Kostner, <i>et al.</i> (2013) [58]/ Herstellung markerloser Mutationen in <i>M. luteus</i>
pMKO-1	6794 bp/ -	A. Angelov, <i>et al.</i> (2013) [59]/ Herstellung markerloser Mutationen in <i>M. luteus</i>
pSMT3-M	5708 bp/ -	Addgene/ Template bei Amplifikation der Hygromycin-Kassette
pWLTK6	4515 bp/ -	W. Liebl, <i>et al.</i> (2002) [55]/ Template bei Amplifikation der Kanamycin-Kassette

4.2. Medien

„Lysogeny Broth“ (LB) -Medium [60]

Das Medium wurde sowohl zur Anzucht von *M. luteus*, dessen Mutanten und allen weiteren auf Olefinproduktion untersuchten Stämmen sowie von *Escherichia coli*-Stämmen verwendet.

Tabelle 6: Herstellung von LB-Medium.

Inhaltsstoffe	Menge [g/L]
Trypton	10
Hefe-Extrakt	5
NaCl	5
auf pH 7 einstellen	
ddH ₂ O	auf 1 L auffüllen
Autoklavieren	

Zur Herstellung von festem Medium wurden 16 g Agar pro Liter Medium vor dem Autoklavieren zugegeben.

Modifiziertes synthetisches Medium nach Naylor und Wolin (Naylor-Medium) [61]

Das Medium wurde ausschließlich zur Anzucht von *M. luteus* und dessen Mutanten verwendet. Im Vergleich zum Original-Medium von Naylor und Wolin enthält das hier genutzte Medium die fünffache Menge NH_4Cl . Die hitzeempfindlichen Medienbestandteile Glukose, L-Trp und Biotin wurden steril filtriert ($0,2\ \mu\text{m}$) und nach dem Autoklavieren zugegeben.

Tabelle 7: Herstellung von Naylor-Medium.

Inhaltsstoffe	Stammlösung [g/L]	Volumen [ml] pro L
K_2HPO_4	100,0	20,0
NH_4Cl	100,0	50,0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	25,0	4,0
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,0	
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,5	
Na-Glutamat $\times \text{H}_2\text{O}$	100,0	100,0
Demineralisiertes H_2O	-	auf 930,0 ml auffüllen
auf pH 7 einstellen		
Autoklavieren		
Biotin (steril)	1,0	10,0
L-Trp (steril)	10,0	10,0
Glukose (steril)	140,0	50,0

Zur Herstellung von festem Medium wurden 16 g Agar pro Liter Medium vor dem Autoklavieren zugegeben.

4.3. Pufferlösungen

Tabelle 8: Zusammensetzung der in den folgenden Methoden verwendeten Pufferlösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
1 x LEW Puffer	7,8 g NaH_2PO_4 , 17,5 g NaCl , auf pH 8 einstellen, auf 1 L mit demineralisiertem H_2O auffüllen
50 x TAE-Puffer	242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 37,2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$, auf pH 8,5 mit HCl-Lösung einstellen, auf 1 L mit ddH_2O auffüllen
1 M Phosphat-Puffer pH 7,4-8	1 ml 1 M KH_2PO_4 vorlegen, mit 1 M Na_2HPO_4 auf pH 7,4-8 einstellen
1 M Tris-Puffer pH 6,8-8	121,2 g Tris, 174 g NaCl , mit HCl-Lösung auf pH 6,8-8 einstellen, mit demineralisiertem H_2O auf 1 L auffüllen

Bezeichnung	Zusammensetzung
10 × SDS-Laufpuffer	30,2 g Tris, 10 g SDS, 144 g Glycin, auf pH 8,4 mit HCl-Lösung einstellen, auf 1 L mit demineralisiertem H ₂ O auffüllen
4 × Protein-Beladungsfarbstoff	6,6 ml 0,5 M Tris-Puffer pH 6,8, 7,5 ml Glycerol, 12 ml 10 % SDS, 0,5 ml 2 % Bromphenol-Blau, auf 25 ml mit ddH ₂ O auffüllen
Coomassie-Färbelösung	250 ml Isopropanol, 100 ml Eisessig, 0,5 g Coomassie-Blau, auf pH 8,4 einstellen, auf 1 L mit demineralisiertem H ₂ O auffüllen
DTNB-Reaktionspuffer	10 ml 1 M Posphat-Puffer pH 8, 1 ml 0,5 M EDTA, auf 100 ml mit demineralisiertem H ₂ O auffüllen
ISO-Puffer (5×)	500 µl 1 M Tris-Puffer pH 7,5, 250 mg PEG-8000, je 10 µl 100 mM dATP/dTTP/dCTP/dGTP, 100 µl 50 mM NAD ⁺ , 25 µl 2 M MgCl ₂ , 50 µl 1 M DTT, mit demineralisiertem H ₂ O auf 1 ml auffüllen
SDS-Sammelgelpuffer	61 g Tris, 4 g SDS, auf pH 6,8 mit HCl-Lösung einstellen, auf 1 L mit demineralisiertem H ₂ O auffüllen
SDS-Trenngelpuffer	182 g Tris, 4 g SDS, auf pH 8,8 mit HCl-Lösung einstellen, auf 1 L mit demineralisiertem H ₂ O auffüllen
SOB Lösung	5 g Hefeextrakt, 20 g Trypton, 0,58 g NaCl, 0,19 g KCl, 0,95 g MgCl ₂ , 1,2 g MgSO ₄ , auf pH 7 einstellen, auf 1 L mit demineralisiertem H ₂ O auffüllen
Solution II	128,00 µl demineralisiertes H ₂ O, 16 µl 2 M NaOH, dann auf Eis, 16 µl 10% SDS
Solution III	78 µl 5 M Kaliumacetat, 14,95 µl Eisessig, 37,05 µl demineralisiertes H ₂ O
TB-Lösung	3,02 g PIPES, 1,67 g CaCl ₂ , 18,64 g KCl, auf pH 6,7 einstellen, auf 1 L mit demineralisiertem H ₂ O auffüllen, nachträglich 6,92 g MnCl ₂ lösen
Transformationspuffer I	1 ml 1 M CaCl ₂ , 10 ml 0,5 M Tris-Puffer pH 7, 89 ml demineralisiertes H ₂ O
Transformationspuffer II	19 ml 1 M CaCl ₂ , 10 ml 0,5 M Tris-Puffer pH 7, 71 ml demineralisiertes H ₂ O

Bezeichnung	Zusammensetzung
Tris-Saccharose-Puffer	24,23 g Tris, 342,3 g Saccharose, 2 ml 0,5 M EDTA pH 8, auf pH 7 einstellen, auf 1 L mit demineralisiertem H ₂ O auffüllen

4.4. Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt wurden Chemikalien der Firmen Merck, Sigma-Aldrich, Applichem, Thermo Scientific, Roth, Serva und VWR in angemessener Qualität verwendet.

4.5. Zellanzucht und Stammhaltung

4.5.1. Anzuchtbedingungen

Die Vermehrung von *Micrococcus*-, *E. coli*- und weiteren Stämmen erfolgte in Erlenmeyerkolben und Reagenzgläsern mit 10-40 % Kulturvolumen. Kulturen von *Micrococcus*-Stämmen wurden standardmäßig bei 30 °C, *E. coli*-Kulturen bei 37 °C inkubiert. Andere Stämme wuchsen individuell bei von DSMZ oder der Literatur empfohlener Temperatur. Das Schütteln erfolgte stets mit 180 rpm. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von Agar-Platten, Hauptkulturen auf Start-OD₆₀₀ von 0,1-0,3 mit Vorkulturen angeimpft.

4.5.2. Bestimmung der Zelldichte

Das Kulturwachstum wurde anhand der optischen Dichte (OD) verfolgt, gemessen mit einem Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Kulturproben wurden dabei so verdünnt, dass die erhaltenen OD₆₀₀-Werte im linearen Bereich des Geräts von 0,1-1 lagen. Abhängig von der Wachstumsphase hat *Micrococcus* eine Tendenz zur Aggregation. Zellaggregate wurden vor Bestimmung der optischen Dichte nur makroskopisch aufgelöst, allerdings verblieben mikroskopische Aggregate, die nur durch Ultraschall komplett aufgelöst werden können und die die gemessenen OD₆₀₀-Werte minimal geringer ausfallen lassen.

Für die wichtigsten *Micrococcus*-Stämme und bestimmte Medien wurde die Zelltrockenmasse (DCW) abhängig von Kulturvolumen und ihrer optischen Dichte bestimmt. Dies erlaubte die Umrechnung der optischen Dichte in Gramm Zelltrockenmasse. Dazu wurden Kultur-Aliquotes mit bestimmtem OD₆₀₀-Wert einzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet bei 120 °C über mehrere Stunden getrocknet und die Zellreste anschließend mit einer Feinwaage ausgewogen.

4.5.3. Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Regelmäßig genutzte Stämme wurden auf LB-Agarplatten mit gegebenenfalls passendem Antibiotikum ausgestrichen und bei 4 °C für bis zu 2 Monate gelagert. Die Langzeitlagerung von Stämmen erfolgte in Form von Glycerin-Suspensionen bei -80 °C. Dazu wurde in Eppendorf-Gefäße mit Schraubverschluss 500 µl steriles 50 % (w/v) Glycerin vorgelegt, 500 µl frisch angewachsene LB-Vorkultur dazugegeben, kurz invertiert und die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Reinheitskontrolle von Stämmen erfolgte durch selektives Ausstreichen bzw. Vereinzelausstriche auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum und Kontrolle einer einheitlichen Kolonieform und -farbe. Genauere Prüfung der Reinheit war durch mikroskopische Betrachtung der Zellmorphologie möglich. Im Falle von Mutanten konnte die Identität durch Amplifikation charakteristischer Abschnitte des Genoms bestätigt werden. Bei Plasmid-Transformanten wurden Plasmide präpariert und einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen.

4.6. Methoden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.6.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren war zum einen spektro-photometrisch mithilfe eines ND-1000 Spektrophotometers der Firma Nanodrop Technologies möglich. Zum anderen war die Quantifizierung durch Auftrennung der DNA- oder RNA-Probe gegen eine Verdünnungsreihe eines DNA- oder RNA-Standards bekannter Konzentration und Vergleich der Banden-Intensitäten möglich.

4.6.2. Analytische und präparative Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA- oder RNA-Fragmenten erfolgte in selbst-hergestellten Gelschlitten in Verbindung mit Spannungsgeneratoren der Firmen BIO-RAD, Hoefer oder Pharmacia. In die Gelschlitten gegossen wurde Agarose mit Konzentrationen von 0,8 % oder 3 % abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente. Das erhärtete Gel wurde mit $1 \times$ TAE-Puffer als Laufpuffer überschichtet. Nukleinsäure-Proben wurden mit entsprechendem Beladungsfarbstoff der Firma Thermo Scientific auf eine einfache Konzentration des Puffers gründlich durchmischt und in die Taschen pipettiert. Eine Spannung von 180 Volt bzw. 100 Volt wurde für 23 min. bzw. 60 min. zur Trennung der Fragmente angelegt. Das Gel wird anschließend in Ethidiumbromid für mindestens drei Minuten gefärbt und in ddH₂O für mindestens drei Minuten entfärbt. Die Nukleinsäuren wurden in einer Geldokumentationskammer der Firma Alpha Innotech oder GE Healthcare sichtbar gemacht.

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde nicht nur analytisch, sondern auch präparativ zur Isolierung spezifischer DNA-Fragmente aus einer Mischung genutzt. Dabei wurden große Probenvolumina von bis zu 100 µl in mehrere Geltaschen pipettiert. Die Proben wurden im Gel maximal aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt. In der Geldokumentationskammer wurde das gewünschte Fragment durch minimale UV-Licht Exposition sichtbar gemacht und mit einem Skalpell möglichst schnell herausgeschnitten.

Das Gelstück wurde mithilfe des „AccuPrep Gel Purification“ Kits von BIONEER und dem entsprechenden Protokoll weiter aufgereinigt.

4.6.3. Präparation genomischer DNA aus *M. luteus*

LB-Vorkultur wurde mit 14000 rpm für 5 min. in ein 2 ml Reaktionsgefäß einzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Restüberstand resuspendiert. Es wurde 50 µl (10 g/L) Lysozym (Thermo Scientific) zugegeben und für bis zu 30 min. unter regelmäßigem Schütteln bei 37 °C (Heizblock) inkubiert. Je 1 µl Proteinase K (Analytik Jena) wurde zu 300 µl 1x TC ("Tissue- and cell-lysis") - Lösung (epicentre) gegeben. 300 µl dieser Mischung wurden zur Lysozym-verdauten Zellsuspension gegeben und gründlich durchmischt. Anschließend wurde für 15 min. bei 65 °C (Heizblock) inkubiert. Alle 5 min. wurde kurz geschüttelt. Das Reaktionsgefäß wurde auf 37 °C abgekühlt. Dann wurde 1 µl (5 µg/µl) RNaseA zugegeben und gründlich gemischt. Mit RNaseA wurde 30 min. bei 37 °C (Heizblock) inkubiert und zwischendurch geschüttelt. Das Reaktionsgefäß kam 3-5 min. auf Eis. Danach wurde 150 µl CTAB (Cetyl-Trimethyl-Ammoniumbromid) Protein Präzipitationsreagenz (Bioanalytic GmbH) zugegeben und sehr gründlich (10 sek.) geschüttelt. Bei 14000 rpm und 4 °C wurden die Zelltrümmer für 20 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 500 µl Isopropanol gegeben und 30-40-mal invertiert. Die DNA wurde bei 14000 rpm und 4 °C für 20 min. pelletiert. Der Isopropanol wurde vorsichtig, aber möglichst vollständig entfernt. Anschließend wurde das DNA-Pellet zweimal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Der Alkohol wurde möglichst vollständig entfernt und das DNA-Pellet für 20 min. getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in 35 µl demineralisiertem H₂O resuspendiert.

4.6.4. Plasmidpräparation aus *E. coli* und *M. luteus*

Dazu genutzt wurde das „AccuPrep Plasmid Mini Extraction“ Kit von BIONEER und das entsprechende Protokoll. Es gab keine Abweichungen vom Protokoll. Das Ergebnis wurde durch Auftrennung eines analytischen Verdaus im Agarose-Gel bestätigt.

4.6.5. Schnellpräparation von Plasmiden aus *M. luteus*

Eine LB-Übernachtskultur wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß für 5 min. bei 13000 rpm und RT einzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100-150 µl 1×TAE-Puffer resuspendiert. Es wurden 1 µl RNase A (5 µg/µl) (Epicentre) und 20 µl Lysozym (100 g/L) (Thermo Scientific) zugegeben und es wurde bei 37 °C (Heizblock) unter regelmäßigem Schütteln bis zur Aufklärung der Zellsuspension inkubiert. Dann wurde die Inkubation noch um 5 min. fortgesetzt. Es folgte die Zugabe von 200 µl Solution II, die zuvor auf Eis gekühlt wurde, und Inkubation für 5 min. auf Eis. Es wurden 150 µl Solution III zugegeben und für 5 min. auf Eis inkubiert. Es wurde für 5 min. bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde zum abgenommenen Überstand 300 µl Isopropanol zugegeben und 30-40-mal invertiert. Bei ausreichender Konzentration fällt nun DNA (Plasmid-DNA, aber auch Reste genomischer DNA) sichtbar in weißen Schleiern aus. Es wurde für 5 min. bei RT inkubiert. Die DNA wurde für 2 min. bei 13000 rpm und RT abzentrifugiert und der Überstand soweit wie möglich entfernt. Das Pellet wurde bei RT und offenem Deckel für 20 min. getrocknet und anschließend in 20 µl demineralisiertem H₂O resuspendiert.

4.6.6. Analytischer und präparativer Plasmidverdau

Verwendet wurden grundsätzlich Puffersysteme und Restriktionsenzyme der Firma Thermo Scientific. Plasmide wurden analytisch zur Bestätigung von Plasmid-Identitäten oder Plasmid-Transformanten verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Nach Möglichkeit wurde ein Restriktionsenzym eingesetzt, das das Plasmid mehrere Male schneidet.

Ein analytischer Restriktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 9: Zusammensetzung eines analytischen Plasmidverdaus.

Komponenten	1-Enzym-Ansatz [μ l]	2-Enzyme-Ansatz [μ l]
Plasmidpräparation	8,0	8,0
10 \times Puffer	1,0	1,0
Enzym 1 (10 U/ μ l)	1,0	0,5
Enzym 2 (10 U/ μ l)	-	0,5
Gesamtvolumen	10,0	10,0

Generell wurden die Ansätze für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Bei Verwendung von zwei Restriktionsenzymen und wenn kein optimaler Puffer für beide Enzyme zur Verfügung stand, wurde das Verhältnis der Enzym-Volumina oder die Pufferkonzentration nach Empfehlung des Herstellers angepasst.

Wenn das geschnittene Plasmid im Anschluss für eine Klonierung benötigt wurde, wurde ein präparativer Restriktionsverdau gewählt:

Tabelle 10: Zusammensetzung eines präparativen Plasmidverdaus.

Komponenten	1-Enzym-Ansatz [μ l]	2-Enzyme-Ansatz [μ l]
Plasmidpräparation	40,0	40,0
10 \times Puffer	5,0	5,0
Enzym 1 (10 U/ μ l)	5,0	2,5
Enzym 2 (10 U/ μ l)	-	2,5
Gesamtvolumen	50,0	50,0

Das geschnittene Plasmid wurde anschließend in einem präparativen Agarosegel aufgereinigt.

4.6.7. (Kolonie-) Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode fand Anwendung zur Produktion von Fragmenten für „Gibson-Assembly“ bei Klonierungen bzw. zur Bestätigung von Mutanten basierend auf präparierter DNA (klassische PCR) oder gepickten Kolonien einer Transformation (Kolonie-PCR). Das Q5 Polymerase-System (NEB) wurde standardmäßig verwendet. Die Reaktion setzt sich pro Ansatz wie folgt zusammen:

Tabelle 11: Zusammensetzung einer PCR-Reaktion pro Ansatz.

Komponente	1 × Ansatz [µl]	1 × Negativkontrolle [µl]
Demineralisiertes H ₂ O	10,75	11,75
Q5 Reaktionspuffer	5,00	5,00
5 × Q5 High GC Enhancer	5,00	5,00
10 mM dNTPs	0,50	0,50
Q5 High Fidelity DNA Polymerase	0,25	0,25
gDNA/Zellsuspension	1,00	-
10 µM Primer 1	1,25	1,25
10 µM Primer 2	1,25	1,25
Gesamtvolumen	25,00	25,00

Das folgende PCR-Programm wurde genutzt:

Tabelle 12: PCR-Programm im Thermocycler.

Phase	Temperatur [°C]	Dauer [sek.]
Initiale Denaturierung	98	30 bzw. 300 (Kolonie)
Denaturierung	98	10
Annealing	57-72	20
Extension	72	30/kb
Finale Extension	72	180
Lagerung nach Abschluss	16	∞

Die PCR-Produkte wurden zur Bestätigung über Gelelektrophorese aufgetrennt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.6.8. Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte von Proteinen, dNTPs, Primern und Puffersubstanzen wurde entweder das „PCR Purification“ Kit von BIONEER oder das „DNA Clean & Concentrator“ Kit von Zymo Research und die entsprechenden Protokolle verwendet. Abweichend vom Protokoll der Kits wurde in demineralisiertes H₂O eluiert.

4.6.9. Klonierung über „Gibson Assembly“

„Gibson Assembly“ ist eine Technik zur gleichzeitigen Verknüpfung von zwei oder mehreren doppelsträngigen DNA (dsDNA) -Fragmenten, die 2009 von Daniel Gibson [62] entwickelt wurde. Sie basiert im Gegensatz zur klassischen Klonierung nicht auf der Spaltung der Fragment-Enden mit Restriktionsenzymen und anschließender Ligation der Bruchstücke, sondern auf der Rekombination homologer Enden zwischen den zu verknüpfenden dsDNA-Fragmenten. Beim Assembly erfolgen drei einzelne Enzymreaktionen. Zunächst baut eine 5´-Exonuklease die 5´-Enden der homologen Enden ab. Es folgt die Anlagerung der überlappenden komplementären Enden. Dann füllt eine DNA-Polymerase die verbleibenden Lücken in beiden Einzelsträngen durch Verlängerung der 3´-Enden. Schließlich werden die verlängerten 3´-Enden durch eine DNA-Ligase mit den restlichen Einzelsträngen verbunden. Alle Enzymreaktionen erfolgen isothermal bei 50 °C („Gibson isothermal assembly“). Da die Exonuklease hitzelabil ist, wird sie im Laufe der Zeit inaktiviert.

Die Reaktionsprodukte wurden ohne weitere Aufreinigung sofort zur Transformation verwendet. Dem „Gibson Assembly“ unterzogen wurden aufgereinigte Produkte einer PCR mit Primern, von denen mindestens einer einen Überhang besitzt, der homolog zum Ende eines anderen PCR-Produkts oder eines aufgeschnittenen Plasmides war.

Das benötigte Enzymgemisch wurde meistens in Form des „Gibson Assembly Master Mixes“ (später „NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix“) von NEB bezogen.

Zu Beginn der Arbeit wurde das Enzymgemisch (NEB Enzyme) auch selbst hergestellt:

Tabelle 13: Zusammensetzung des selbst-hergestellten „Gibson Assembly Master Mixes“.

Komponente	Volumen [μ l]
Taq Ligase (40 U/ μ l)	20,00
Phusion DNA Polymerase (2 U/ μ l)	2,50
T5 Exonuklease (1 U/ μ l)	0,84
5 \times ISO Puffer	40,00
H ₂ O	36,66
Gesamtvolumen	100,00

Die Mischung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Bei der Kombination linearer PCR-Produkte wurden alle Fragmente in äquimolaren Verhältnissen eingesetzt. Bei Insertion von Fragmenten in ein aufgeschnittenes Plasmid wurde den Empfehlungen von NEB gefolgt. Die Fragment- und die Enzymmischung wurden im Verhältnis 1:1 kombiniert. Der Reaktionsansatz wurde zwei Stunden bei 50 °C inkubiert. Zur Kontrolle der Reaktion wurden Proben vor und nach der Inkubation im Agarosegel aufgetrennt. Das Reaktionsprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung zur Transformation in *M. luteus* oder *E. coli* verwendet.

Eine dritte Alternative zum kommerziellen oder selbst hergestellten „Gibson Assembly Master Mix“ stellte die Verwendung eines Zellextraktes des *E. coli* PPY Stammes [57] dar. Dabei wurden die Fragment-Mischung, T4-Ligase Puffer (Thermo Scientific) und Zellextrakt im Verhältnis 8:1:1 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Dabei wurde die im Extrakt enthaltene Exonuklease nicht inaktiviert, deshalb war für jede Charge des Extraktes eine optimale Inkubationsdauer und Verdünnung des Extraktes vorab zu ermitteln. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch schockfrieren in flüssigem Stickstoff oder sofortiges Einfrieren bei -20 °C gestoppt. Das Reaktionsprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung zur Transformation in *M. luteus* oder *E. coli* verwendet.

4.6.9.1. Klonierungsstrategien

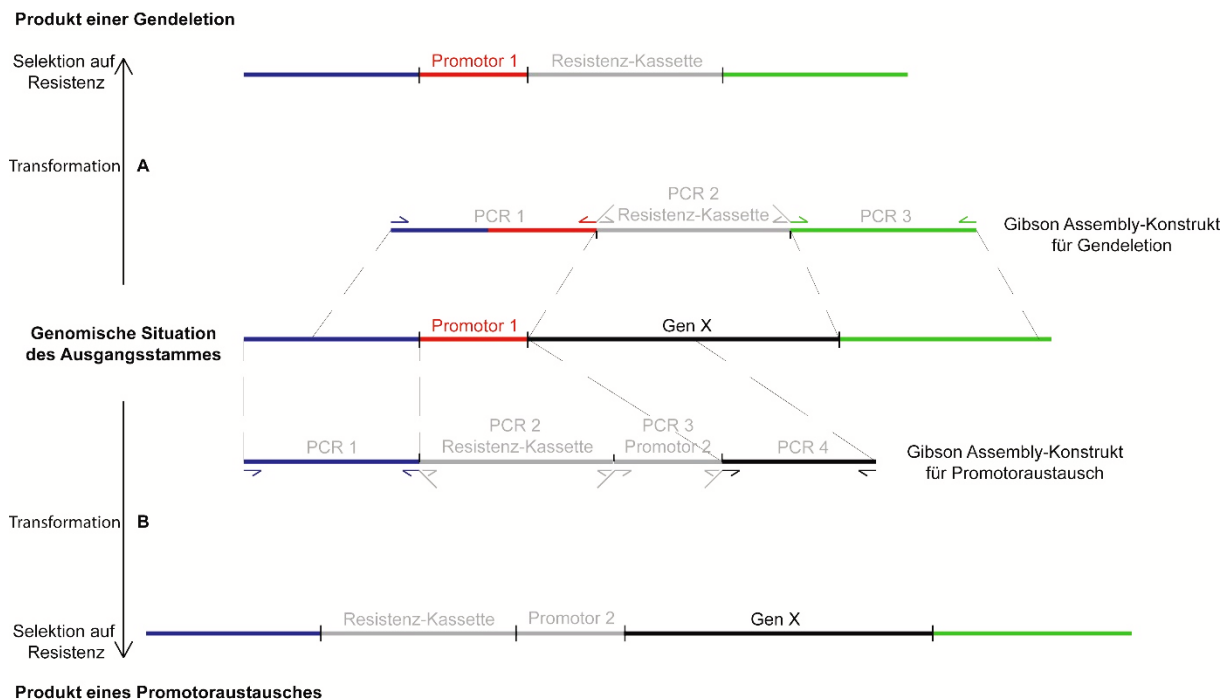


Abbildung 7: Klonierungsstrategie zur Erzeugung von Gendeletionen (A) und von Promotoraustausch-Mutationen (B). Sollte bei Herstellung eines Promotoraustausches der native Promotor (Promotor 1) erhalten werden, so musste PCR 1 diesen nativen Promotor einschließen.

In Abbildung 7 bzw. Abbildung 8 sind die in dieser Arbeit zur Erzeugung von Gendeletionen, Promotor- und Genaustausch- (Austausch von Gen A gegen Gen B) Mutationen ausnahmslos genutzten Klonierungsstrategien gezeigt, die das Einbringen einer dauerhaften Antibiotika-Resistenz einschließen.

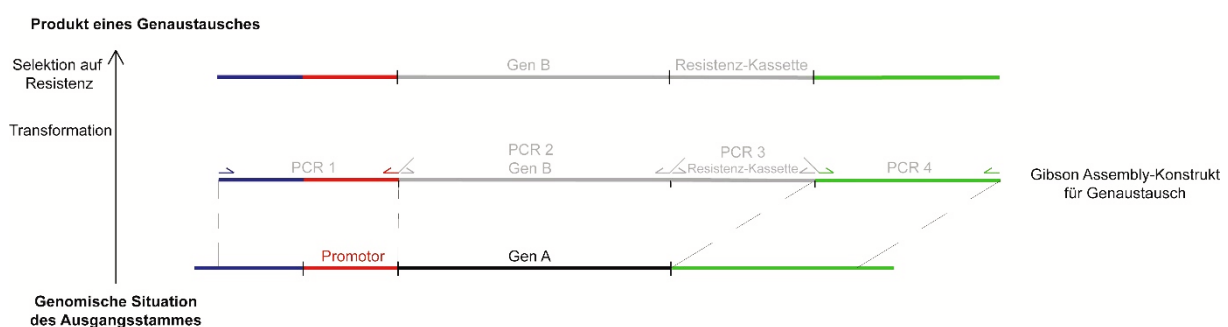


Abbildung 8: Klonierungsstrategie zur Erzeugung von Genaustausch-Mutationen.

Zur Herstellung markerloser Mutanten von *M. luteus* wurde die *codAB* Gegenselektionsmethode von Kostner *et al.* [58] (alternativ: *lacZ*-Gegenselektionsmethode von Angelov *et al.* [59]) verwendet. In Abbildung 9 sind die in dieser Arbeit ausnahmslos genutzten Klonierungsstrategien zur Herstellung markerloser Gendeletionen (Abbildung 9A) und Promotoraustausch-Mutanten (Abbildung 9B) dargestellt.

Dazu wurden zunächst chemisch-kompetente *E. coli* XL-1 blue Zellen mit „pKOS6b-Gibson Assembly“-Ansätzen (alternativ: mit „pMKO-1-Gibson Assembly“-Ansätzen) transformiert und auf Kanamycin selektiert um eine hohe Kopienzahl von pKOS6b-Plasmidkonstrukten (alternativ: von pMKO-1-Plasmidkonstrukten) aufzureinigen. Anschließend wurden natürlich kompetente *M. luteus*-Zellen mit aufgereinigten Plasmiden transformiert und Plasmid-Integranden wiederum auf LB-Agarplatten mit Kanamycin selektiert. Die Gegenselektion gepickter Klone von der Kanamycin-Platte, die das Plasmid wieder verloren haben, erfolgte auf LB-Agarplatten, die mit 500 µg/ml 5-Fluorocytosin (alternativ: mit 500 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-Galaktose) supplementiert wurden. Dabei konnte auch der genomische Ausgangszustand selektiert werden. Daher wurde die Mutation nachträglich durch PCR und Sequenzierung des betreffenden Genomabschnittes bestätigt.

4.6.10. Sequenzierung von PCR-Produkten

Mit der Sequenzierung von PCR-Produkten wurden als externe Dienstleister die Firmen Eurofins Scientific oder GATC Biotech AG beauftragt. Aufgereinigte PCR-Produkte wurden nach Anleitung der Firmen versandt.

4.6.11. Extraktion und weitere Verarbeitung von RNA (Ribonukleinsäuren)

Zur RNA-Extraktion wurde das „ZR Fungal/Bacterial RNA MiniPrep“ Kit (Zymo Research) und das entsprechende Protokoll verwendet. Vom Protokoll abweichend wurden die Zellen nicht durch „bead beating“ aufgeschlossen, sondern durch Lysozym-Behandlung (Thermo Scientific). Dadurch konnte die Fragmentierung längerer mRNA vermieden werden, was bei RNA-Sequenzierung entscheidend ist.

Für RNA-Sequenzierung wurde im Anschluss rRNA mithilfe des „Ribo-Zero rRNA Removal (Bacteria)“ Kits (illumina) aus der Probe entfernt. Weitere Aufreinigung erfolgte durch das „RNA Clean & Concentrator“ Kit (Zymo Research). Die RNA-Sequenzierung wurde extern durch die GATC Biotech AG durchgeführt.

Für qPCR wurde die RNA in cDNA umgewandelt. Dazu wurde das „iScript Select cDNA Synthesis“ Kit (BIO-RAD Laboratories) verwendet. Es wurde pro Reaktion 1 µg RNA eingesetzt.

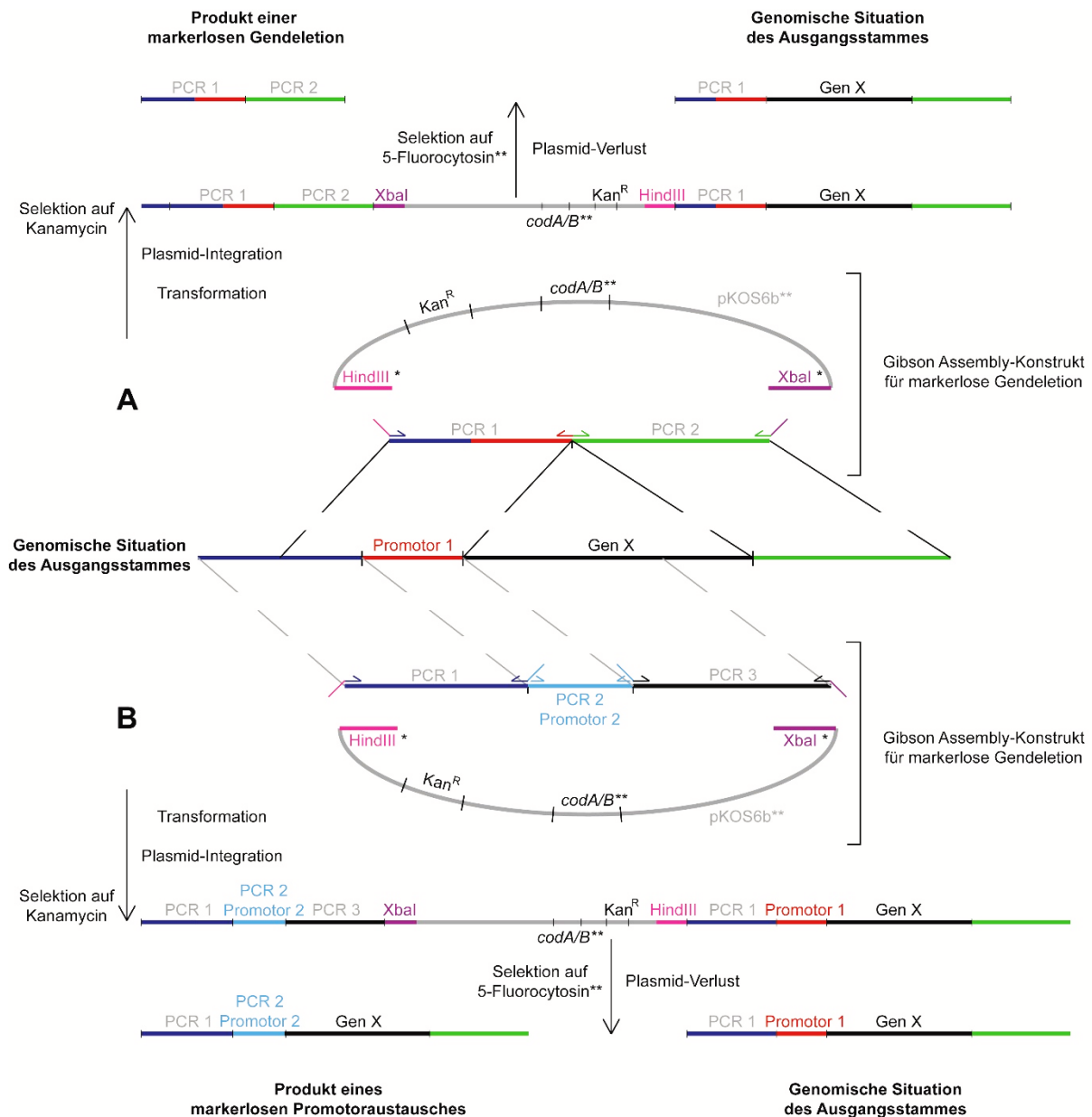


Abbildung 9: Klonierungsstrategie zur Erzeugung markerloser Gendeletionen (A) und Promotoraustausch-Mutationen (B). Sollte bei Herstellung eines Promotoraustausches der native Promotor (Promotor 1) erhalten werden, so musste PCR 1 diesen nativen Promotor einschließen. *Homologe Überhänge zu den Schnittstellen der Restriktionsenzyme schließen 5'-3' Überhänge, die durch die Enzyme HindIII und XbaI produziert werden, aus. **Alternativ zu pKOS6b mit *codA/B*-Genen zur Gegenselektion auf 500 µg/ml 5-Fluorocytosin (D. Kostner, *et al.* (2013) [58]) wurde pMKO-1 mit *lacZ*-Gen zur Gegenselektion auf 500 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-Galaktose (A. Angelov, *et al.* (2013) [59]) verwendet.

4.6.12. qPCR (Quantitative PCR)

Aus gewonnener cDNA wurde durch ausgewählte PCR-Primer in einer klassischen PCR-Reaktion ein ca. 100 bp-Fragment eines ausgewählten Gens amplifiziert. Das Farbstoffsystem, das sich dabei proportional zur Menge an PCR-Produkt in die DNA einlagerte und das zu messende Fluoreszenzsignal erzeugte, war das „SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix“-System von BIO-RAD Laboratories.

Zur Etablierung eines internen Standards und um relative Quantifizierung zu ermöglichen wurde ein zweites Primer-Paar (q0812) auf die gleichen Proben angewandt, das innerhalb des Gens der F_0F_1 ATP-Synthase-Untereinheit A (Mlut_08120) bindet. Dieses Gen ist in Proben zu vergleichender Stämme oder Mutanten von *Micrococcus* gleichermaßen exprimiert.

Die Auswertung der relativen Quantifizierung der Transkripte eines ausgewählten Gens in mehreren parallel gemessenen Proben erfolgte über die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode [63].

Die Reaktion setzte sich pro Ansatz wie folgt zusammen:

Tabelle 14: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes.

Komponente	1 × Ansatz [μl]	1 × Negativkontrolle [μl]
SYBR Green Supermix	6,25	6,25
10 μM Primer 1	0,25	0,25
10 μM Primer 2	0,25	0,25
Demineralisiertes H ₂ O	0,75	5,75
cDNA-Produkt (1:5)	5,00	-
Gesamtvolumen	12,50	12,50

Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler von BIO-RAD mit nachfolgendem Programm:

Tabelle 15: Thermocycler-Programm bei einer qPCR-Reaktion.

Phase	Rate [°C/sek.]	Temperatur [°C]	Dauer [sek.]
Initiale Denaturierung	-	95	600
Denaturierung	-	15	15
Annealing	40 ×	30	30
Extension		30	30
Zwischenschritt	-	55	60
Schmelzkurve	-	65	5
	Start	-	-
	Ende	1	95

4.7. Transformationstechniken

4.7.1. Transformation von *M. luteus*

M. luteus ist in der Lage natürlich kompetent zu werden, d.h. wird das Bakterium in einen Hungerzustand gezwungen, nimmt es DNA aus der Umgebung bereitwillig ohne weitere physikalische Einwirkungen wie Hitze oder elektrische Spannung auf.

Eine in 0,8 % NaCl gewaschene LB-Vorkultur wurde in 20 ml Naylor-Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane auf Start-OD₆₀₀ 0,1-0,2 frisch angeimpft. Die Inkubation erfolgt bei 30 °C und 180 rpm. Innerhalb von 16-18 h sollte die Kultur einen OD₆₀₀ von 0,8-1,2 erreichen. Dann wurden 1-1,5 ml Zellkultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 13000 rpm für 2 min. bei 4 °C einzentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde so komplett wie möglich verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 µl Transformationspuffer I mit der Pipette resuspendiert. Anschließend wurden 500 µl Transformationspuffer II zugegeben und durch Invertieren vermischt. Die Zellsuspension wurde in zweimal 500 µl Aliquotes aufgeteilt. Zu einem Aliquot wurden 1-5 µl aufgereinigtes Plasmid oder 10-20 µl „Gibson Assembly“-Produkt gegeben. Das andere Aliquot diente als Negativkontrolle.

Die Ansätze wurden 30 min. bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen auf LB-Agarplatten mit passendem Antibiotikum mit Glasperlen ausplattiert. Die Platten werden für mehrere Tage bei 30 °C inkubiert.

Sofern bei der Zugabe von Transformationspuffer I oder II Zellaggregation auftrat, d.h. die Zellen fallen in Klumpen aus, wurde das Zellaliquot erneut genommen und erneut in frischen Transformationspuffern resuspendiert. Alternativ wurden Zellaggregate durch 30-60 sek. Ultraschall-Behandlung aufgelöst. Zellaggregate hemmen die Aufnahme von DNA nachhaltig und ihre Abwesenheit bzw. Auflösung ist zwingend erforderlich.

4.7.2. Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Zunächst wurden pro Transformationsansatz (inklusive Negativ-Kontrolle) 1,4 ml LB-Medium in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 30 µl einer frischen LB-Übernachtskultur angeimpft und für 2-3 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Im Folgenden wurde nach Möglichkeit auf Eis und in einer gekühlten Zentrifuge gearbeitet. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem demineralisiertem H₂O gewaschen und anschließend in 20-30 µl Restüberstand mit der Pipette resuspendiert. Zur Zellsuspension wurden 1-2 µl DNA gegeben. Die Zell-DNA-Mischung wird mit einer Pipette in eine Elektroporationsküvette (VWR) mit einer Spaltbreite von 2 mm überführt und dabei gründlich durchmischt. Die Elektroporation erfolgte mit 200 Ω, 25 µF, 2500 Volt in einem Elektroporationsschlitten und Spannungsgenerator der Firma BIO-RAD. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium in die Küvette gegeben und durch Invertieren gemischt. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 60 min. bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Dann wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit passendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

4.7.3. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

In einem 1 L Erlenmeyerkolben wurden 250 ml SOB („Super optimal broth“) Lösung mit 10-12 großen Kolonien einer LB-Agarplatte angeimpft. Die Kultur wurde bei 19 °C unter starkem Schütteln bis auf OD₆₀₀ = 0,5 inkubiert. Der Erlenmeyerkolben wurde für 10 min. auf Eis gelagert. Dann wurden die Zellen bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min. einzentrifugiert. Die Zellen wurden vorsichtig in 80 ml eiskalter TB („Terrific Broth“) Lösung resuspendiert und 10 min. auf Eis gelagert. Die Zellen wurden erneut bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min. einzentrifugiert. Die Zellen wurden ein letztes Mal in 20 ml TB Lösung und 1,4 ml DMSO (Di-methyl-sulfoxid) resuspendiert. Aliquote von 50-100 µl wurden hergestellt und bei -80 °C gelagert.

4.7.4. Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* durch Hitzeschock

Ein Aliquot chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Dann wurde 1-5 µl DNA zugegeben und durch Schnipsen vermischt. Der Ansatz wurde für 30 min. unbewegt auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Anschluss für 60 sek. in einem 42 °C warmen Wasserbad.

Danach wurde die Zellsuspension für 5 min. auf Eis inkubiert. Es wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und für 60 min. bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit passendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

4.8. Methoden für das Arbeiten mit Proteinen

4.8.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte während oder nach Abschluss der Expression und Aufreinigung von OleA-Proteinen.

Bradford-Assay [64]

Dazu wurden 5 µl bzw. 10 µl einer passend verdünnten Proteinlösung mit 1 ml 1 × Bradford-Reagenz (Serva) versetzt und 5 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Mischung in einer transparenten Plastik-Küvette in einem Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) bei 595 nm gemessen. Reines Bradford-Reagenz wird als Blank verwendet. Die zur Abschätzung der Proteinkonzentration verwendete Standardkurve basierte auf den Absorptionswerten einer BSA-Verdünnungsreihe von 0-40 µg/Küvette.

Quarzküvette

Dazu wurden 100 µl einer passend mit 20 mM Tris-Puffer pH 8 verdünnten Proteinlösung in eine Quarzküvette pipettiert. Anschließend wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm in einem Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) gemessen. Als Blank diente reiner Tris-Puffer. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes. Der Extinktionskoeffizient jedes OleA-Proteins wurde, basierend auf dessen Aminosäuresequenz (inklusive His-Tag), mithilfe des „ExPASy-ProtParam tools“ berechnet.

4.8.2. SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese

Dafür verwendet wurde ein Mini-PROTEAN II Gelkammersystem von BIO-RAD mit 7,3 cm × 10,2 cm Glasplatten und 0,75 cm Abstandshaltern in Kombination mit einem Spannungsgenerator der Firma BIO-RAD.

Die verwendeten Trenn- und Sammelgele setzten sich für 4 Gele wie folgt zusammen:

Tabelle 16: Herstellung von Trenn- und Sammelgelen für SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese.

Komponenten	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
Trenngelpuffer	5,00	-
Sammelgelpuffer	-	2,40
Acrylamid 29:1 (40 %)	5,00	1,25
Demineralisiertes H ₂ O	10,00	6,35
10 % APS	0,12	0,08
TEMED	0,06	0,04
Gesamtvolumen	20,18	10,12

Das 10 %ige APS (Ammoniumpersulfat), das die Polymerisation startet und das TEMED (Tetramethylethylendiamin), das den Prozess beschleunigt, wurden zuletzt zugegeben, gut gemischt und die Gele zügig gegossen. Die Gelabschnitte wurden nach dem jeweiligen Gießen mit Isopropanol überschichtet um eine glatte Geloberfläche zu gewährleisten.

Bei Auftrennung von Proteinproben wurde 4 × Protein-Beladungsfarbstoff mit demineralisiertem H₂O auf einfache Konzentration verdünnt. Es wurden 5 µl des 1 × Protein-Beladungsfarbstoffs mit 15 µl aufzutragender Proteinprobe gemischt und 10 min. bei 95 °C denaturiert.

Die Kammer wurde mit 1 × SDS-Laufpuffer befüllt. Solange die Proteinproben im Sammelgel liefen und aufkonzentriert wurden, wurde eine Stromstärke von 20 mA angelegt, im Trenngel wurde dann auf 30 mA erhöht. Das gelaufene SDS-Gel wurde mindestens 20 min. oder ü.N. in einer Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel nochmal ü.N. in 10 %iger Essigsäure schwenkend entfärbt. Die gefärbten Gele wurden über einen Scanner digitalisiert und gespeichert.

4.8.3. Expression von OleA- Proteinen in *E. coli*

Es wurde sowohl die Expression von pBAD/*Myc*-His A Konstrukten mit His-Tag am C-Terminus in *E. coli* Top10 Zellen als auch von pET19b Konstrukten mit His-Tag am N-Terminus in *E. coli* Rosetta 2 Zellen getestet. Amplifizierte *oleA*-Gene wurden durch homologe Überhänge zu den Schnittstellen der Restriktionsenzyme NdeI und BamHI in pET19b (Abbildung 10A) sowie der Restriktionsenzyme NcoI und EcoRI in pBAD/*Myc*-His A (Abbildung 10B) kloniert. Die Expression in *E. coli* Rosetta 2 lieferte deutlich bessere Ergebnisse, weshalb fast ausschließlich *E. coli* Rosetta 2 zur Expression genutzt wurde.

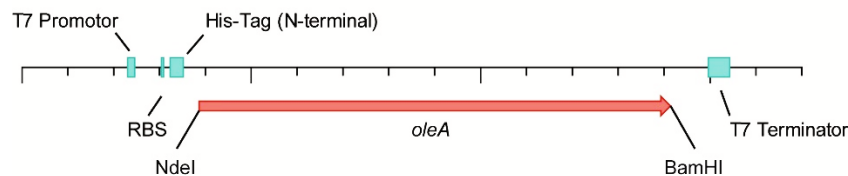
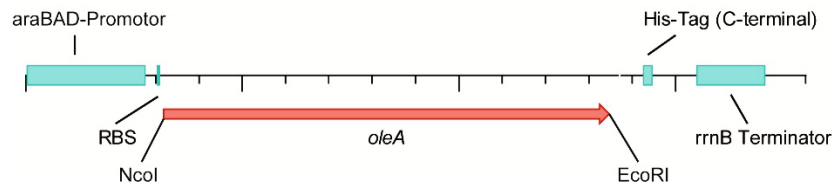
(A) pET19b-Expressionskonstrukt**(B) pBAD/*Myc*-His A-Expressionskonstrukt**

Abbildung 10: Konstrukte für die Expression von OleA-Proteinen von Plasmid pET19b (A) und von Plasmid pBAD/*Myc*-His A (B).

Als Negativ-Kontrolle diente *E. coli* Rosetta 2 transformiert mit dem „leeren“ pET19b-Vektor (enthält einen Großteil der codierenden Sequenz des *rpf* („Resuscitation-promoting factor“) – Faktors zwischen den Schnittstellen der Restriktionsenzyme NdeI und BamHI, die zur Klonierung verwendet wurden). Das von *E. coli* Rosetta 2 pET19b::*rpf* theoretisch exprimierte Protein samt His-Tag ist 206 AS bzw. 22,7 kDa groß, wurde aber im SDS-Gel nach His-Tag Aufreinigung nicht beobachtet. Die exprimierten OleA Proteine samt His-Tag sind 350-360 AS bzw. 38,5-39,6 kDa groß.

Eine LB-Kultur mit 200 µg/ml Ampicilin und 24 µg/ml Chloramphenicol wurde auf Start-OD₆₀₀ von 0,1 mit LB-Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Sobald ein OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war, wurde mit 0,1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert. Anschließend wurde die Kultur ü.N. bei 25 °C und 80 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mindestens bei 4500 rpm und 4 °C für 20 min. abzentrifugiert. Ein Zellaliquot wurde in 1 × LEW-Puffer („Lysis-Equilibration-Wash“-Puffer) resuspendiert und per Ultraschall (Intervall 0,2 sek., Amplitude 35 %) aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden erneut abzentrifugiert. Der (gefilterte) Überstand (enthält gefaltete Proteine) oder auch die resuspendierten aufgeschlossenen Zellen (enthält ungefaltete Proteine) wurden für eine SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese verwendet (Prüfung der Expression). Bei erfolgreichem Nachweis der Expression gefalteter Proteine wurden größere Zellmengen pro g Zellpellet in 2 ml 1 × LEW-Puffer resuspendiert und 1 g/L Lysozym (Thermo Scientific) eingestellt. Dann wurden die Zellen im Eisbad für 30 min. durch kombinierte Wirkung von Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen.

Es wurde anschließend nach Möglichkeit auf Eis und in auf 4 °C gekühlten Zentrifugen gearbeitet. Die aufgeschlossenen Zellen bzw. Zelltrümmer wurden bei mindestens 14000 rpm und 4 °C für 20-40 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach Filtrierung durch 0,45 µm Poren für weitere Protein-Aufreinigungsschritte verwendet.

4.8.4. His-Tag Affinitätschromatographie

Die steril-filtrierte Rohextrakte der Proteinexpression wurden mithilfe der Protino Ni-TED (Tris-(Carboxymethyl-) Ethylen-Diamine) 2000 Säulen von Macherey-Nagel und dem entsprechenden Protokoll aufgereinigt. Dabei wurde das mit einem His-Tag versehene Zielprotein von zusätzlich exprimierten *E. coli*-Proteinen, Nukleinsäuren, anderen Metaboliten und Salzen isoliert. Es wurde auf Eis gearbeitet. Im Laufe des Protokolls wurden folgende Fraktionen gewonnen: Durchfluss, Waschen I, Waschen II, Elution I, Elution II und Elution III. Zusätzlich wurden zu Beginn der Aufreinigung 50 µl Rohextrakt zurückgehalten und als zusätzliche Ausgangs-Fraktion behandelt. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurden alle Fraktionen auf einem gemeinsamen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

4.8.5. Größenausschluss-Chromatographie

Die weitere Aufreinigung der Elutionsfraktionen der His-Tag Affinitätschromatographie war mithilfe des Äktaexplorer „Fast Protein Liquid Chromatograph“ (FPLC) von Pharmacia möglich. Es wurde mit einer Superdex 200 pg Säule mit einem Volumen von 120 ml gearbeitet. Die Säule wurde mit demineralisiertem H₂O und 50 mM Tris-Puffer pH 7 äquilibriert. Das Volumen der Proteinprobe betrug 1 ml, das Totvolumen (Volumen an mobiler Phase) ca. 40 ml und das Volumen der gewonnenen Fraktionen 2 ml. Der Tris-Puffer (mobile Phase) wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min. appliziert. Die Absorption bei 280 nm (Protein) und die Leitfähigkeit (Salze) wurden kontinuierlich gemessen. Die Fraktionen im Zeitbereich des Proteinpeaks wurden vereint.

4.8.6. Enzymassays

4.8.6.1. OleA in vitro Aktivitätsassay/DTNB-Assay

Die Aktivität von OleA-Proteinen kann entweder zur Kondensation von zwei Acyl-CoAs oder nur zur Spaltung des Thioesters im Acyl-CoA Substrat führen. In beiden Fällen werden Thiolgruppen in Form von CoA-SH gebildet. Diese können aus Ellmans Reagenz DTNB (5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) (Sigma Aldrich) bei 412 nm spektrophotometrisch quantifizierbares TNB (2-Nitro-5-thiobenzoat) (Extinktionskoeffizient = $14150 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) freisetzen.

Die Inkubationsansätze von exprimiertem OleA mit Acyl-CoA Substraten setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 17: Zusammensetzung der *in vitro* Inkubationsansätze von OleA mit Acyl-CoA Substrat.

Komponenten	Probe	Negativ-Kontrolle 1	Negativ-Kontrolle 2
Tris pH 7,0 [mM]	50,00	50,00	50,00
Acyl-CoA Substrat [mM]	1,30	-	1,30
OleA-Protein [g/L]	0,47	0,47	-
in demineralisiertem H ₂ O			

Die Ansätze wurden für bis zu 48h bei 180 rpm und 30 °C inkubiert.

Der DTNB-Assay mit Proben aus den Inkubationsansätzen setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 18: Zusammensetzung des DTNB-Assays.

Komponente	Probe [μ l]	Blank [μ l]
Reaktionspuffer	1250	1375
1 g/L Ellmans Reagenz (DTNB)	25	25
Probe	125	-
Gesamtvolumen	1400	1400

Der DTNB-Assay wurde für 15 min. ohne Licht und unter Luftabschluss bei RT inkubiert und anschließend bei 412 nm im Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) vermessen.

4.8.6.2. Dichlorphenolindophenol (DCPIP) -Assay

Die Dehydrogenase-Aktivität von *M. luteus*-Rohextrakten mit Isovaleryl-CoA (Coenzym A) und Isobutyryl-CoA als Substrat wurde durch Verfolgung der Reduktion von DCPIP in *in vitro*-Reaktionen gemessen. Die Reaktionen (1 ml) enthielten 50 nmol DCPIP, 5 nmol Phenylmethansulfonat (PMS), 50 nmol Substrat und 40 μ l Rohextrakt in 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,4. Zur Gewinnung des Rohextraktes wurden die in Phosphat-Puffer resuspendierten Zellen durch Lysozym-Behandlung (Thermo Scientific) lysiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde gefiltert und im Assay verwendet. Nach Substratzugabe erfolgte die Messung bei 600 nm in einem CARY 100 Zweistrahl-Spektralphotometer von Varian Inc.

4.8.6.3. Bestimmung von L-Glutaminsäure- und D-Glukose-Konzentration im Medium

Zur Bestimmung der L-Glutaminsäure-Konzentration im Naylor-Medium wurde das „L-Glutamic Acid Assay“ Kit von Megazyme und das entsprechende Mikroplatten-Protokoll verwendet. Zur Bestimmung der D-Glukose-Konzentration im Medium wurde das „D-Glucose Assay (GOPOD Format)“ Kit von Megazyme und das entsprechende Protokoll im Maßstab 1:10 für Mikroplatten benutzt. Der veränderte Detektionsbereich des Tests wurde in der Probenverdünnung berücksichtigt.

4.9. Organische Extraktions-, Derivatisierungs- und Analyse-Methoden

4.9.1. Zellfraktionierung von *M. luteus*

Von einer stationären LB-Kultur wurden vier Proben genommen und jeweils in 50 ml Reaktionsgefäße bei 4500 rpm und 4 °C für 10 min. einzentrifugiert. Zwei einzelne Kulturüberstände wurden als Fraktion „Kulturüberstand“ bei -20 °C gelagert. Die restlichen Kulturüberstände wurden verworfen. Die Zellpellets wurden je einmal mit 0,8 % NaCl gewaschen um restlichen Überstand zu entfernen. Zwei einzelne Zellpellets wurden als Fraktion „ganze Zellen“ bei -20 °C gelagert. Die verbliebenen zwei Zellpellets wurden ein weiteres Mal mit 0,8 % NaCl gewaschen und anschließend in Tris-Saccharose-Puffer aufgenommen. Dann erfolgte durch Zugabe von 100 µg/ml Lysozym (Thermo Scientific) für 10-15 min. auf Eis die Lyse der Zellwand und die Bildung von Protoplasten. Dies wurde mikroskopisch kontrolliert. In der Folge wurde auf Eis gearbeitet. Die Protoplasten wurden bei 3000 rpm und 4 °C für 30 min. abzentrifugiert. Die Überstände, in denen sich die Zellwandbruchstücke befanden, wurden möglichst vollständig in je ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Protoplasten-Pellets wurden noch zweimal mit Tris-Saccharose-Puffer gewaschen (3000 rpm, 4 °C, 30 min.) und die Überstände in die gleichen neuen Reaktionsgefäße überführt.

Die Überstände wurden durch Poren mit 0,45 µm Durchmesser bei 3000 rpm und 4 °C für 5 min. zentrifugiert. Dabei wurden restliche Protoplasten nicht lysiert und aus dem Überstand entfernt. Die Überstände wurden mikroskopisch kontrolliert. Einzelne Protoplasten konnten nicht abgetrennt werden, waren aber im Vergleich zum Protoplasten-Pellet vernachlässigbar. Diese Überstände wurden als Fraktion „Zellwand“ bei -20 °C gelagert. Die Protoplasten-Pellets wurden in 0,8 % NaCl resuspendiert und mittels French Press (American Instrument Company) lysiert. Dies wurde mikroskopisch kontrolliert. Die aufgeschlossenen Protoplasten wurden in Ultrazentrifugationsgefäße (Thermo Scientific) überführt. Bei 35000 rpm und 4 °C wurden die Protoplasten für 20 min. abzentrifugiert (Sorvall-Discovery von Thermo Scientific).

Die Überstände, in denen sich die Cytosol-Komponenten befanden, wurden in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Membran-Pellets wurden noch zweimal mit 0,8 % NaCl gewaschen (35000 rpm, 4 °C, 20 min.) Die Überstände wurden in die gleichen neuen Reaktionsgefäße gegeben. Diese Überstände wurden als Fraktion „Cytosol“, die Membran-Pellets als Fraktion „Membran“ bei -20 °C gelagert. Alle Fraktionen wurden später einer Olefinextraktion unterzogen.

4.9.2. Extraktion von Olefinen

Eine Kulturprobe wurde in eine 12 ml Glasphiole mit PTFE-Schraubdeckel einzentrifugiert (10 min., 3500 rpm, 4 °C, reduzierte Beschleunigungsgeschwindigkeit) und der Kulturüberstand verworfen. Das Zellpellet wurde dauerhaft bei -20 °C gelagert oder sofort im Restüberstand resuspendiert. Zur Verbesserung des Zellaufschlusses wurden 100 µl 100 % Essigsäure zum resuspendierten Zellpellet gegeben und gründlich geschüttelt. Im Anschluss wurden zur Extraktion 1 ml Methanol und 4 ml hochreiner Hexan mit 10 µg/ml Triacontan (TCI) als interner Standard zugegeben. Es wurde ü.N. bei 640/min. geschüttelt. Am nächsten Tag wurde zur Optimierung der Phasentrennung zentrifugiert (5 min., 3000 rpm, RT, reduzierte Beschleunigungsgeschwindigkeit). Die Hexanphase wurde in ein GC/MS-Gefäß überführt mit oder ohne vorherige Aufkonzentrierung im Heizblock oder in der Vakuumzentrifuge.

4.9.3. Hydrierung von Olefinen

Es wurde dauerhaft im Abzug gearbeitet. Ein modifiziertes Protokoll von Tran *et al.* [65] wurde verwendet. In eine Glasphiole mit PTFE-Schraubdeckel, in die ein Hexanextrakt einer Olefinextraktion komplett eingeeengt wurde, wurden 10-12 mg Pd/c („Palladium on carbon“) eingewogen. Es wurden 300 µl Hexan, 50 mg NaBH₄ (Natriumborhydrid) und schrittweise 100 µl 100 % Essigsäure zugegeben. Der Deckel wurde schnell, aber nicht fest aufgeschraubt. Anschließend wurde für zwei Stunden bei 480/min. hochkant geschwenkt. Dann wurden erneut 1 ml Hexan, 50 mg NaBH₄ und schrittweise 100 µl 100 % Essigsäure zugegeben. Der Deckel wurde schnell, aber nicht fest aufgeschraubt. Anschließend wurde ü.N. bei 480/min. hochkant geschwenkt. Am nächsten Tag wurde unter regelmäßigem Schütteln 37 %ige HCl zugetropft bis keine Gasentwicklung mehr erfolgte.

Dann wurden 500 µl Methanol und 3 ml Hexan zugegeben. Die entstandenen Alkane wurden ü.N. bei 720/min. extrahiert. Die Hexanphase wurde in ein GC/MS Gefäß überführt.

4.9.4. Extraktion von freien und Lipid-Fettsäuren

Eine Zellsuspensionsprobe (0,1-3 ml) wurde in eine 12 ml Glasphiole mit PTFE-Schraubdeckel überführt. Diese Probe konnte bis zur weiteren Fettsäure-Extraktion über Wochen bei -20 °C gelagert werden. Zur Extraktion wurden 100 µl 100 % Essigsäure, 500 µl 125 µg/ml Arachinsäure (C20:0) in Ethanol als interner Standard sowie 5 ml Chloroform/Methanol (1:1) zugegeben. Hydrophobe Zellbestandteile wurden ü.N. bei 640/min. extrahiert. Am nächsten Tag wurde zur Optimierung der Phasentrennung zentrifugiert (5 min., 3000 rpm, RT, reduzierte Beschleunigungsgeschwindigkeit). Die untere Chloroform-Phase wurde mit einer Pasteur-Pipette in eine neue Glasphiole abgesaugt. Die Chloroform-Phase wurde im Heizblock oder in einer Vakuumzentrifuge komplett abgedampft. Zum fettigen Rückstand wurden 500 µl 1,2 M HCl in Methanol gegeben und dabei die Gefäßränder abgespült. Es wurde ü.N. bei 50 °C und 150 rpm (hochkant) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Methylierungsreaktion durch Zugabe von 5 ml 100 g/L NaHCO₃ gestoppt. Es wurde 1 ml hochreiner Hexan zugegeben und die FAMES ü.N. bei 640/min. extrahiert. Durch Zentrifugieren konnte die Phasentrennung wiederum optimiert werden. Die Hexanphase wurde in ein GC/MS-Gefäß überführt.

4.9.5. Acyl-CoA-Synthese aus freien Fettsäuren

Die Arbeit wurde größtenteils unter dem Abzug durchgeführt. Zwei Glasphiolen mit PTFE-Schraubdeckel wurden mit 100 % Ethanol ausgespült und der restliche Alkohol anschließend bei 120 °C komplett abgedampft. Die Deckel wurden sofort aufgeschraubt und die Glasphiolen auf RT abgekühlt. Es wurden 40 µmol freie Fettsäure aus einer Diethylether-Stocklösung in die erste Glasphiole überführt und das Lösungsmittel unter Stickstoff komplett verdampft. Dabei stand die Glasphiole in einem auf 60 °C vorgewärmten Sandbad. Sobald das erste Lösungsmittel abgedampft war, wurde noch zweimal 300 µl Benzol nachgelegt und ebenfalls unter Stickstoff abgedampft.

Mit aufgeschraubtem Deckel wurde die Glasphiole auf RT abgekühlt und anschließend wurden die freien Fettsäuren in 500 µl Dichlormethan gelöst. Es wurden 5 µl Triethylamin mit einer Hamilton-Pipette zugegeben, kurz geschüttelt, mit Stickstoff nachgespült, der Deckel aufgeschraubt, die Glasphiole mit Alu-Folie umwickelt und das Ganze für 30 min. bei RT inkubiert.

Die Glasphiole blieb zunächst mit Alu-Folie umwickelt und wurde auf Eis abgekühlt. Es wurden schnell 5 µl Ethylchlorformiat mit einer Hamilton-Pipette zugegeben, kurz geschüttelt, mit Stickstoff nachgespült, der Deckel fest aufgeschraubt und für 90-120 min. auf Eis inkubiert. Die Alufolie wurde entfernt und das Lösungsmittel unter Stickstoff vollständig abgedampft. Es wurden 1,5 ml Tetrahydrofuran zugegeben und das Präzipitat im Eisbad für 10 min. mit Ultraschall dispergiert. Die Glasphiole wurde bei 3000 rpm und 4 °C für 5 min. zentrifugiert und der Überstand zügig in die zweite mit Ethanol ausgewaschene Glasphiole überführt und fest verschlossen. Mit der ersten Glasphiole wurden die letzten beiden Schritte wiederholt und die Überstände vereinigt. Das Tetrahydrofuran wurde komplett unter Stickstoff abgedampft und das entstehende Pellet nochmal in 300 µl Tetrahydrofuran aufgenommen. Es wurde ein mit Tetrahydrofuran gewaschener Rührfisch zugegeben und die Glasphiole auf Eis gelagert. In die Glasphiole wurden 20 mg Coenzyme A Trilithium-Salz, gelöst in 1 ml eiskaltem 1 M KHCO_3 , gegeben. Die Glasphiole wurde über einem Magnetrührer angebracht und die Lösung für 90 min. bei RT heftig gerührt. In regelmäßigen Intervallen wurde per Hand geschüttelt. Die in der Lösung enthaltenen 300 µl Tetrahydrofuran wurden über mindestens 10 min. unter Stickstoff abgedampft. Die produzierten Acyl-CoA-Thioester wurden durch tropfenweise Zugabe von 2 M HCl ausgefällt. Dabei wurde per Hand geschwenkt. Sobald der weiße Niederschlag trotz Schwenken erhalten blieb, wurde die HCl-Zugabe sofort eingestellt. Die Acyl-CoAs wurden bei 4500 rpm und 4 °C für 5 min. abzentrifugiert und der Überstand, soweit möglich, verworfen. Das Acyl-CoA-Pellet wurde zweimal mit 1 ml 0,1 M HCl gewaschen. Dabei wurde das Pellet 10 min. per Ultraschall dispergiert und anschließend bei 4500 rpm und 4 °C für 5 min. abzentrifugiert. Die 0,1 M HCl wurde verworfen und restliche HCl unter Stickstoff abgedampft. Dann wurde das Pellet auf gleiche Weise dreimal mit 2 ml Diethylether gewaschen. Auch Reste von Diethylether wurden unter Stickstoff komplett abgedampft.

Die Acyl-CoA-Thioester wurden in 1-2 ml demineralisiertem H₂O resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Das Verhältnis von nicht-reagiertem CoA-SH und Acyl-CoA-Produkt wurde nachträglich mit einer „Nexera X2“ HPLC („High pressure liquid chromatography“) der Firma Shimadzu geprüft.

4.9.6. GC/MS Analyse

In der ersten Hälfte der Arbeit wurde ein „Trace GC Ultra“ Gas Chromatograph in Verbindung mit einem DSQ („Dual Stage Quadrupole“) Massenspektrometer (Thermo Scientific) verwendet. Das GC-Gerät war mit einem „PTV-splitless“ Injektionssystem, betrieben bei 250 °C, und einer „Stabilwax“ Silicat-Kapillar-Säule (60 m × 0,25 mm ID × 0,25 µm) bzw. einer „Rxi-5ms“-Säule (30m × 0,25 mm ID × 0,25 µm) ausgerüstet. Das Massenspektrometer arbeitete mit 70 eV Elektronenstoß-Ionisation (EI) bei einer Temperatur von 200 °C. Es wurde ein Massenbereich von 40-600 m/z aufgenommen mit einer Scangeschwindigkeit von 0,8741/s. Das Trägergas war Helium und wurde mit einer konstanten Fließrate von 1 ml/min appliziert.

In der zweiten Hälfte der Arbeit wurde ein „QP2020“-GC/MS (Shimadzu) verwendet. Das GC-Modul war mit einem „split“ bzw. „splitless“ Injektionssystem, betrieben bei 260 °C, und einer „Rxi-5ms“-Säule (30m × 0,25 mm ID × 0,25 µm) ausgerüstet. Das Massenspektrometer arbeitete mit 70 eV Elektronenstoß-Ionisation (EI) bei einer Temperatur von 200 °C. Es wurde ein Massenbereich von 45-500 m/z aufgenommen mit einer Scangeschwindigkeit von 0,20/s. Das Trägergas war Helium und wurde mit einer konstanten Fließrate von 1 ml/min appliziert.

Zur Aufnahme von Olefin- bzw. Fettsäure-Methylester (FAMES) -Peaks wurde folgendes GC-Programm genutzt.

Tabelle 19: GC-Programm für Olefin- und FAME-Analyse.

Rate [°C/min.]	Endtemperatur [°C]	Haltezeit [min.]
	40	3
20	280	5 (FAMES) bzw. 8 (Olefine)

Olefine wurden anhand des Verhältnisses ihrer Peak-Fläche zur Peak-Fläche von Triacontan (C₃₀-Alkan) mit bekannter Konzentration, das der Hexanphase zugesetzt wurde, in die die Olefine extrahiert wurden, quantifiziert.

FAMEs wurden anhand des Verhältnisses ihrer Peak-Fläche zur Peak-Fläche von Arachinsäure (C20:0) mit bekannter Konzentration, das der Probe zur Beginn der Extraktion zugesetzt wurde, quantifiziert.

Aufgrund der Nutzung unterschiedlicher GC/MS-Geräte oder GC-Säulen kam es zwischen einzelnen GC/MS-Läufen zu moderaten Variationen der gemessenen absoluten Olefin- und FAME-Konzentrationen. Dies beeinflusste die Konzentrationsverhältnisse zwischen Stämmen innerhalb eines Laufes allerdings nicht.

5. Ergebnisse

5.1. Grundlegende Betrachtungen zur Olefinproduktion in *M. luteus*

5.1.1. Der zeitliche Verlauf der Olefinproduktion in *M. luteus*

Zur Aufnahme lückenloser Wachstumskurven von *M. luteus* trpE16 in Voll- und Minimal-Medium wurden zweimal zwei Kulturen mit LB- bzw. Naylor-Medium im Abstand von zwölf Stunden mit LB-Vorkulturen auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. In regelmäßigen Abständen wurden Zellen für Olefinextraktion einzentrifugiert. Bei jeder Probennahme wurde die zu extrahierende Zellmenge anhand des aktuellen OD₆₀₀-Werts normalisiert.

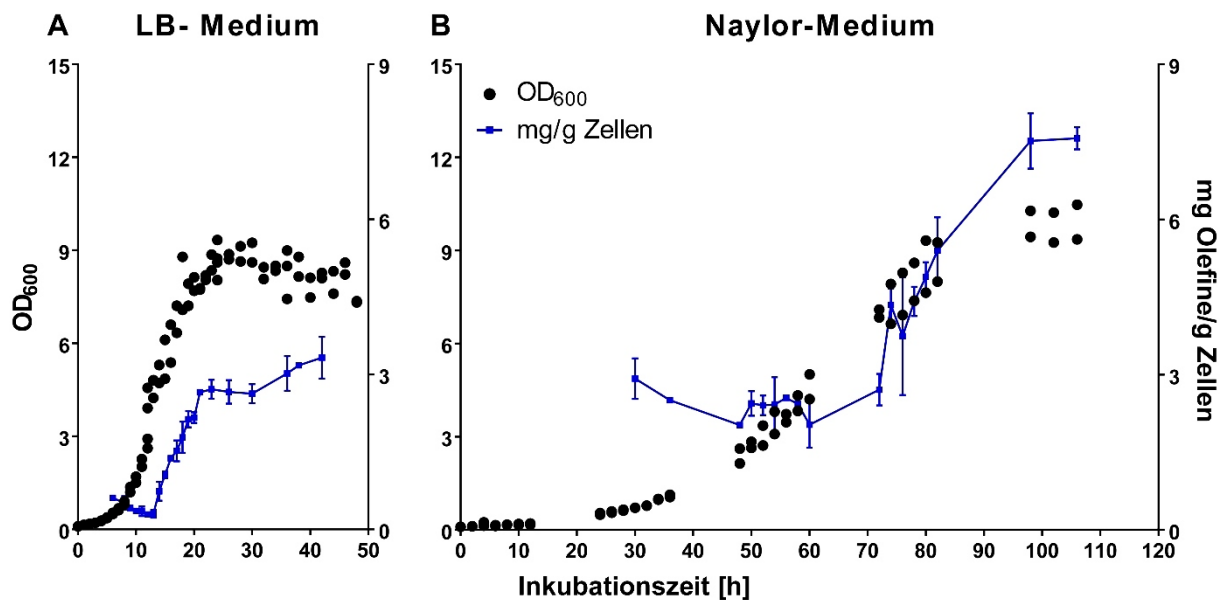


Abbildung 11: Wachstumskurven (schwarze Punkte) von *M. luteus* trpE16 in LB- (A) und Naylor-Medium (B) mit Verlauf der Olefin-Konzentration (blaue Linie). Die OD₆₀₀-Werte sind auf der linken Y-Achse, die Olefin-Konzentration auf der rechten Y-Achse abzulesen. Alle Datenpunkte des Verlaufs der Olefin-Konzentration stellen den Mittelwert von zwei biologischen Replikaten dar. Bei den Wachstumskurven sind die Einzelmessungen von um 12h-versetzten zweimal zwei biologischen Replikaten bzw. von zwei biologischen Replikaten dargestellt.

Abbildung 11 zeigt, dass die LB-Kulturen von *M. luteus* nach 24 h in die stationäre Phase eintraten. Die Naylor-Kulturen dagegen traten erst nach 80 h in die stationäre Phase ein und erreichten dabei eine höhere End-OD. Die OD-Werte und Olefinmengen der zweiten zwei um 12 h-versetzten Naylor-Kulturen sind aus Übersichtlichkeits-Gründen nicht gezeigt, da sie durch unterschiedliche Anpassung an das neue Medium bei einer noch höheren End-OD (OD = 12) in die stationäre Phase eintraten.

Beide Kulturarten zeigten unabhängig vom Medium die gleiche Entwicklung der Olefin-Konzentration in den Zellen. In beiden Medien enthielten die Zellen von Beginn an eine geringe Olefinmenge, die mit ca. 0,3 mg/g Zellen im LB-Medium deutlich kleiner war als im Naylor-Medium mit ca. 2,5 mg/g Zellen, obwohl die Kulturen mit derselben Vorkultur angeimpft wurden. Die Olefin-Konzentration blieb über die lag- und bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase in beiden Medien konstant. Ab Mitte der exponentiellen Phase kam es zu einer Anreicherung der Zellen mit Olefinen. Die Olefin-Konzentration der Zellen erreichte mit Eintritt in die stationäre Phase ein Maximum von ca. 3 mg/g Zellen im Fall des LB-Mediums und von 7 mg/g Zellen im Fall des Naylor-Mediums und blieb konstant.

5.1.2. Bestimmung des produzierten Olefinprofils von *M. luteus*

5.1.2.1. Annotation der Olefine

Die Grundlage für das Aufstellen der Olefinprofile von *Micrococcus* und anderen Olefin-Produzenten ist die Kenntnis der korrekten Annotation der beobachteten Olefin-Peaks in GC/MS-Läufen. Dazu wurde zunächst die Auftrennung einer Standardmischung von Fettsäuremethylestern (FAMES) der Firma Larodan im GC/MS betrachtet (Abbildung 12A) und festgestellt, dass bei jeder Kettenlänge (Verzweigung wird eingerechnet) *iso-* vor *ai-* vor *sc-*FAMES eluierten. Dies konnte im Anschluss anhand der FAME-Massenspektren auch von unbekanntem FAME-Proben und der beobachteten *iso-* (M-43) und *ai-* (M-57) analytischen Ionen (Spaltungsmuster siehe auch Abbildung 15) bestätigt werden (Abbildung 12B). Diese Annotationssystematik wurde zunächst 1:1 für die Annotation der Olefine übernommen. Des Weiteren wurde, wie in Abbildung 16A zu sehen, eine Peak-Anordnung in ein Dreiergrüppchen, gefolgt von einem Zweiergrüppchen, gefolgt von einem einzelnen Peak für ungeradzahlige Olefine beobachtet. Daraus wurde für ungeradzahlige Olefine folgende Auftrennung der Isomeren abgeleitet: *isoiso*, *isoai*, *ai ai*, *isosc*, *aisc* und *scsc*. Für geradzahlige Olefine, ohne die Möglichkeit für *ai ai*-Isomeren aufgrund fehlender natürlicher *ai*-verzweigter geradzahliger Fettsäuren, ergab sich folgende Auftrennungsabfolge: *isoiso*, *isoai*, *isosc*, *aisc* und *scsc*.

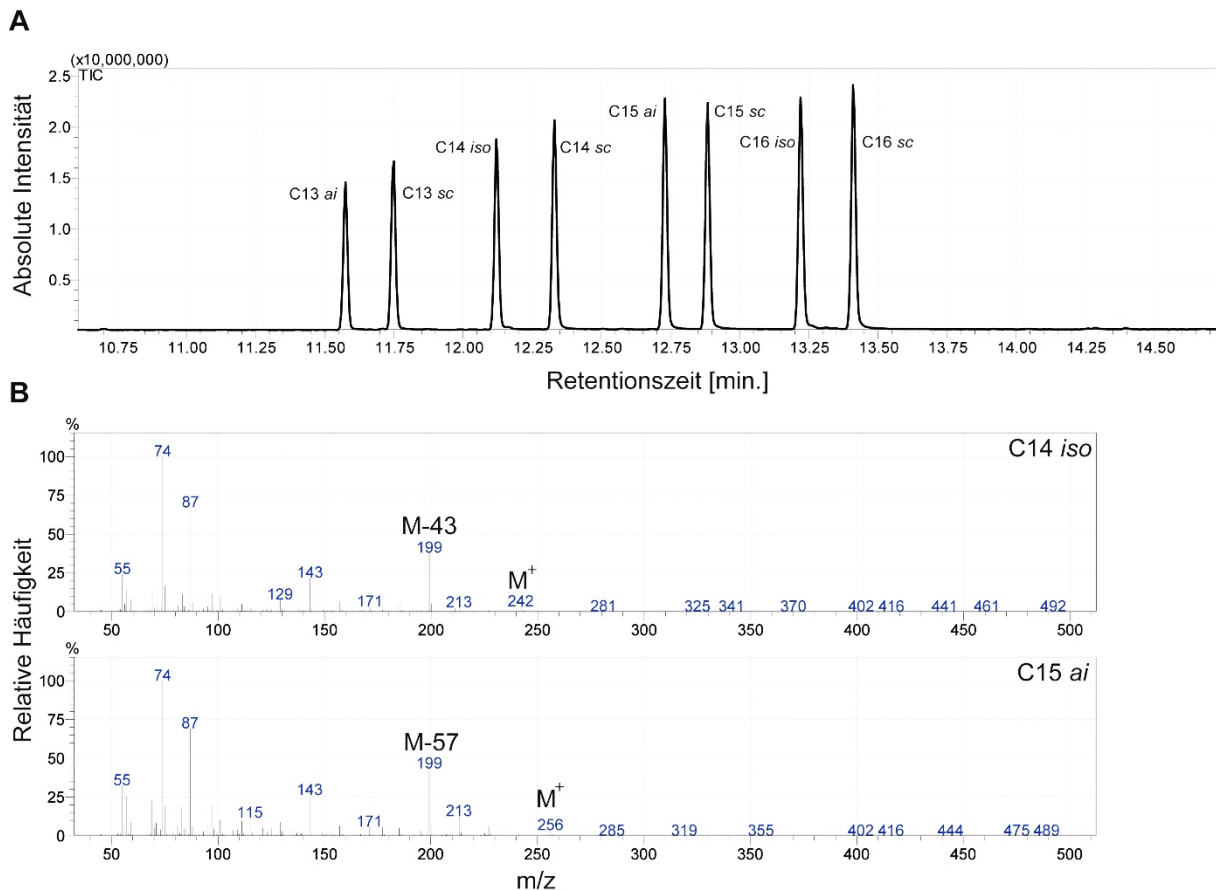
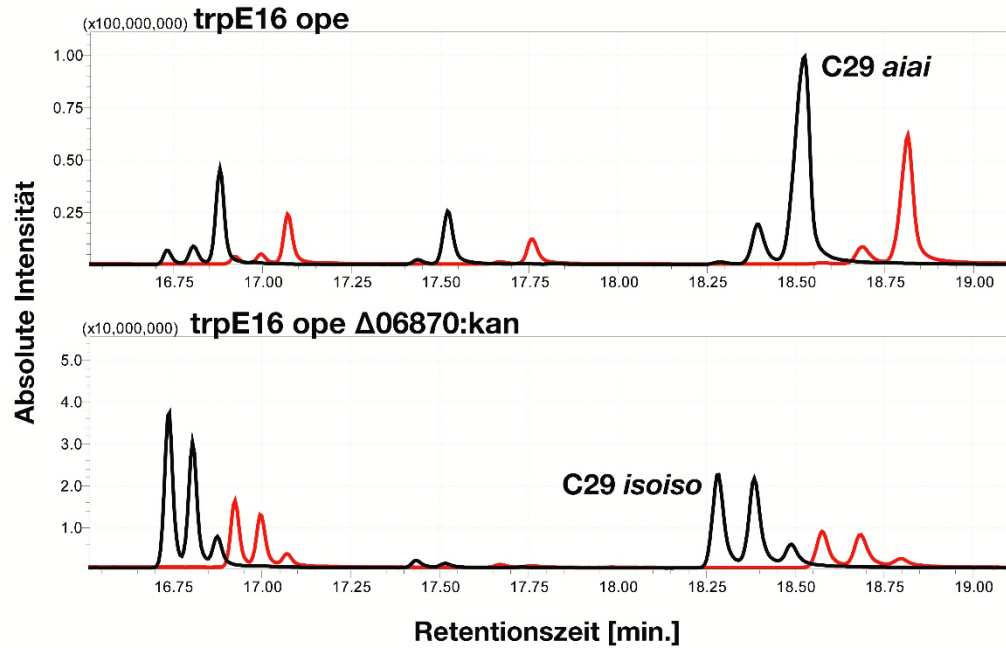


Abbildung 12: (A) Gas-Chromatogramm einer Standardmischung von FAMES der Firma Larodan („Mixture BR 2“). (B) Massenspektren exemplarischer *iso*- und *ai*-verzweigter FAMES. Die Molekülionen (M^+) sowie die analytischen Ionen einer *iso*-Verzweigung (M-43) oder einer *ai*-Verzweigung (M-57) sind beschriftet. Abkürzungen: TIC, „Total Ion Chromatogramm“.

Wenn versucht wird diese Annotation der Olefine anhand der Betrachtung der Massenspektren von vermeintlichen *isoiso*- und *aiai*-Olefinen sowie der *iso*- und *ai*-spezifischen Spaltungsmuster (Abbildung 15A und 15B) zu bestätigen, ist das nicht erfolgreich. Es ergibt sich das in Abbildung 13B (oben) gezeigte Ergebnis. Für vermeintliche *isoiso*-Olefine ist der Peak des *ai*-spezifischen analytischen Ions (M-57) größer als der Peak des *iso*-spezifischen Ions (M-43). Es ist zu vermuten, dass die Verlagerung der Doppelbindung oder Doppelbindungen an die *iso*- bzw. *ai*-Verzweigung (Abbildung 15C und 15D) mit dem erwarteten Spaltungsmuster interferiert. Um dies zu zeigen und die Annotation endgültig zu bestätigen wurden Olefinextrakte von *M. luteus* zu korrespondierenden Alkanen hydriert (Abbildung 13). Das Massenspektrum eines *aiai*-Alkans zeigt einen deutlich größeren Peak für das *ai*-analytische Ion (M-57) und beim *isoiso*-Alkan ist der Peak des *iso*-analytischen Ions (M-43) nun ebenfalls größer. Die Annotation der Isomeren ist somit unstrittig.

A



B

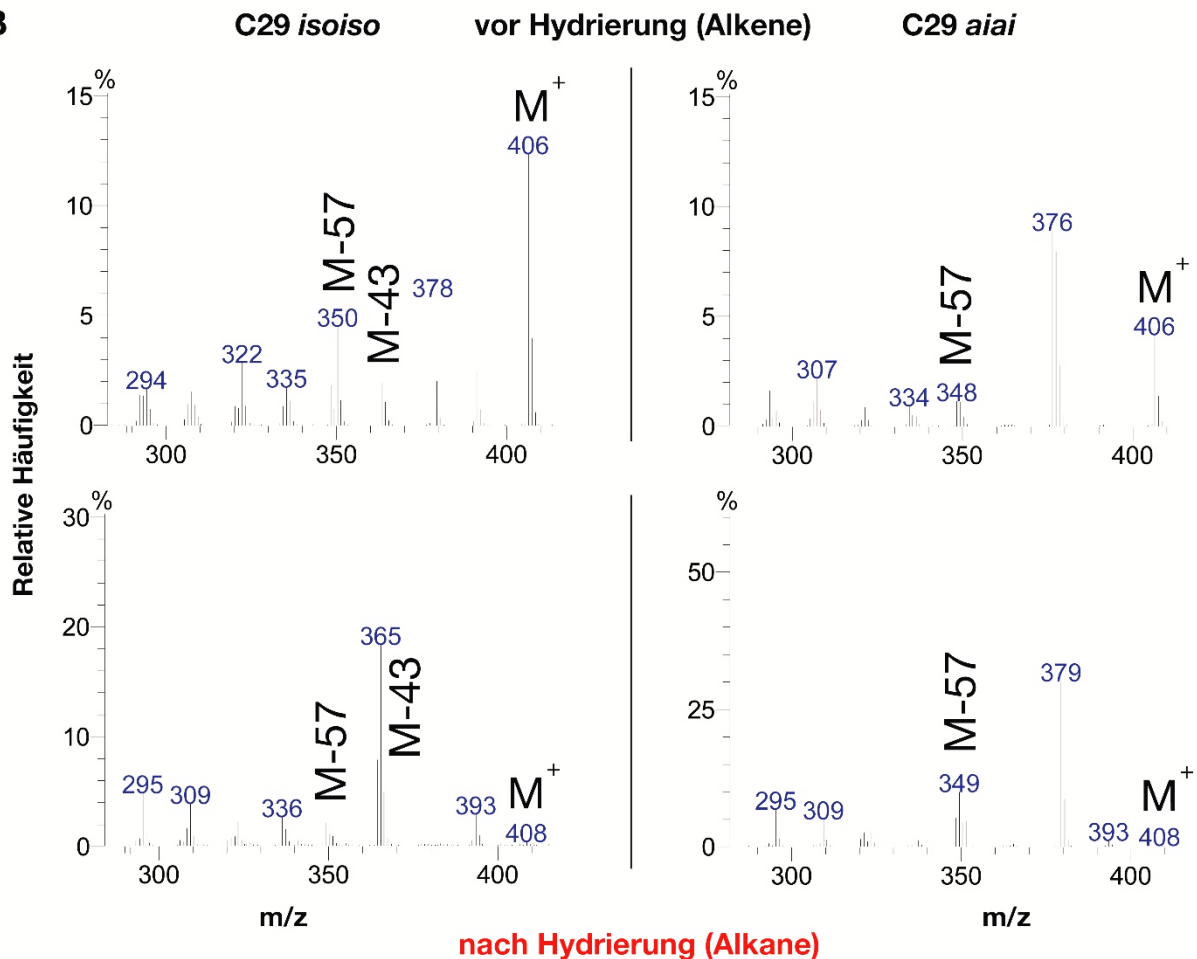


Abbildung 13: (A) Gas-Chromatogramme von Hexanextrakten der Stämme *trpE16 ope* und *trpE16 ope* $\Delta 06870$:kan vor (schwarz) und nach (rot) Hydrierung. (B) Massenspektren von C29 *isoiso* (links) Monoalken (oben) und Alkan (unten) aus dem Extrakt des Stammes *trpE16 ope* $\Delta 06870$:kan sowie Massenspektren von C29 *aiai* (rechts) Monoalken (oben) und Alkan (unten) aus dem Extrakt des Stammes *trpE16 ope*. Die Molekülonen (M⁺) sowie die analytischen Ionen einer *iso*-Verzweigung (M-43) oder einer *a'*-Verzweigung (M-57) sind beschriftet.

Zusätzlich wurden nur Olefin- und Alkan-Peaks mit einem Massenunterschied von 2 Wasserstoffatomen beobachtet (Abbildung 13), was dafür spricht, dass *Micrococcus* ausschließlich Monoalkene produziert. Zuletzt muss noch auf das Ergebnis eines Hydrierungs-Vorversuches verwiesen werden (Abbildung 14).

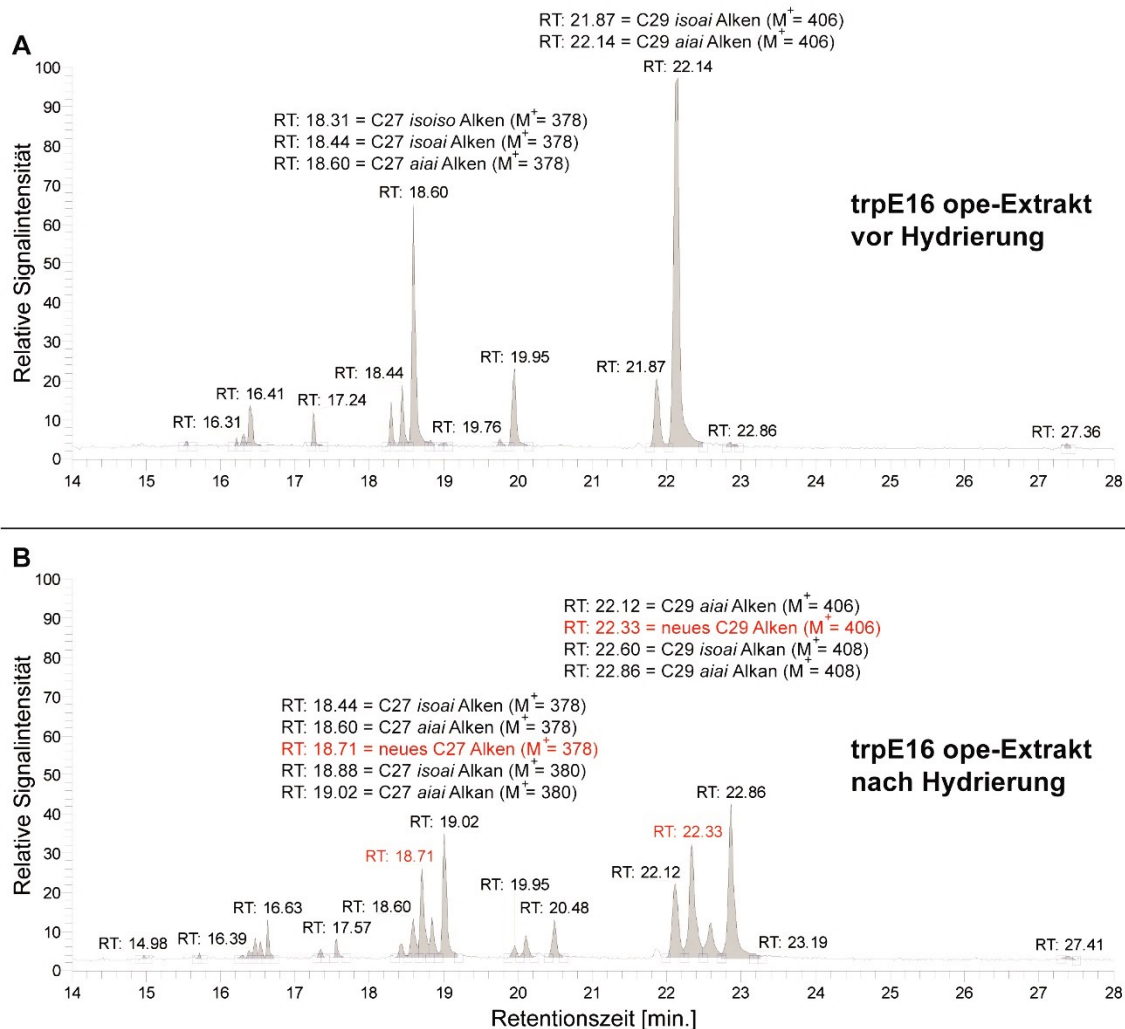


Abbildung 14: Gas-Chromatogramme des Hexanextrakts des Stammes trpE16 ope vor (A) und nach (B) einem Hydrierungsversuch. Nach Hydrierung neu auftretende Monoalkene sind mit roter Beschriftung hervorgehoben. Abkürzungen: RT, Retentionszeit; M^+ , Molekülion.

Wie bereits von Frias *et al.* [43] berichtet, kann eine zu heftige Reduktionsreaktion auf Palladium zur Umlagerung der Doppelbindung und zur Produktion von trans- aus cis-Konfigurationsisomeren führen. Trans-Isomere laufen im „tail“ des entsprechenden cis-Peaks. Diese wurden auch hier erstmals für *M. luteus* beobachtet. Zusätzlich zur korrekten Annotation der produzierten Olefin-Isomeren konnte somit auch festgehalten werden, dass *M. luteus* ausschließlich Monoalkene mit cis-Konfiguration der einzelnen Doppelbindung bildet.

Abspaltung von...Verzweigung

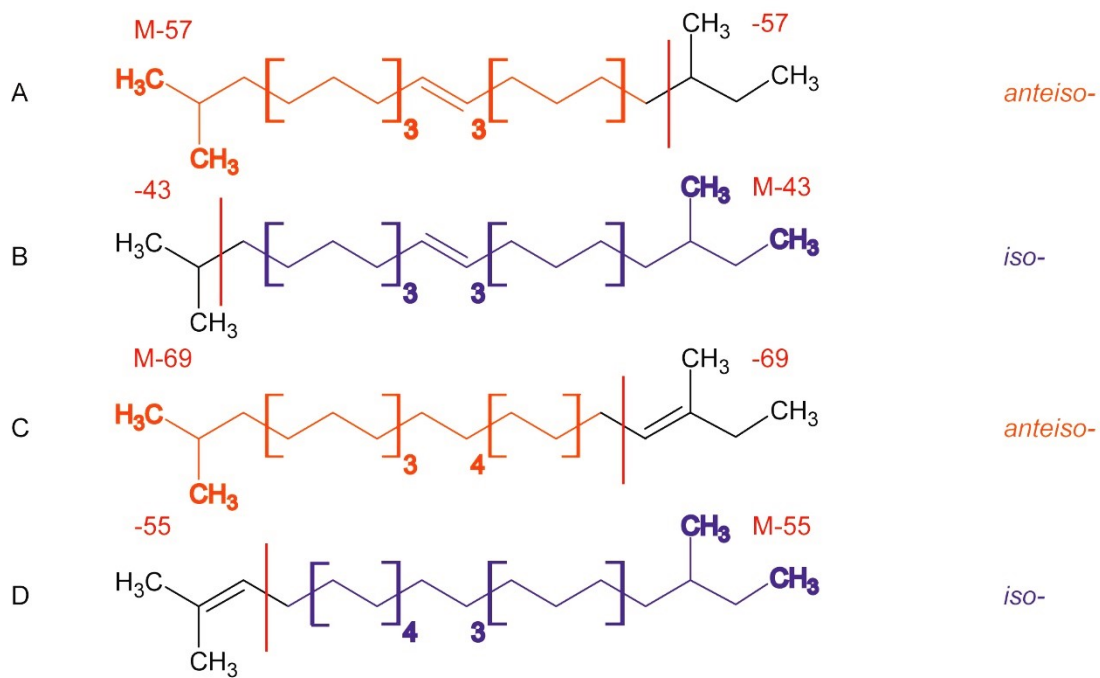


Abbildung 15: Zu erwartende Spaltungsmuster bei *ai*-Verzweigung (A) und bei *iso*-Verzweigung (B) eines Monoalkens sowie die daraus resultierenden analytischen Ionen. Zur Vereinfachung sind beide Spaltungsmuster an einem *isoai*-Monoalken dargestellt. Mögliches Szenario, wie die Doppelbindung das zu erwartende Spaltungsmuster der jeweiligen Verzweigung aushebeln könnte in (C) und (D). Abkürzungen: M, Molekül-Ion.

5.1.2.2. Das produzierte Olefinprofil von *M. luteus*

Mit Erreichen der stationären Wachstumsphase in LB- und Naylor-Medium erreichte die Olefinproduktion nicht nur ihr Maximum, es bildete sich auch das finale Olefinprofil von *M. luteus* trpE16 heraus.

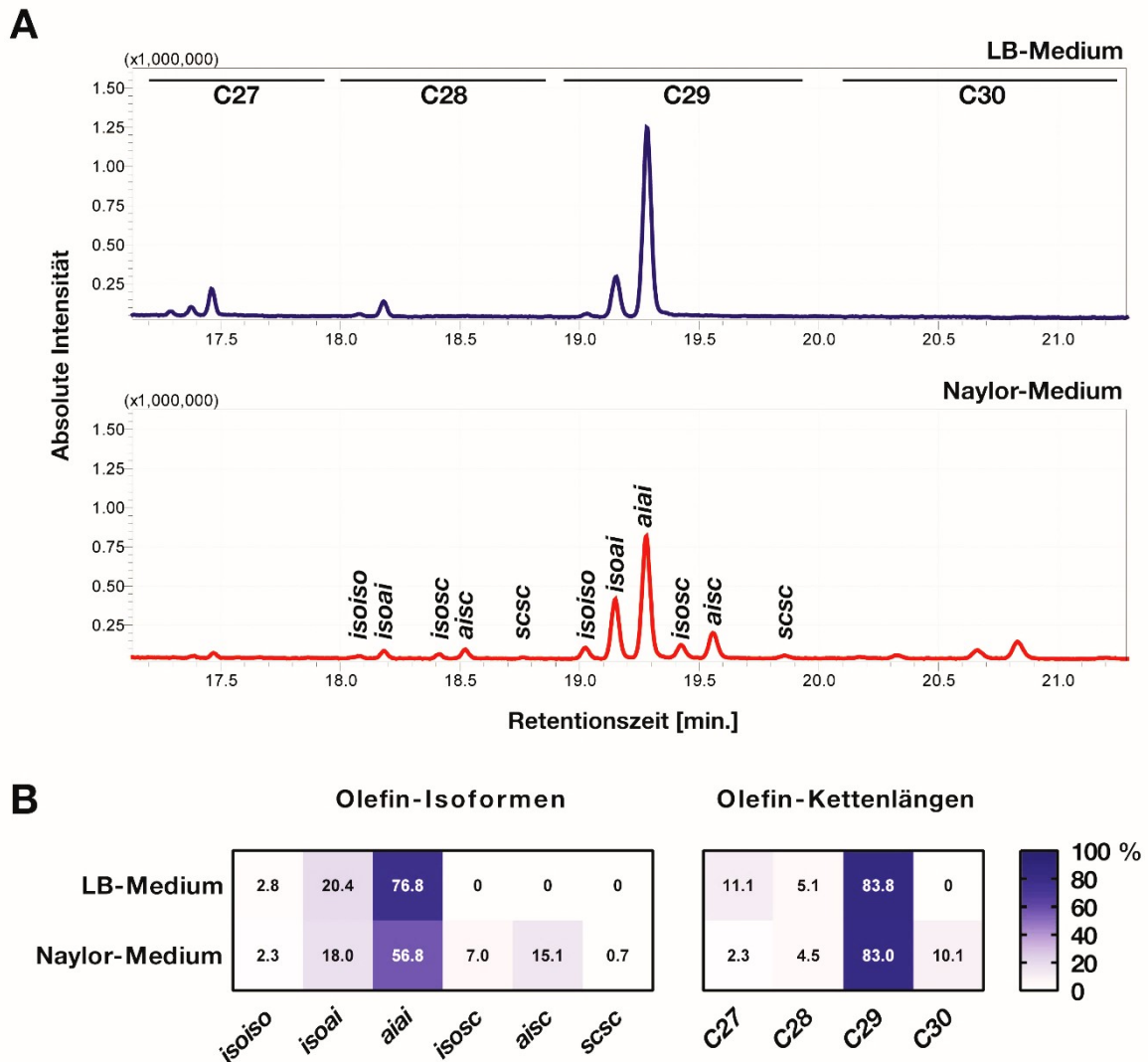


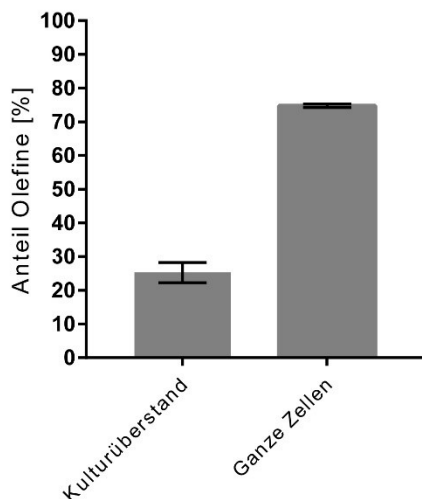
Abbildung 16: (A) Repräsentative Gas-Chromatogramme einer Olefinextraktion von *M. luteus* trpE16 in stationärer Phase nach Wachstum in LB-Medium (oben) und Naylor-Medium (unten). Im Chromatogramm des LB-Mediums sind die Bereiche der Retentionszeit zu denen die verschiedenen Olefin-Kettenlängen laufen markiert. Im Naylor-Chromatogramm ist für den Zeitbereich der C28/29-Olefine die Reihenfolge der Olefin-Isomeren angezeigt. (B) Anteile der einzelnen Olefin-Isomeren und -Kettenlängen in stationärer Wachstumsphase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten. Die Standardabweichung der Prozentwerte lag bei maximal zwei Prozent.

M. luteus trpE16 zeigte in beiden Medien eine maßgeblich C29-Kettenlängen- und *ai*-Isomer-dominierte Olefinproduktion (Abbildung 16A und 16B). Im LB-Medium wurde überwiegend ein Kettenlängenbereich von C27-C29 gebildet. Im Naylor-Medium konzentrierte sich die Produktion auf einen Kettenlängenbereich von C28-C30. Unverzweigte oder teilweise unverzweigte Olefine (*isosc*, *aisc* und *scsc*) wurden nur im Naylor-Medium gebildet.

5.1.3. Lokalisation der Olefine innerhalb der Bakterienzelle

Die Vermutung, dass die Olefine als rein hydrophobe Substanzen in die Membran der Bakterienzelle eingelagert werden, wurde durch Gewinnung einzelner Kultur- bzw. Zellfraktionen und anschließender Olefinextraktion dieser Fraktionen untersucht.

A: Verteilung der Olefine in Kulturprobe



B: Verteilung der Olefine in ganzen Zellen

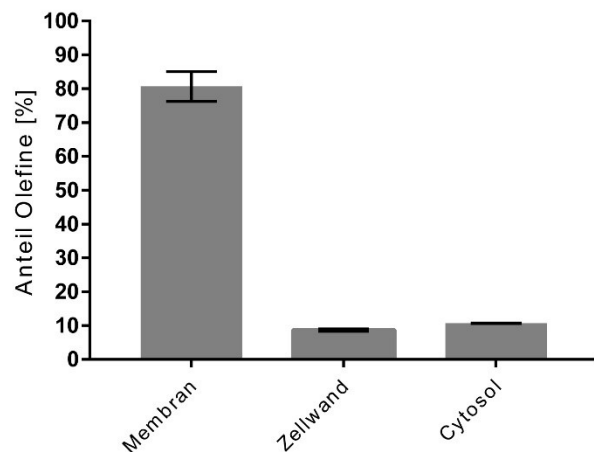


Abbildung 17: Lokalisierung der Olefine in einer *M. luteus* trpE16 ope-Kultur nach Wachstum in LB-Medium. Die Anteile von Olefinen, gefunden in einer Kulturfraktion, an der Summe von Olefinen, gefunden in allen verglichenen Kulturfraktionen, sind dargestellt. Die Verteilung der Olefine zwischen Kulturüberstand und ganzen gewaschenen Zellen (A) sowie die Verteilung der Olefine zwischen den zellinternen Fraktionen Membran, Zellwand und Cytosol (B) ist aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte von zwei technischen Replikaten.

Bei Betrachtung der Summe der Olefine, die im Kulturüberstand und in ganzen gewaschenen Zellen gefunden wurde (Abbildung 17A), befanden sich 75 % der Olefine in den Zellen. Die 25 % Olefine, die im Überstand gefunden wurden, resultierten mutmaßlich von Zellen, die bis zur Probennahme in der stationären Phase lysiert waren. 80 % der Summe an Olefinen, die in den zellinternen Fraktionen gefunden wurden, konnten der Membranfraktion zugeordnet werden. Jeweils 10% der Olefine wurden in der Zellwand- und der Cytosol-Fraktion detektiert (Abbildung 17B). Dieses Resultat dient im Folgenden als Diskussionsgrundlage weiterer Ergebnisse.

5.1.3.1. Optimierung des Olefin-Speichers der Bakterienzelle

Nachdem die Zellmembran von *M. luteus* als Speicherort der Olefine bestätigt wurde, war es von Interesse zu untersuchen, ob eine Vergrößerung der Membranoberfläche mit einer Zunahme des Olefingehalts der Zelle einhergeht. In der Literatur bereits ausführlich beschrieben ist die Expression von tierischem Caveolin-Protein in Bakterienzellen, das für Einstülpungen der Membran und Abschnürungen von Vesikeln sorgt [66], [67]. Um dies in *M. luteus* zu realisieren, wurde das für *M. luteus* codon-optimiert synthetisierte Gen für Caveolin-1 (*Canis lupus familiaris*) zusammen mit einer Kanamycin-Kassette vor den nativen Promotor von Mlut_19390 ins Genom von *M. luteus* kloniert. Das Gen Mlut_19390 wurde dabei ersetzt. Der Promotor von Mlut_19390 gehört laut eigenen RNA-Sequenzierungs-Ergebnissen (Anhang 9.3. Tabelle 42) zu denen mit der höchsten Transkriptionsrate. Der Olefingehalt der Mutante trpE16 ope Δ 19390::cav1:kan wurde in Proben aus der stationären Phase nach Wachstum in Naylor-Medium im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 ope analysiert (Abbildung 18). Die Olefinmenge konnte durch die Expression des Caveolin-Proteins um mehr als 50 % gesteigert werden (Abbildung 18A). Gleichzeitig konnten Verschiebungen der Olefin-Isomeren zu mehr *aiai*-Verzweigung sowie Verschiebungen der Olefin-Kettenlängen von geradzahligen zu ungeradzahligen Olefinen festgestellt werden (Abbildung 18B und 18C).

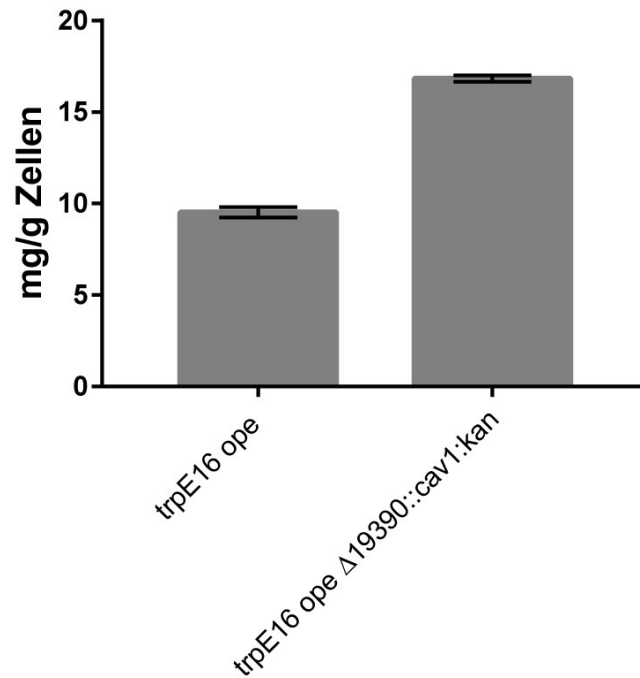
Unter dem Mikroskop konnten Veränderungen der Zellen auch unter Nutzung von hydrophoben Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Nile Red) nicht beobachtet werden.

5.1.4. *M. luteus* als Vertreter der Olefinproduktion seiner phylogenetischen Ordnung

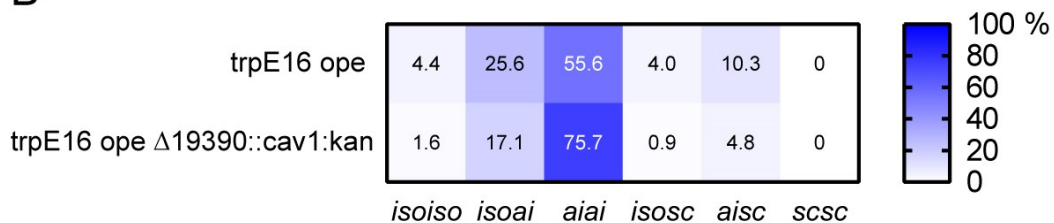
Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Bakterien auf etwaige Olefinproduktion hin untersucht. Es wurden Stämme aus den Sammlungen von Prof. Dr. W. Liebl und Prof. Dr. K. H. Schleifer, aus Umweltproben von Dr. J. Dib (PROIMI BIOTECNOLOGIA CONICET, Tucumán, Argentinien), Krankenhaus-Isolate von Dr. M. Köberle (Dermatologische Klinik der TU München) sowie Stämme der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) untersucht. Bei Zweifel an der Identität eines Stammes aufgrund von untypischem Wachstumsverhalten, Morphologie oder Fettsäure-/Olefinprofil wurde zumindest die Gattung per 16S rDNA-Sequenzierung bestätigt.

Während sich die aktuelle Literatur auf Gram-negative Olefin-Produzenten wie *Xanthomonas* und *Shewanella* konzentriert, lag der Fokus dieser Arbeit auf Gram-positiven *Actinobacteria*.

A



B



C

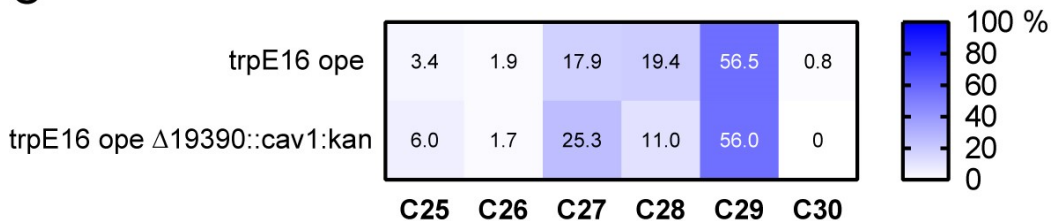


Abbildung 18: Analyse der Olefinproduktion in der stationären Phase nach Wachstum in Naylor-Medium der Caveolin-Mutante trpE16 Δ 19390::cav1:kan im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 ope. In (A) sind absolute Olefinmengen dargestellt. In (B) ist die Verteilung der Olefin-Isomeren und in (C) die Verteilung der Olefin-Kettenlängen gezeigt. Es sind jeweils Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Die Standardabweichung der Prozentwerte liegt bei unter 2 %.

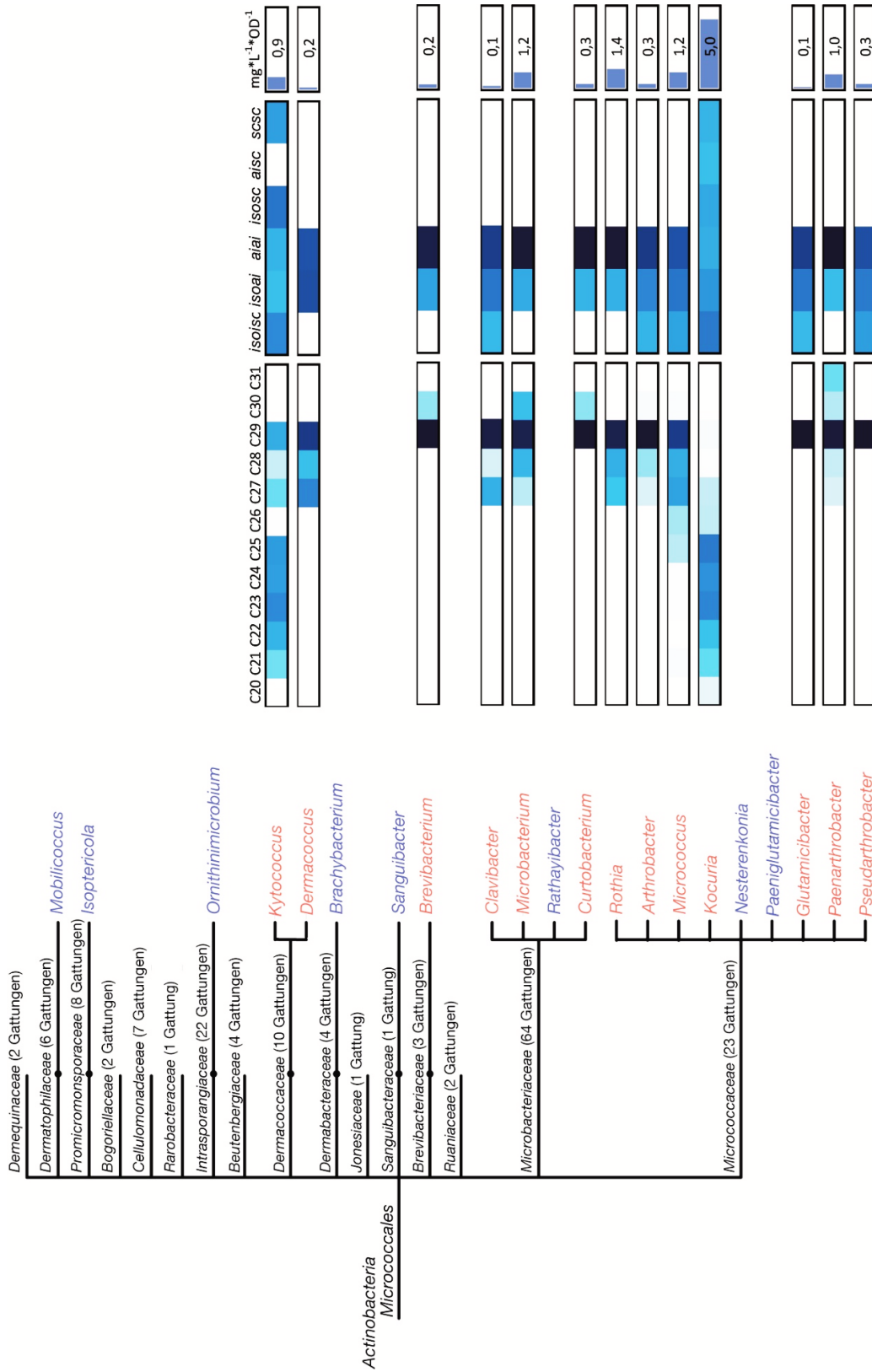


Abbildung 19: Vorkommen von Olefinen in der Ordnung *Micrococcales*. Die phylogenetische Ordnung der *Micrococcales* innerhalb des Phylums der *Actinobacteria* mit allen dazugehörigen Familien ist dargestellt. Die Anzahl der Gattungen innerhalb einer Familie ist angegeben. Nur die Gattungen, die laut Blast-Ergebnis einen vollständigen *oleABCD*-Gencluster besitzen (blau) oder für die innerhalb dieser Arbeit Olefinproduktion nachgewiesen wurde (rot), sind ausgeschrieben. Neben den Olefin-produzierenden Gattungen sind die durchschnittlichen Olefinprofile und durchschnittlich produzierten Mengen aller untersuchten Stämme der Gattung gezeigt.

Die Gattungen der *Micrococcales*, die laut Blast-Ergebnis ein vollständiges *oleABCD*-Gencluster besitzen, sind in Abbildung 19 aufgeführt. Für fast zwei Drittel dieser vermeintlichen Olefin-Produzenten konnten Vertreter bezüglich ihres Olefinprofils und Produktionsmenge untersucht werden. Alle Stämme wurden in LB-Medium kultiviert und Proben in stationärer Phase genommen.

Neben *Micrococcus* gehörten die Gattungen *Kocuria*, *Kytococcus*, *Rothia*, *Microbacterium* und *Paenarthrobacter* zu den stärksten Olefin-Produzenten ihrer phylogenetischen Ordnung. Das von *Micrococcus* gebildete Olefinprofil, das von *ai*-Isomeren und der C29-Kettenlänge dominiert wurde, war unter den *Micrococcales* stark verbreitet. Hinsichtlich der gebildeten Olefinprofile stellten nur die Gattungen *Kocuria*, *Kytococcus* und *Rothia* Ausnahmen dar. *Kocuriae* zeigten einen Kettenlängenbereich von C23-C25, das heißt die gebildeten Olefine waren deutlich kürzer als bei den meisten anderen Gattungen der Ordnung. Außerdem waren sie hinsichtlich ihrer Olefin-Isomeren komplett unspezifisch und bildeten sogar im Vollmedium unverzweigte wie verzweigte Olefine. Der *Kytococcus*-Stamm nahm bezüglich der produzierten Kettenlängen eine Stellung zwischen dem *Micrococcus*- und dem *Kocuria*-Profil ein. Er bildete C22-C25, aber auch geringe Mengen C27-C29 Olefin-Kettenlängen. Sein Isomeren-Profil war dominiert von *iso*-Verzweigung und unverzweigten Olefinen. Der untersuchte *Rothia*-Stamm besaß im Vergleich zu *Micrococcus* eine noch stärkere Bevorzugung von *ai*-verzweigten Substraten und bildete bei gleichem Kettenlängen-Profil bei jeder Kettenlänge nur die *ai*-verzweigte Form. Im Anhang befinden sich alle einzelnen Olefin- und Fettsäureprofile der untersuchten Vertreter der hier gezeigten Olefin produzierenden Gattungen (Anhang 9.1. Abbildungen 77-81).

5.1.5. Physiologische Rolle der Olefine in *M. luteus*

5.1.5.1. Olefine als Wachstum bestimmender Faktor

Es wurde das Wachstumsvermögen von *M. luteus* bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit von der Fähigkeit zur Produktion von Olefinen bzw. in Abhängigkeit von Olefinen als Bestandteil der Zellmembran untersucht. Dazu wurden Wachstumskurven von *M. luteus* trpE16 und trpE16 Δ ole:kan, bei dem das *oleABCD*-Gencluster deletiert ist und somit keine Olefinproduktion möglich ist, in LB-Medium bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen aufgenommen.

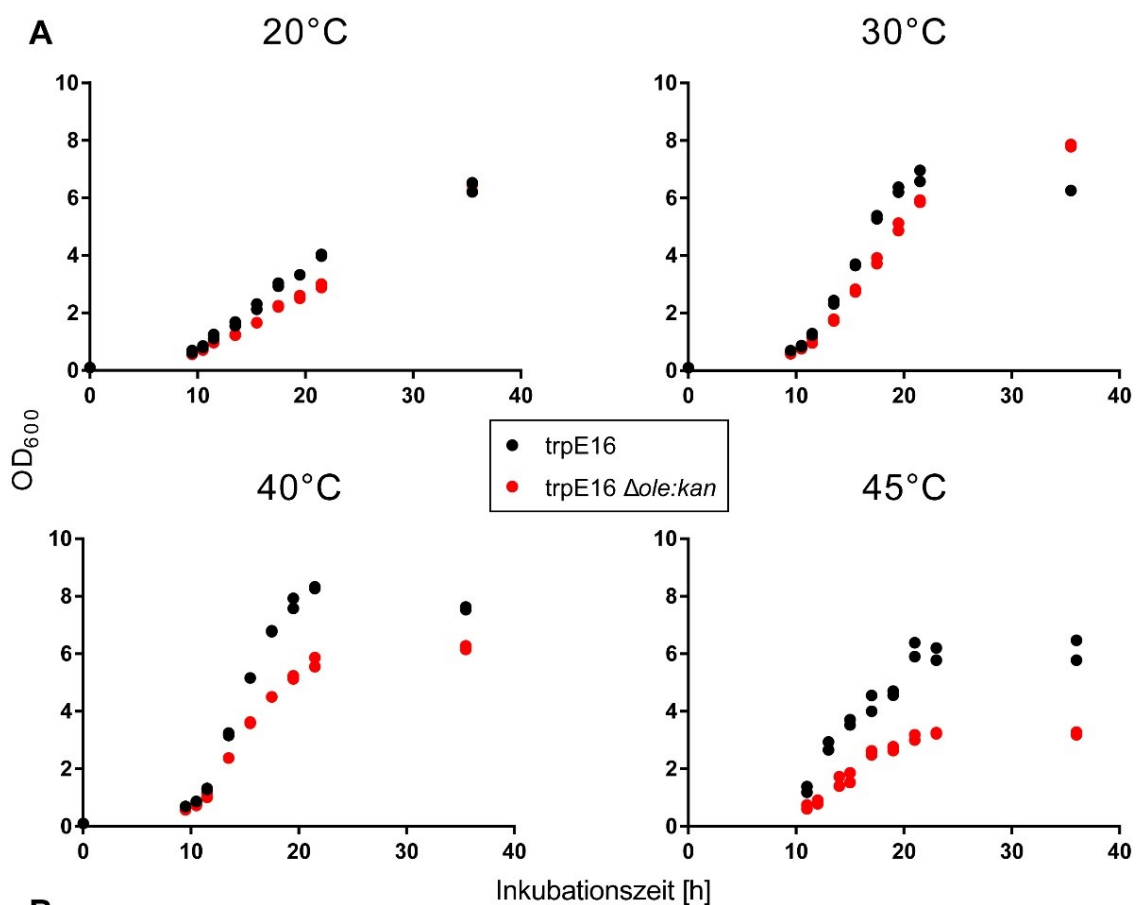


Abbildung 20: Wachstum von trpE16 und trpE16 Δ ole:kan in LB-Medium bei unterschiedlichen Temperaturen. In den in (A) dargestellten Wachstumskurven sind die Einzelmessungen von zwei biologischen Replikaten gezeigt. Daraus wurden die beschreibenden Wachstumskennzahlen berechnet (B). Abkürzungen: SD, Standardabweichung.

M. luteus trpE16 Δ ole:kan zeigte bei niedrigeren Temperaturen, wie in Abbildung 20 zu sehen, ein schwächeres Wachstum als trpE16 in Form einer geringeren Wachstumsrate bzw. höheren Verdopplungszeit. Die End-OD₆₀₀ war bei niedrigen Temperaturen nicht negativ beeinträchtigt. Der Wachstumsnachteil wurde mit steigenden Inkubationstemperaturen prägnanter, da neben schwächerer Wachstumskinetik auch ein Abfall der erreichten End-OD₆₀₀ auftrat.

Nachfolgend wurde untersucht wie *M. luteus* bei den verschiedenen Inkubationstemperaturen auf die Abwesenheit von Olefinen auf Fettsäure-Ebene reagiert (Abbildung 21).

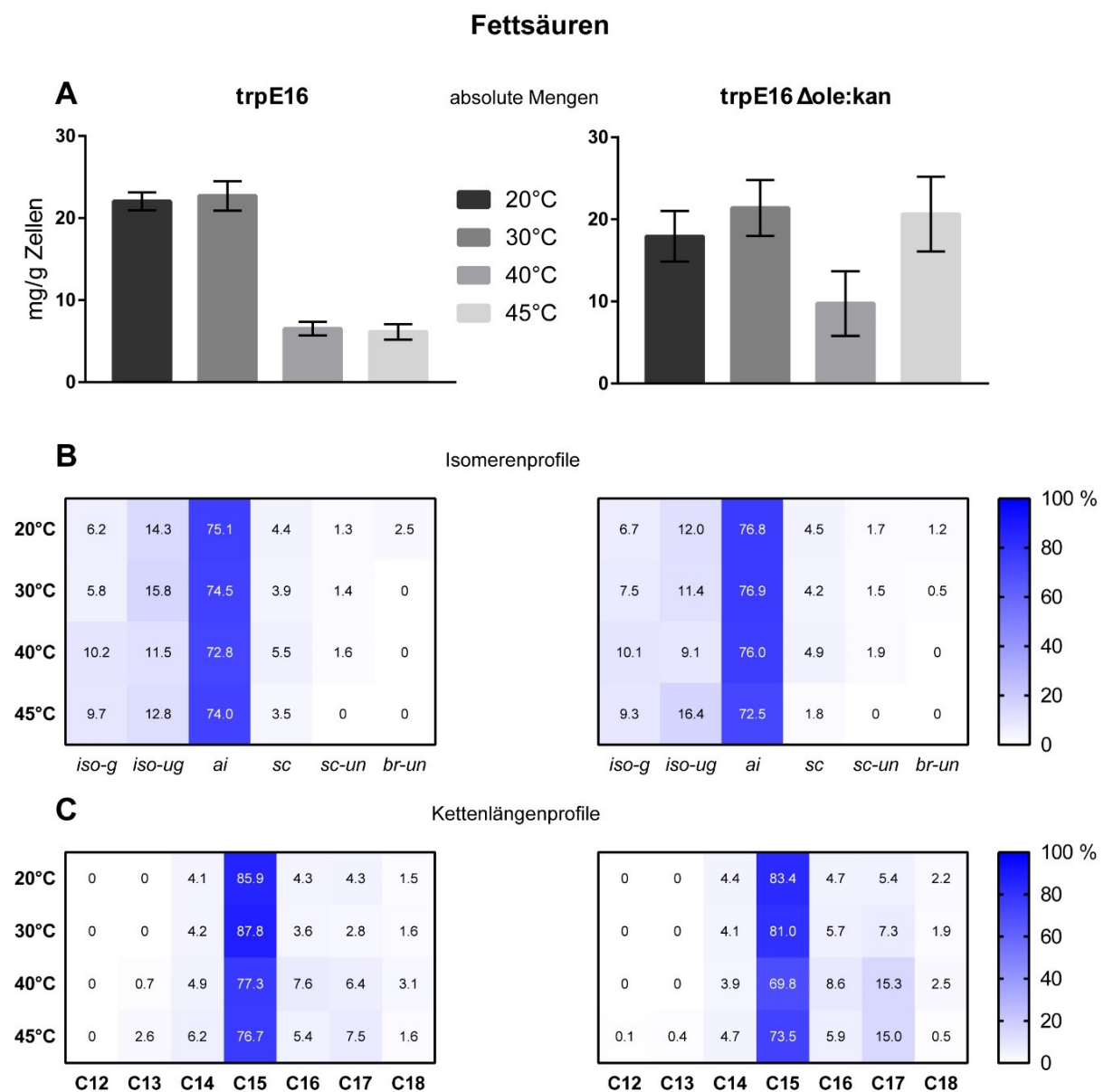


Abbildung 21: Fettsäureproduktion von *M. luteus* trpE16 und trpE16 Δ ole:kan in stationärer Phase nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen in LB-Medium. In (A) sind die absoluten Mengen in (B) die Isomeren- und in (C) die Kettenlängenprofile dargestellt. Aufgetragen wurden jeweils zwei biologische Replikate. Die Standardabweichung der Prozentwerte liegt bei maximal 4 %.

Bei 20 °C und 30 °C konnten keine entscheidenden Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung der Bakterienzelle zwischen *M. luteus* trpE16 und trpE16 Δ ole:kan festgestellt werden. Bei den höheren Inkubationstemperaturen dagegen wurde eine unterschiedliche Anpassung des Fettsäuregehaltes bei trpE16 Δ ole:kan gemessen. Die in verschiedenen *Bacillus*-Spezies bereits beobachteten typischen Anpassungen an höhere Temperaturen auf Fettsäureebene, nämlich Verschiebungen zu längeren und *iso*- bzw. *sc*-Lipidfettsäuren [68], waren bei *M. luteus* nur schwach ausgeprägt. Dagegen reagiert *M. luteus* auf die Abwesenheit der Bildung von Olefinen bei höheren Temperaturen durch eine Erhöhung des Fettsäuregehaltes. Gleichzeitig kam es im Gegensatz zu trpE16 bei trpE16 Δ ole:kan zu einer deutlich stärkeren Verschiebung des Fettsäureprofils zu längeren Kettenlängen. In Abschnitt „5.1.6.3. Der Faktor „Temperatur““ wurde der Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Olefinproduktion selbst untersucht.

5.1.5.2. Der Kohlenstoffbedarf der Olefinproduktion

Der Verbrauch der Kohlenstoffquellen Glukose und Glutamat im Naylor-Medium in Abhängigkeit von der Olefinproduktion wurde untersucht. Dazu wurden Wachstumskurven der *M. luteus*-Stämme trpE16, trpE16 ope (ein Stamm mit 2-3facher Olefinproduktion) und trpE16 Δ ole:kan (ein Stamm ohne Olefinproduktion) in Naylor-Medium aufgenommen. Dabei wurden in regelmäßigen Abständen auch Proben des Kulturüberstandes für die spätere Messung des Glukose- und Glutamat-Gehaltes genommen.

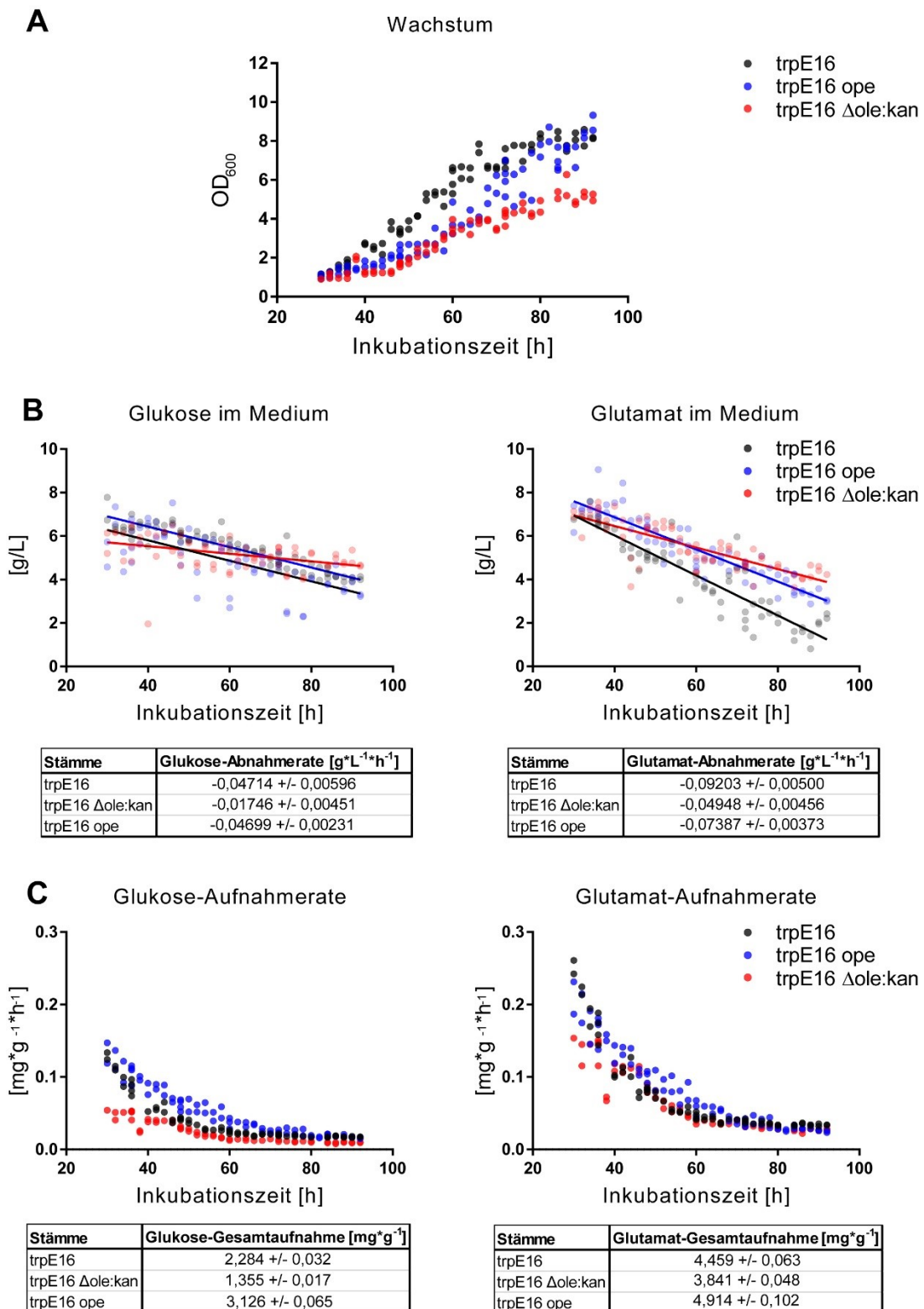


Abbildung 22: (A) Wachstumskurven von trpE16, trpE16 ope und trpE16 Δ ole:kan bei 30 °C in Naylor-Medium. Es sind jeweils die Einzelmessungen von zwei biologischen Replikaten aufgetragen (an den Überschneidungspunkten von um zwölf Stunden versetzten Kulturen sind vier biologische Replikate aufgetragen). (B) Gemessene Glukose- bzw. Glutamat-Konzentration in den Naylor-Kulturen der drei Stämme über die Inkubationszeit. Gezeigt sind die Einzelmessungen als transparente Punkte sowie die berechneten Trendlinien (linearer Fit). In den Tabellen darunter sind die Steigungen der Trendlinie bzw. die Glukose- oder Glutamat-Abnahmeraten im Medium angefügt. (C) Glukose- und Glutamat-Aufnahmeraten der drei Stämme über die Inkubationszeit im Naylor-Medium, die sich aus den OD₆₀₀-Werten zu einem bestimmten Zeitpunkt und den Glukose- bzw. Glutamat-Abnahmeraten im Medium ergeben. Dargestellt sind die Einzelmessungen. In den Tabellen darunter sind die berechneten Flächen unter der Kurve der Glukose- bzw. Glutamat-Aufnahmerate über die Zeit zwischen 30h und 92h Inkubationszeit bzw. die Gesamtaufnahme pro Gramm Zellen angefügt.

Für den Verlauf der Glukose- bzw. Glutamat-Konzentration im Naylor-Medium wurde für alle drei Stämme eine lineare Trendlinie ermittelt (Abbildung 22B), bei deren Steigung es sich um die Abnahmerate der jeweiligen Kohlenstoffquelle im Medium handelt. Diese stammspezifische Abnahmerate wurde gegen die Zellmenge zu einem bestimmten Zeitpunkt der Wachstumskurve (Abbildung 22A) normalisiert und die stammspezifische Glukose- bzw. Glutamat-Aufnahmerate pro Gramm Zellen über die Wachstumskurve berechnet. Bei der Fläche unter der Kurve der Glukose- bzw. Glutamat-Aufnahmerate pro Gramm Zellen über die Zeit handelt es sich um die Glukose- bzw. Glutamat-Gesamtaufnahme pro Gramm Zellen. Es zeigte sich, dass die Zellmengen-normalisierte Gesamtaufnahme für die Summe beider Kohlenstoffquellen für Stamm trpE16 ope $1,3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ größer war als für Stamm trpE16, dessen Aufnahme nochmal $1,5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ größer war als für Stamm trpE16 Δ ole:kan (Abbildung 22C). Dabei ist anzumerken, dass die Kohlenstoffaufnahme maßgeblich im Vorfeld der aktiven Olefinproduktion in der frühen exponentiellen Phase stattfand und in Richtung stationäre Phase zum Erliegen kam.

5.1.6. Einflussfaktoren auf die Olefinproduktion in *M. luteus*

Eine Reihe von Kulturbedingungen wurde auf eine potenzielle Beeinflussung der Olefinproduktion in *M. luteus* hin untersucht. Die Bedingungen Oberflächenwachstum, Stickstoffverfügbarkeit und Inkubationstemperatur zeigten deutliche Auswirkungen auf die Olefinproduktion und sollen im Folgenden näher besprochen werden. Die Bedingungen pH-Wert, Lichtintensität, Salzkonzentration, Detergenzien-Zusatz und Zusatz von Stressfaktoren wie Wasserstoffperoxid verursachten keine eindeutigen Änderungen des Olefingehalts in *M. luteus* (Daten nicht gezeigt).

5.1.6.1. Die Bedingung „Oberflächenwachstum“

Zur Untersuchung des Faktors Oberflächen- oder planktonisches Wachstum wurden unter Benutzung derselben LB-Vorkultur zum einen LB-Flüssigkulturen angeimpft sowie verschiedene Verdünnungen der Vorkultur auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Kulturen wurden bis zur Bildung eines geschlossenen Bakterienrasens für ca. 72 h bei 30 °C bzw. bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden Zellen von den Agarplatten geschabt und in demineralisiertem Wasser resuspendiert. Gleiche Zellmengen der Flüssigkulturen sowie der resuspendierten Oberflächen-gewachsenen Zellsuspensionen wurden zur Olefinextraktion herangezogen.

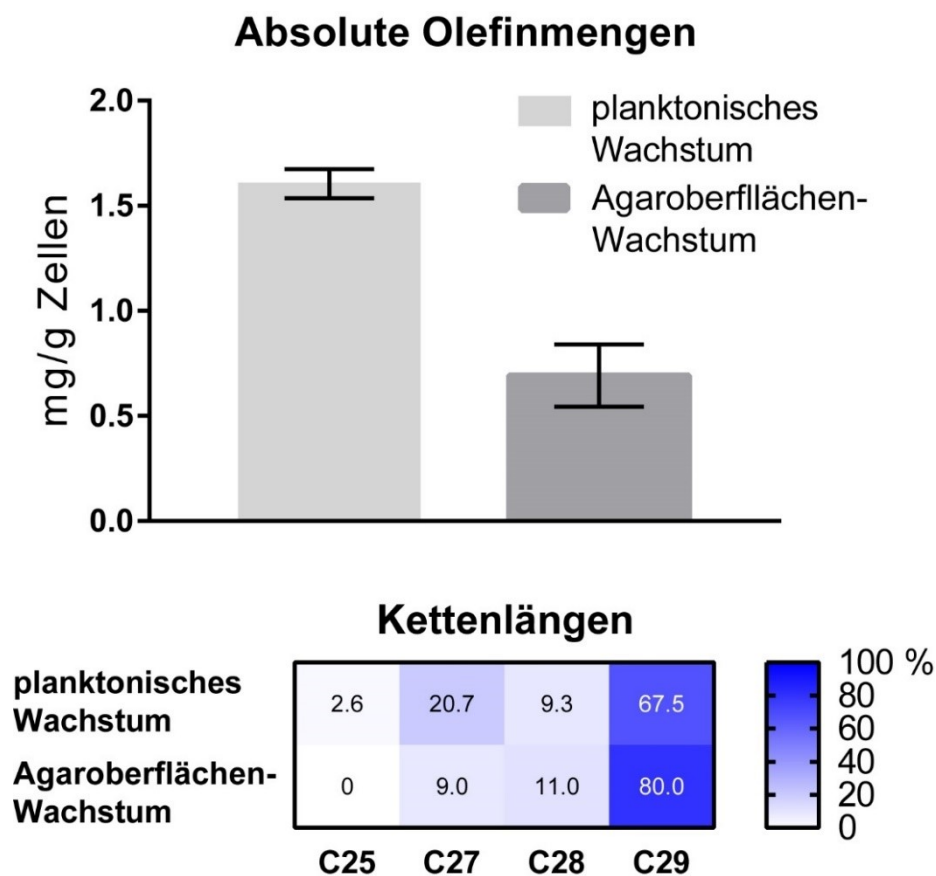


Abbildung 23: Vergleich der Olefinbildung nach Wachstum in Suspension oder auf fester Oberfläche. Die absoluten Olefinmengen sowie die Verteilung der Kettenlängen von 48h planktonisch in LB-Medium bzw. auf LB-Agaroberfläche gewachsenen *M. luteus* trpE16 Zellen sind aufgetragen. Es sind zwei biologische Replikate gezeigt. Die Standardabweichung der Prozentwerte lag bei maximal 10 %.

Die auf der Agaroberfläche gewachsenen Zellen wiesen deutliche Unterschiede im Olefingehalt gegenüber den planktonisch gewachsenen Zellen auf (Abbildung 23). Ihre produzierte Olefinmenge entsprach nur 50 % der Menge der planktonisch gewachsenen Zellen und sie wiesen deutlich geringere Anteile kürzerer Kettenlängen zu Gunsten der C29-Olefine auf.

5.1.6.2. Der Faktor „Stickstoffangebot“

Das verwendete Minimal-Medium (Naylor-Medium) enthält neben Glutamat auch Ammoniumchlorid als mögliche Stickstoffquelle. Die Stickstoff-Konzentration des Mediums bestimmt den erreichten End-OD₆₀₀ einer Kultur und kann zur Optimierung der Lipidproduktion eingesetzt werden [42]. Trotz der zweiten Kohlenstoffquelle Glukose im Medium ist die Glutamat-Konzentration für *M. luteus* wachstumslimitierend, wie vorangegangene Arbeiten gezeigt haben. Zur Austestung der Stickstoffverfügbarkeit wurde daher die Konzentration der zusätzlichen Stickstoffquelle Ammoniumchlorid im Medium zwischen 0 und 10 g/L variiert (die verwendete Stickstoffkonzentration des normalen Naylor-Mediums ist 5 g/L). Der pH-Wert des Mediums blieb gleich.

Mit 0 g/L NH₄Cl fand in *M. luteus* trpE16 eine basale Olefinproduktion statt. Dieser Spiegel der Olefinproduktion war konstant bis zu einer Konzentration von 2 g/L. Ab 5 g/L und bis 10 g/L zusätzlichem Ammoniumchlorid stieg die Olefinproduktion um bis zu 300 % an (Abbildung 24A). Gleichzeitig zur absoluten Steigerung der Olefinproduktion kam es zu Verschiebungen des produzierten Olefinprofils von *aiai*-Olefinen zu *isoiso*-Olefinen und zu einem Verlust der Kettenlängenspezifität (Abbildung 24B und 24C). Die Veränderung der absoluten Mengen und der Isomeren konnten auch auf Fettsäureebene beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass bei erhöhter Stickstoffverfügbarkeit (≥ 2 g/L) die Lipidsynthese nachhaltig gehemmt und dadurch weitere Fettsäuren für die Olefinsynthese verfügbar werden [42], [69]. Da sich bei den bisher getesteten Konzentrationen von Ammoniumchlorid noch kein Plateau der produzierten Olefinmenge abzeichnet, ist die Olefinproduktion bei noch höheren Stickstoff-Konzentrationen zu untersuchen.

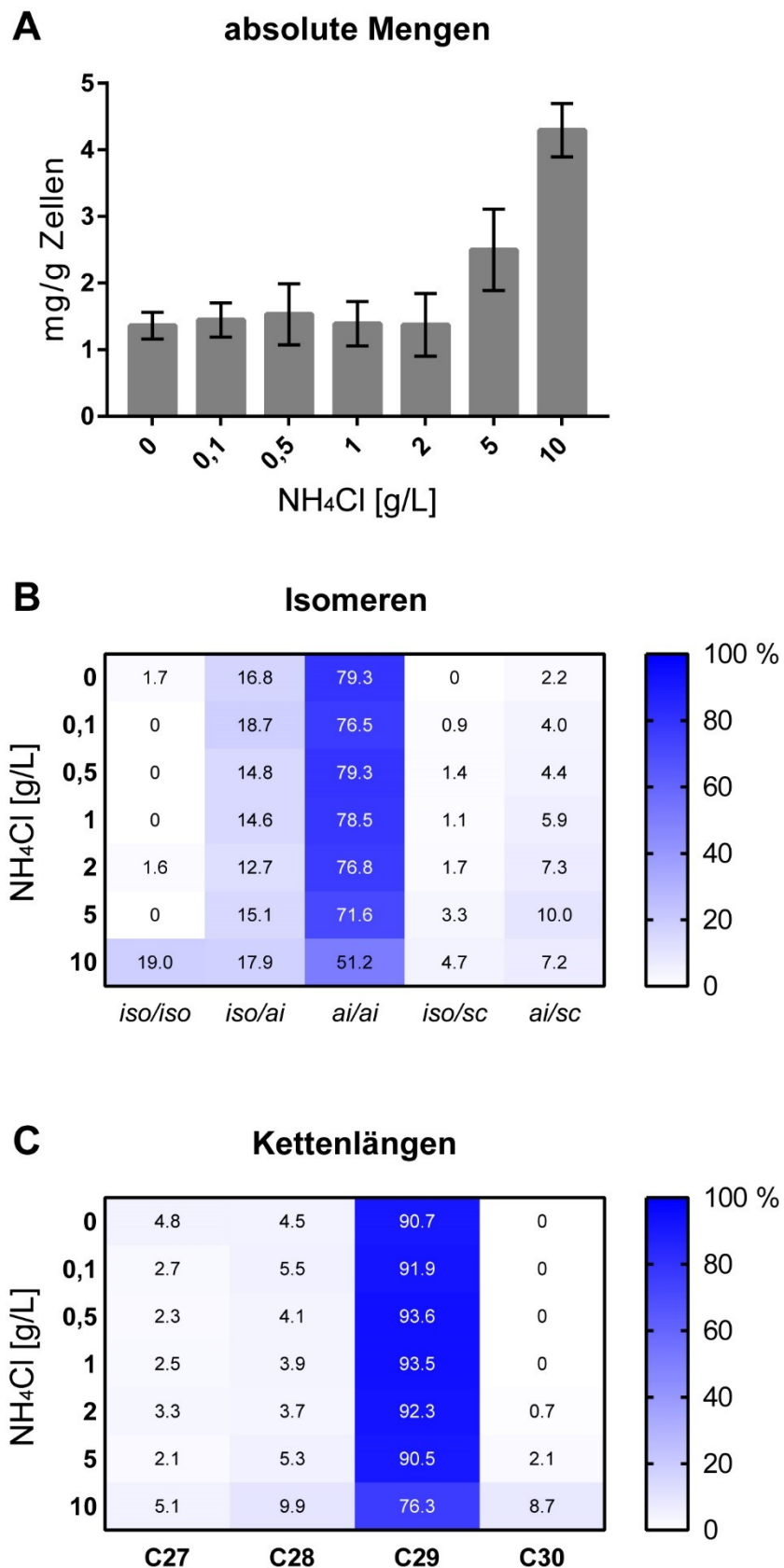


Abbildung 24: Olefinbildung in Abhängigkeit der NH₄Cl-Konzentration. In (A) ist der Olefingehalt in absoluten Mengen, in (B) die Verteilung der Isomeren und in (C) ist die Verteilung der Kettenlängen von *M. luteus* trpE16 in stationärer Phase nach Wachstum in Naylor-Medium mit unterschiedlichen NH₄Cl-Konzentrationen dargestellt. Es sind zwei biologische Replikate aufgetragen. Die Standardabweichung der Prozentwerte ist maximal 17 % (i.d.R. 1-3 %).

5.1.6.3. Der Faktor „Temperatur“

Die Anpassungen an tiefe oder hohe Temperaturen der Bakterien-Membran anhand der Kettenlänge, des Sättigungsgrades oder Verzweigung der Fettsäuren [68] war in *M. luteus* nur schwach ausgeprägt (siehe Abbildung 21 links). Daher war der Blick auf die Olefin-Komposition bei verschiedenen Temperaturen interessant. Es wurden Kulturen von *M. luteus* trpE16 in LB-Medium bei verschiedenen Temperaturen inkubiert.

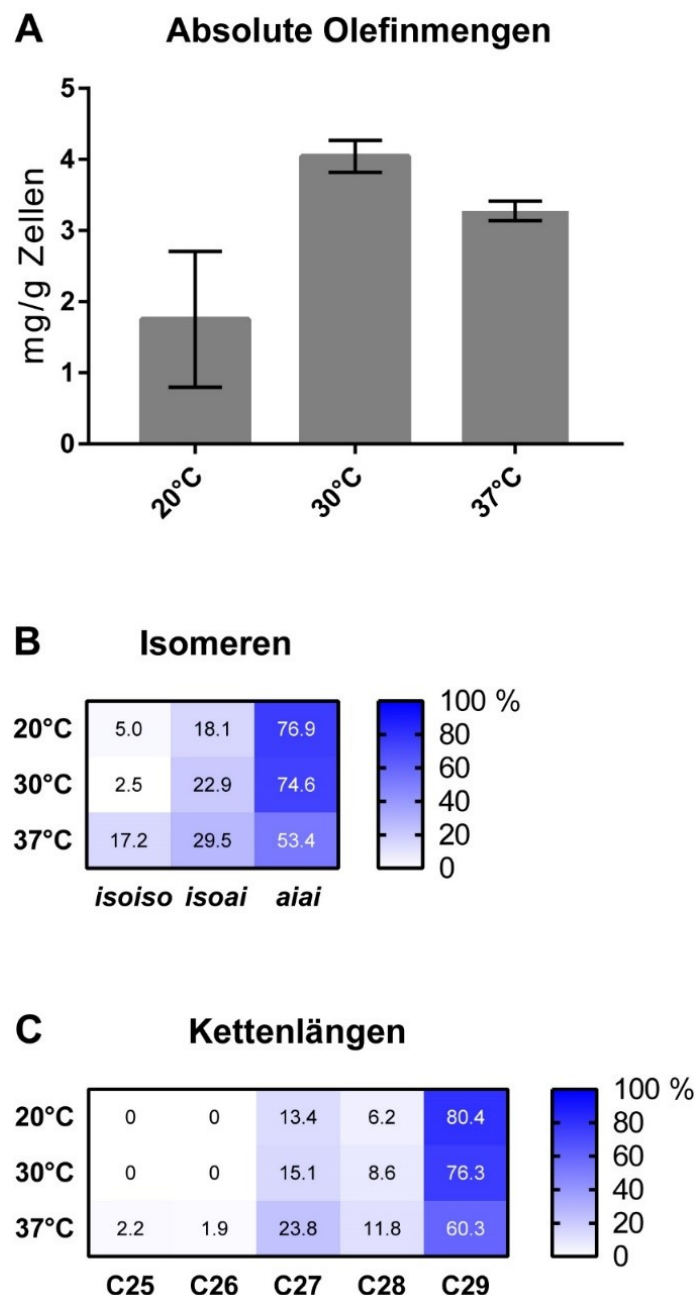


Abbildung 25: (A) Olefingehalt in absoluten Mengen, (B) Verteilung der Isomeren und (C) Verteilung der Kettenlängen von *M. luteus* trpE16 in stationärer Phase nach Wachstum in LB-Medium bei verschiedenen Inkubationstemperaturen. Es sind zwei technische Replikate aufgetragen. Die Standardabweichung der Prozentwerte beträgt maximal 7 % (i.d.R. weniger als 1 %).

Für die absolute Menge an produzierten Olefinen besaß *M. luteus* offenbar bei 30 °C ein Optimum. Denn sowohl bei niedrigeren (stärker) als auch bei höheren Temperaturen fiel die Olefinmenge ab (Abbildung 25A), was andeutete, dass die Funktion der Olefine bei niederen Temperaturen weniger relevant war. Das Olefinprofil änderte sich nur bei höheren Temperaturen in deutlicher Weise. Es waren deutliche Verschiebungen von der *aia*- zur *isoiso*-Olefinproduktion sowie von höheren zu kürzeren Kettenlängen zu beobachten (Abbildung 25B und 25C). Die Verschiebung von *ai*- zu *iso*-Verzweigung entsprach der klassischen Anpassung von Lipid-Fettsäuren an höhere Temperaturen, während die Verschiebung zu kürzeren Kettenlängen möglicherweise nur die Folge des Mangels längerer Substrate durch die gleichzeitige Anpassung an höhere Temperaturen auf Ebene der Lipide war.

5.2. Optimierung des Stoffwechsels von *M. luteus* zur Olefinproduktion

5.2.1. Ungezielte Optimierung der Olefinsynthese

5.2.1.1. Überprüfung von Regulator-Deletions-Mutanten

In früheren Arbeiten wurden insgesamt 73 Transkriptions-Regulatoren, Sigma-Faktoren (Mlut_06380, Mlut_06410, Mlut_07700, Mlut_14710, Mlut_17340) und Histidin-Kinasen (Mlut_02990, Mlut_04120, Mlut_14100, Mlut_14630, Mlut_14760, Mlut_16240, Mlut_17350, Mlut_18370, Mlut_18540, Mlut_21840, Mlut_21860, Mlut_22040) bzw. Histidin-Phosphatasen (Mlut_03360), die im sequenzierten Genom von *M. luteus* annotiert sind bzw. durch Blast-Suche gefunden wurden, systematisch mit einer Kanamycin-Kassette ausgetauscht. In dieser Arbeit wurden einzelne Regulator-Mutanten hinzugefügt, aber vor allem die Mutanten auf einen möglichen Einfluss des ausgeschalteten Regulators auf die Fettsäure- und Olefinsynthese hin untersucht. Proben für Fettsäure- und Olefinextraktion wurden in stationärer Phase nach Wachstum in LB- und Naylor- (Minimal-) Medium genommen. Die gewonnenen Daten wurden hinsichtlich der Veränderung der absoluten Mengen, der Isomeren- und Kettenlängen-Verteilung von Fettsäuren und Olefinen ausgewertet.

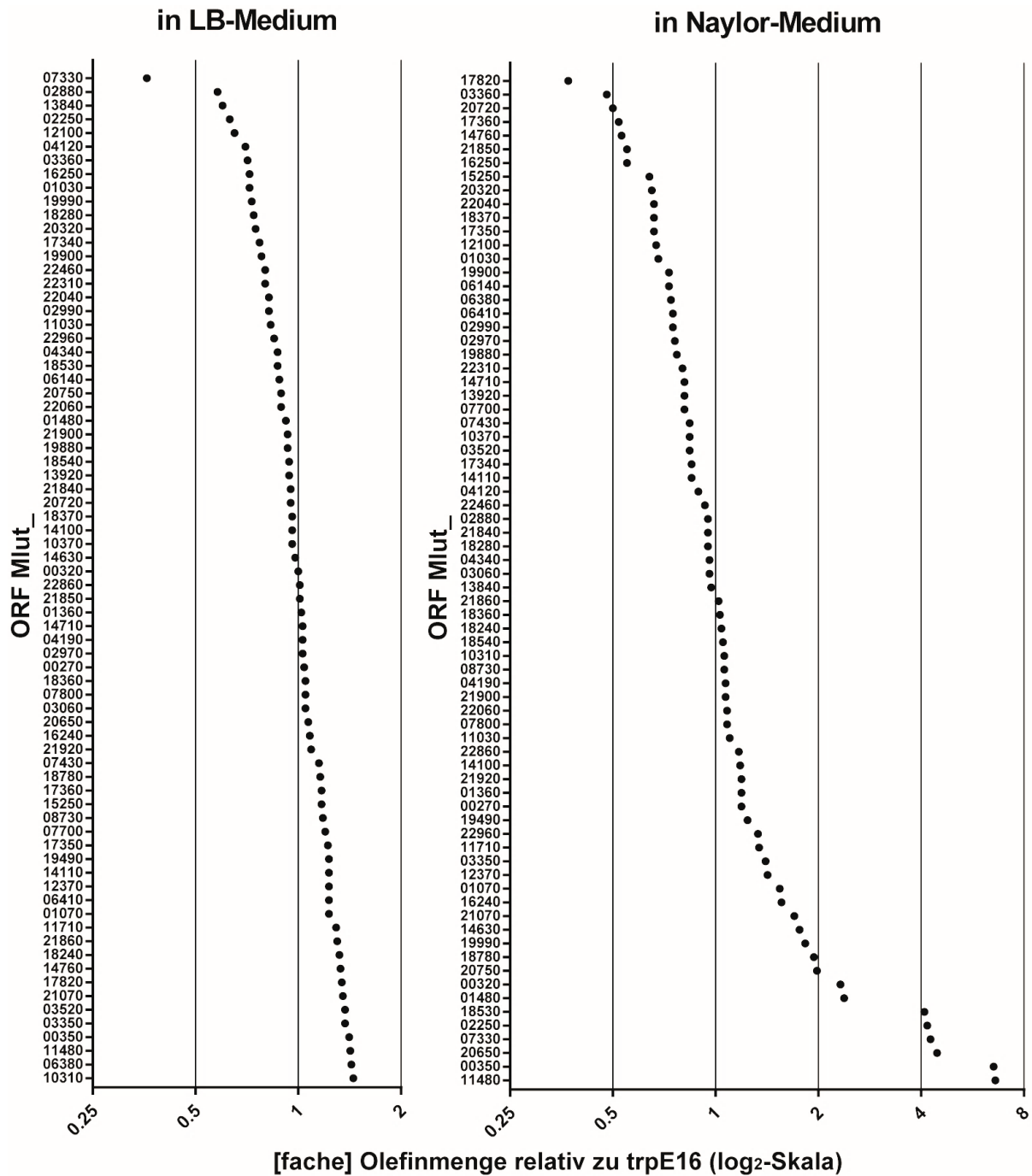


Abbildung 26: Änderung der absoluten Olefinmenge von Mutanten mit einzelnen ausgeschalteten Regulator-Genen in der stationären Phase nach Wachstum in LB-Medium (links) oder in Naylor-Medium (rechts) relativ zum Ausgangsstamm *M. luteus* trpE16. Aufgetragen sind repräsentative Mittelwerte von mindestens zwei biologischen Replikaten. Auf der Y-Achse sind die ORF-Nummern der ausgeschalteten Regulator-Gene aufgelistet.

Die Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium (Abbildung 26 rechts) zu starker Olefinproduktion führte, sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Regulatorgene, deren Deletion im Minimal-Medium zu erhöhter Olefinproduktion führte.

ORF	[fache] Olefinmenge relativ zu trpE16	<i>in silico</i> -Analyse
00320	2,3	AraC-Familie
00350	6,5	TetR-Familie
01480	2,4	MarR-Familie, Cluster mit Membran-Transportern
02250	4,2	IcIR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Stoffwechsel
07330	4,3	LexA-Familie, (siehe folgender Abschnitt)
11480	6,6	ArsR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Membran-Transporter
18530	4,1	NarL/FixJ-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Membran-Transporter
20650	4,5	ArsR-Familie, Cluster mit Cadmium-Transporter

Die Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium (Abbildung 26 rechts) zu schwacher Olefinproduktion führte, sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium zu schwacher Olefinproduktion führte.

ORF	[fache] Olefinmenge relativ zu trpE16	<i>in silico</i> -Analyse
17820	0,4	AsnC-Familie, Regulator-Familie des Aminosäure-Stoffwechsels, genomischer Hintergrund mit Genen für Membran-Transporter und Akteure des zentralen Kohlenstoff-Stoffwechsels
03360	0,5	Histidin-Phosphatase

Im LB-Medium (Abbildung 26 links) konnte trpE16 Δ 07330:kan (LexA-Familie) mit 36 %iger Olefinproduktion als äußerst schwacher Produzent beobachtet werden (siehe folgender Abschnitt).

Die Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium (Abbildung 26 links) zu starker Olefinproduktion führte, sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium zu erhöhter Olefinproduktion führte.

ORF	[fache] Olefinmenge relativ zu trpE16	<i>in silico</i> -Analyse
10310	1,5	tetR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Transporter und -Stoffwechsel
11480	1,4	ArsR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Membran-Transporter

Die Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium (Abbildung 27 links) zu starker Fettsäureproduktion führte, sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium zu erhöhter Fettsäureproduktion führte.

ORF	[fache] Fettsäuremenge relativ zu trpE16	<i>in silico</i> -Analyse
00320	1,6	AraC-Familie
01480	1,9	MarR-Familie, Cluster mit Membran-Transportern
07330	2,2	LexA-Familie, (siehe folgender Abschnitt)
08730	1,7	IclR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Leucin-Biosynthese
10310	2,0	TetR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Transporter und -Stoffwechsel
10370	1,8	LysR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Transporter und -Stoffwechsel
11030	1,8	Response-Regulator, im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Stoffwechsel und anorganischeTransporter
18530	1,7	NarL/FixJ-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Membran-Transporter
20320	2,2	TetR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Fettsäure- oder Aminosäureabbau

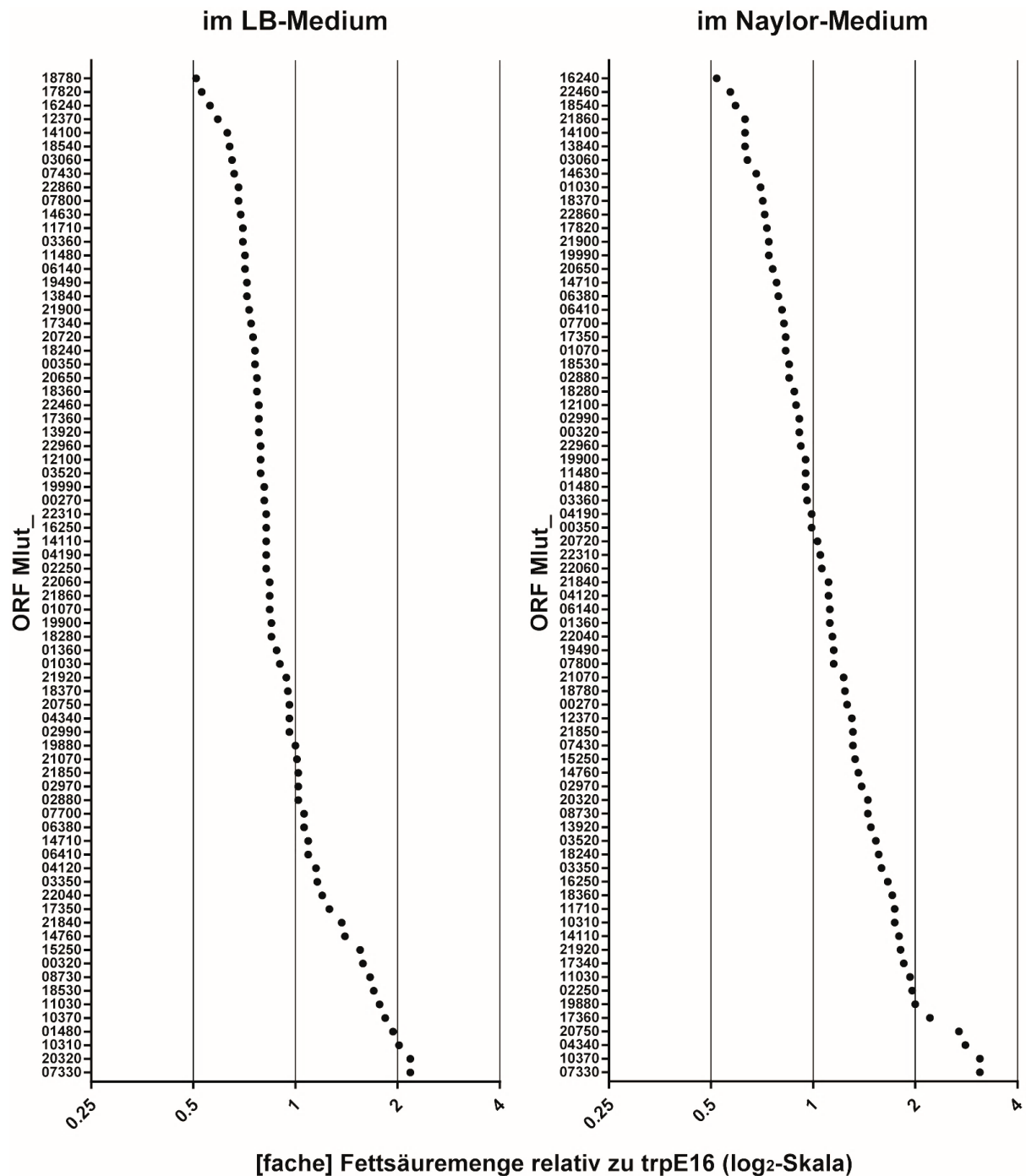


Abbildung 27: Änderung der absoluten Fettsäure-Menge von Mutanten mit einzelnen ausgeschalteten Regulator-Genen in der stationären Phase nach Wachstum in LB-Medium (links) oder in Naylor-Medium (rechts) relativ zum Ausgangsstamm *M. luteus* trpE16. Aufgetragen sind repräsentative Mittelwerte von mindestens zwei biologischen Replikaten. Auf der Y-Achse sind die ORF-Nummern der ausgeschalteten Regulator-Gene aufgelistet.

Die Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium (Abbildung 27 links) zu schwacher Fettsäureproduktion führte, sind in Tabelle 24 zusammengefasst:

Tabelle 24: Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium zu schwacher Fettsäureproduktion führte.

ORF	[fache] Fettsäuremenge relativ zu trpE16	<i>in silico</i> -Analyse
17820	0,5	AsnC-Familie, Regulator-Familie des Aminosäure-Stoffwechsels, genomischer Hintergrund mit Genen für Membran-Transporter und Akteure des zentralen Kohlenstoff-Stoffwechsels
18780	0,5	MerR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Transporter

Die Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium (Abbildung 27 rechts) zu starker Fettsäureproduktion führte, sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium zu starker Fettsäureproduktion führte.

ORF	[fache] Fettsäuremenge relativ zu trpE16	<i>in silico</i> -Analyse
04340	2,8	im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Transport sowie -Stoffwechsel
07330	3,1	LexA-Familie, (siehe folgender Abschnitt)
10370	3,1	LysR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Transporter und -Stoffwechsel

Die Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium (Abbildung 27 rechts) zu schwacher Fettsäureproduktion führte, sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26: Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium zu schwacher Fettsäureproduktion führte.

ORF	[fache] Fettsäuremenge relativ zu trpE16	<i>in silico</i> -Analyse
16240	0,5	Histidin-Kinase
22460	0,6	LacI-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Kohlenhydrat-Transporter

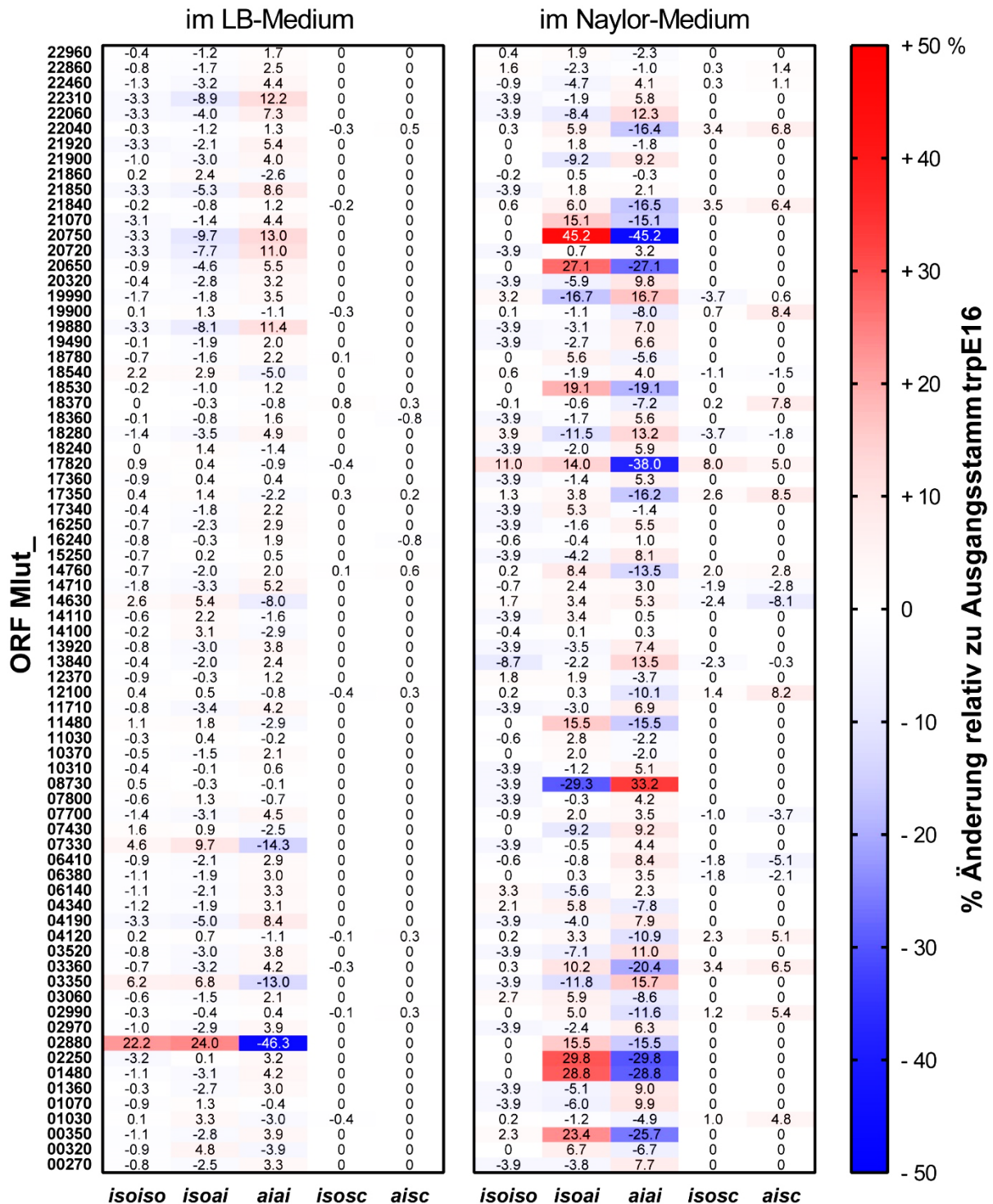


Abbildung 28: Prozentuale Änderung der Verteilung der Olefin-Isomeren von Mutanten mit einzelnen ausgeschalteten Regulator-Genen in der stationären Phase nach Wachstum in LB-Medium (links) oder in Naylor-Medium (rechts) gegenüber dem Ausgangsstamm *M. luteus* trpE16. Aufgetragen sind repräsentative Mittelwerte von mindestens zwei biologischen Replikaten. Auf der Y-Achse sind die ORF-Nummern der ausgeschalteten Regulator-Gene aufgelistet.

Die Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium (Abbildung 28 links) zu starken *isoiso*-Verschiebungen der Olefin-Isomeren führte, sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium zu *isoiso*-Verschiebungen der Olefin-Isomeren führte.

ORF	<i>in silico</i> -Analyse
02880	MarR-Familie, (siehe folgender Abschnitt)
03350	Response-Regulator
07330	LexA-Familie, (siehe folgender Abschnitt)
14630	Histidin-Kinase

Die Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium (Abbildung 28 links) zu starken *aiai*-Verschiebungen der Olefin-Isomeren führte, sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28: Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium zu *aiai*-Verschiebungen der Olefin-Isomeren führte.

ORF	<i>in silico</i> -Analyse
19880	FadR-Familie, Fettsäurestoffwechsel regulierende Regulator-Familie
20720	IscR- Familie
20750	LysR/ArgP Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Arginin- und Lysin-Stoffwechsel
22310	TetR-Familie

Die Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium (Abbildung 28 rechts) zu starken *isoiso*-Verschiebungen der Olefin-Isomeren führte, sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium zu *isoiso*-Verschiebungen der Olefin-Isomeren führte.

ORF	<i>in silico</i> -Analyse
00350	TetR-Familie
01480	MarR-Familie, Cluster mit Membran-Transportern
02250	IcIR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Stoffwechsel
17820	AsnC-Familie, Regulator-Familie des Aminosäure-Stoffwechsels, genomischer Hintergrund mit Genen für Membran-Transporter und Akteure des zentralen Kohlenstoff-Stoffwechsels
18530	NarL/FixJ-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Membran-Transporter
20650	ArsR-Familie, Cluster mit Cadmium-Transporter
20750	LysR/ArgP Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Arginin- und Lysin-Stoffwechsel

Im Naylor-Medium zeigte nur *trpE16* Δ08730:kan (IcIR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Leucin-Biosynthese) eine deutliche Verschiebung von *isoiso*- zu *ai*-Olefinen.

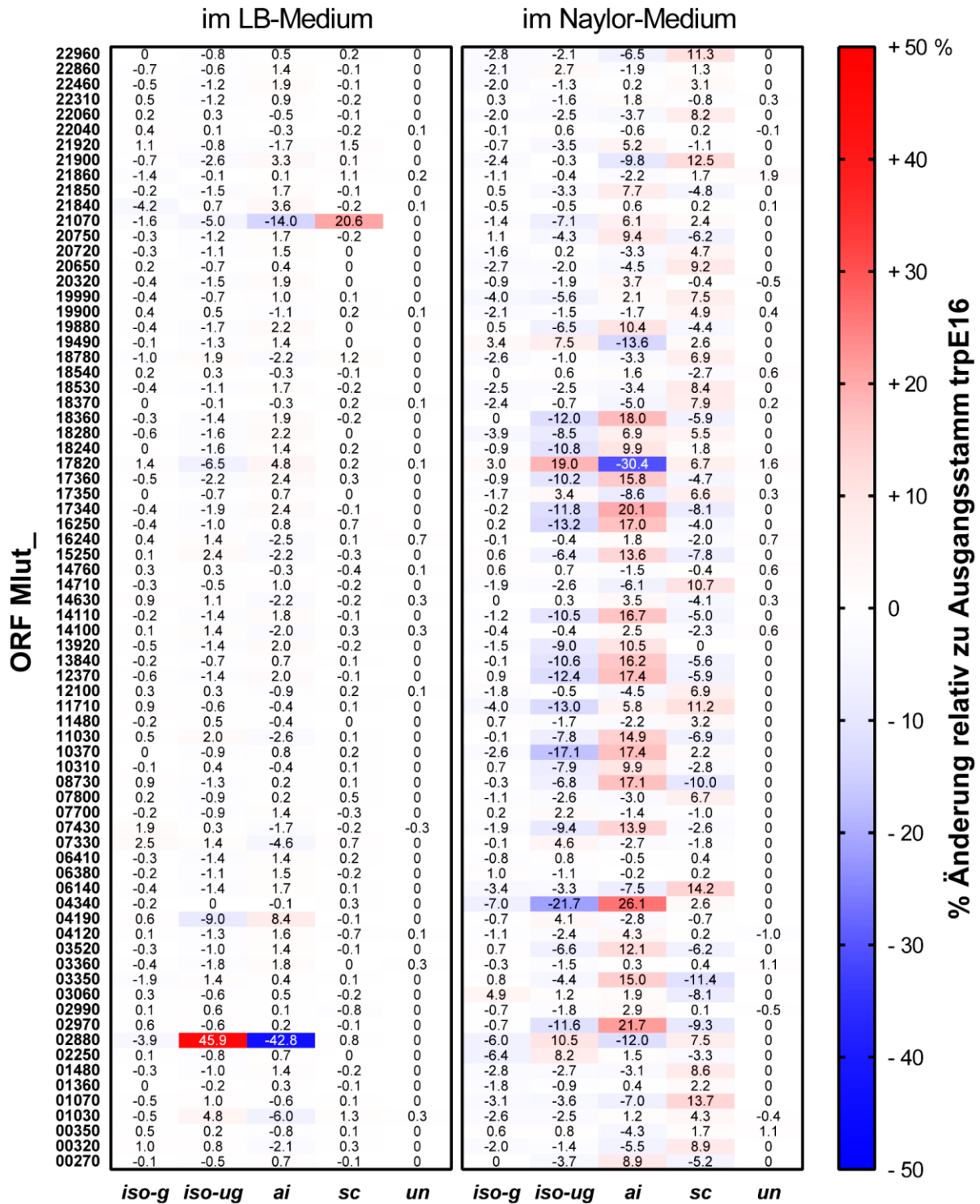


Abbildung 29: Prozentuale Änderung der Verteilung der Fettsäure-Isomeren von Mutanten mit einzelnen ausgeschalteten Regulator-Genen in der stationären Phase nach Wachstum in LB-Medium (links) oder in Naylor-Medium (rechts) gegenüber dem Ausgangsstamm *M. luteus* *trpE16*. Aufgetragen sind repräsentative Mittelwerte von mindestens zwei biologischen Replikaten. Auf der Y-Achse sind die ORF-Nummern der ausgeschalteten Regulator-Gene aufgelistet.

Im LB-Medium konnte mit *trpE16* Δ 02880:kan (MarR-Familie, (siehe folgender Abschnitt)) eine Mutante mit deutlicher Verschiebung zu ungeradzahligen *iso*-verzweigten Fettsäuren (Leucin-Derivate) sowie mit *trpE16* Δ 21070:kan (MarR Familie) eine Mutante mit Verschiebung zur Produktion von unverzweigten Fettsäuren identifiziert werden (Abbildung 29 links).

Die Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium (Abbildung 29 rechts) zu starken Verschiebungen zu ungeradzahligen *iso*-verzweigten Fettsäuren (Leucin-Derivate) führte, sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Tabelle 30: Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium zu Verschiebungen zu ungeradzahligen *iso*-verzweigten Fettsäuren (Leucin-Derivate) führte.

ORF	<i>in silico</i> -Analyse
02880	MarR-Familie, (siehe folgender Abschnitt)
17820	AsnC-Familie, Regulator-Familie des Aminosäure-Stoffwechsels, genomischer Hintergrund mit Genen für Membran-Transporter und Akteure des zentralen Kohlenstoff-Stoffwechsels

Die Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium (Abbildung 29 rechts) zu starken Verschiebungen zu *ai*-verzweigten Fettsäuren (Isoleucin-Derivate) führte, sind in Tabelle 31 zusammengefasst.

Tabelle 31: Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium zu Verschiebungen zu *ai*-verzweigten Fettsäuren (Isoleucin-Derivate) führte.

ORF	<i>in silico</i> -Analyse
02970	Response-Regulator der LuxR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Isoleucin- und Valin-Abbau
04340	im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Transport sowie -Stoffwechsel
17340	Response-Regulator der LuxR-/Sigma-Faktor der Sigma-70-Familie

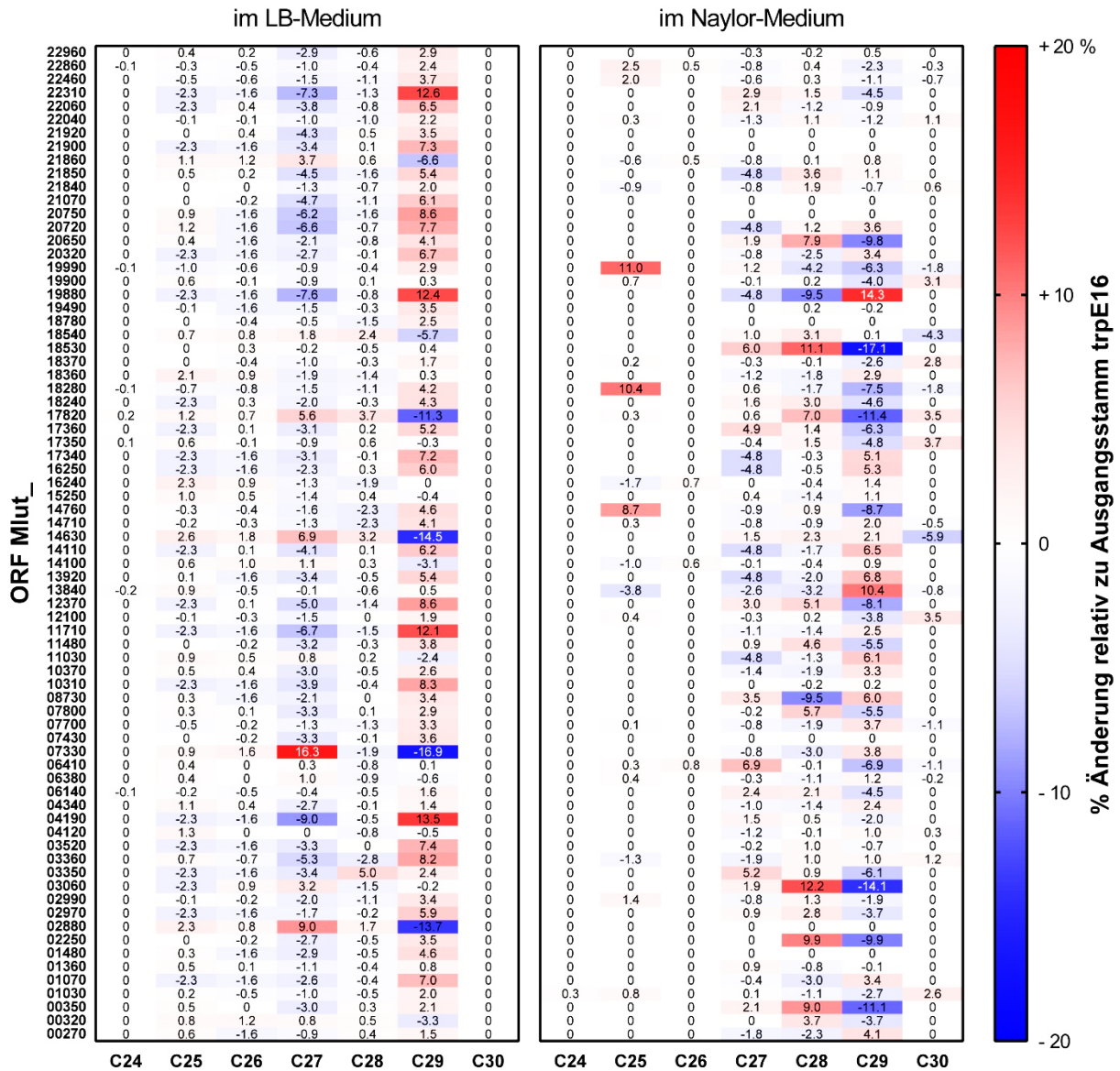


Abbildung 30: Prozentuale Änderung der Verteilung der Olefin-Kettenlängen von Mutanten mit einzelnen ausgeschalteten Regulator-Genen in der stationären Phase nach Wachstum in LB-Medium (links) oder in Naylor-Medium (rechts) gegenüber dem Ausgangsstamm *M. luteus* trpE16. Aufgetragen sind repräsentative Mittelwerte von mindestens zwei biologischen Replikaten. Auf der Y-Achse sind die ORF-Nummern der ausgeschalteten Regulator-Gene aufgelistet.

Die Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium (Abbildung 30 links) zu starken Verschiebungen zu längeren Olefinen führte, sind in Tabelle 32 zusammengefasst.

Tabelle 32: Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium zu Verschiebungen zu längeren Olefin-Ketten führte.

ORF	<i>in silico</i> -Analyse
04190	Kein Ergebnis
11710	TetR Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen der β -Oxidation
19880	FadR-Familie, Fettsäurestoffwechsel regulierende Regulator-Familie
22310	TetR-Familie

Die Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium (Abbildung 30 links) zu starken Verschiebungen zu kürzeren Olefinen führte, sind in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33: Regulatorgene, deren Deletion im LB-Medium zu Verschiebungen zu kürzeren Olefin-Ketten führte.

ORF	<i>in silico</i> -Analyse
02880	MarR-Familie, (siehe folgender Abschnitt)
07330	LexA-Familie, (siehe folgender Abschnitt)
14630	Histidin-Kinase
17820	AsnC-Familie, Regulator-Familie des Aminosäure-Stoffwechsels, genomischer Hintergrund mit Genen für Membran-Transporter und Akteure des zentralen Kohlenstoff-Stoffwechsels

Die Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium (Abbildung 30 rechts) zu starken Verschiebungen zu längeren Olefinen führte, sind in Tabelle 34 zusammengefasst.

Tabelle 34: Regulatorgene, deren Deletion im Naylor-Medium zu Verschiebungen zu längeren Olefin-Ketten führte.

ORF	<i>in silico</i> -Analyse
13840	MerR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für β -Oxidation, Lipidsynthese und des zentralen Kohlenstoff-Stoffwechsels
19880	FadR-Familie, Fettsäurestoffwechsel regulierende Regulator-Familie

Die Regulorgene, deren Deletion im Naylor-Medium (Abbildung 30 rechts) zu starken Verschiebungen zu kürzeren Olefinen führte, sind in Tabelle 35 zusammengefasst.

Tabelle 35: Regulorgene, deren Deletion im Naylor-Medium zu Verschiebungen zu kürzeren Olefin-Ketten führte.

ORF	<i>in silico</i> -Analyse
02250	IcIR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Stoffwechsel
03060	TetR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Abbau und β -Oxidation
18280	crp Familie
18530	NarL/FixJ-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Membran-Transporter

Die Regulorgene, deren Deletion im Naylor-Medium (Abbildung 31 rechts) zu Verschiebungen zu kürzeren Fettsäuren-Kettenlängen führte, sind in Tabelle 36 zusammengefasst.

Tabelle 36: Regulorgene, deren Deletion im Naylor-Medium zu Verschiebungen zu kürzeren Fettsäure-Ketten führte.

ORF	<i>in silico</i> -Analyse
03350	Response-Regulator
11710	TetR Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen der β -Oxidation

Im Naylor-Medium konnte mit trpE16 Δ 02250:kan (IcIR-Familie, im genomischen Hintergrund mit Genen für Aminosäure-Stoffwechsel) außerdem eine Mutante mit Verschiebungen von geradzahigen zu ungeradzahigen Fettsäuren identifiziert werden (Abbildung 31 rechts). Im LB-Medium konnte mit trpE16 Δ 21070:kan (MarR Familie) eine Mutante mit Verschiebungen von ungeradzahigen zu geradzahigen Fettsäure-Kettenlängen identifiziert werden (Abbildung 31 links).

Die beobachteten Olefin- und Fettsäure-Phänotypen (absolute Mengen, Isomeren- und Kettenlängen-Profile) in Folge von Regulator-Deletionen konnten in Einzelfällen mit der benachbarten Lage zu und mögliche regulatorische Wirkung auf konkrete Gene verzweigter Aminosäure-Stoffwechselwege (Leucin-, Isoleucin- und Valin-Stoffwechsel), die die Quelle für verzweigte Fettsäure-Primer-Moleküle darstellen, erklärt werden (Mlut_02880 oder Mlut_08730).

Weitere deletierte Regulatoren liegen benachbart zu gut annotierten Genen der β -Oxidation (Mlut_03060 oder Mlut_11710) und erlaubten entsprechende Erklärungsversuche für beobachtete Olefin- und Fettsäure-Phänotypen.

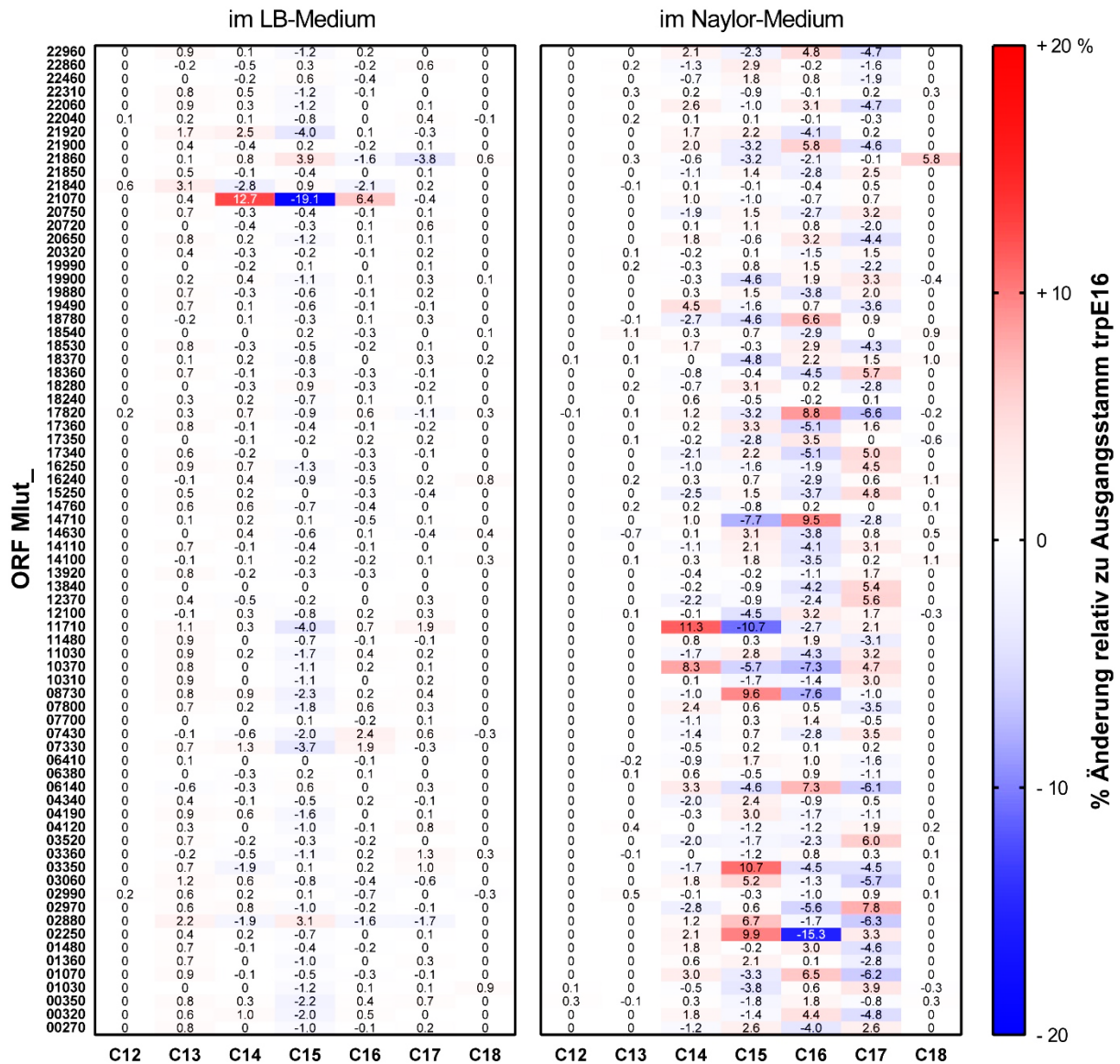


Abbildung 31: Prozentuale Änderung der Verteilung der Fettsäure-Kettenlängen von Mutanten mit einzelnen ausgeschalteten Regulator-Genen in der stationären Phase nach Wachstum in LB-Medium (links) oder in Naylor-Medium (rechts) gegenüber dem Ausgangsstamm *M. luteus* trpE16. Aufgetragen sind repräsentative Mittelwerte von mindestens zwei biologischen Replikaten. Auf der Y-Achse sind die ORF-Nummern der ausgeschalteten Regulator-Gene aufgelistet.

Andere Regulatorgene, deren Deletion zu deutlichen Phänotypen geführt hat, konnten aufgrund des aktuellen Annotationsstandes des Genoms von *M. luteus* nur mit benachbarten nicht näher bestimmten Genen für Aminosäure-, Fettsäure-Stoffwechsel oder Membran-Transporter in Verbindung gebracht werden. Die weitere Aufklärung der Wirkungsweise einzelner Regulatoren muss über qPCR-Analyse oder Sequenzierung von RNA-Proben der Regulator-Mutante im Vergleich zum Ausgangsstamm erfolgen.

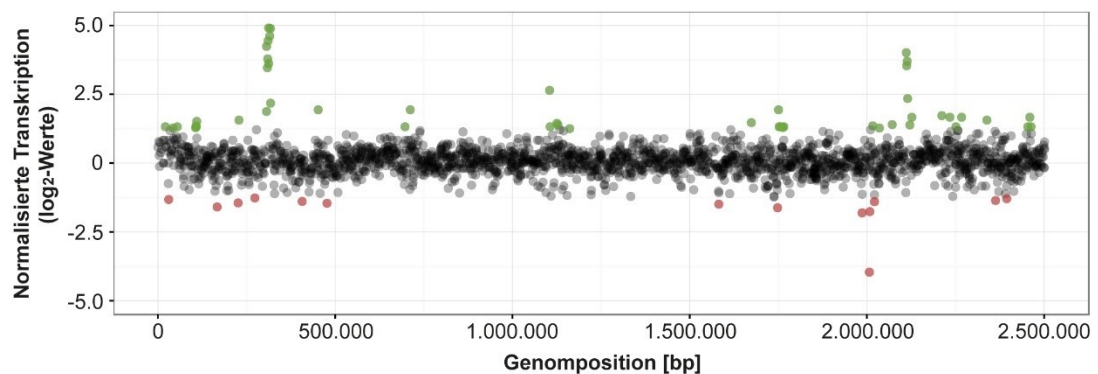
5.2.1.2. RNA-Sequenzierung von Regulator-Mutanten

Zwei Regulator-Mutanten waren bezüglich ihrer produzierten Olefin- und Fettsäureprofile besonders auffällig. Regulator-Mutante trpE16 Δ 02880:kan zeigte vor allem starke Verschiebungen zu *iso/iso*-Olefinen bzw. ungeradzahligen *iso*-Fettsäuren im LB- und Naylor-Medium. Außerdem war das Regulator-Gen aufgrund seiner genomischen Nähe zu einem potenziellen Isoleucin- und Valin-Abbau-Gencluster interessant. Regulator-Mutante trpE16 Δ 07330:kan zeigte im LB-Medium besonders schwache Olefinproduktion, aber starke Fettsäureproduktion und im Naylor-Medium besonders starke Fettsäure- und Olefinproduktion. Außerdem wurde in Flüssigkulturen eine starke Zellaggregation und Einschränkung des Wachstums in Naylor-Medium beobachtet. Daher wurden beide Mutanten mithilfe der Sequenzierung von RNA-Proben näher untersucht. RNA-Proben wurden aus der exponentiellen Phase von LB-Kulturen entnommen und die rRNA vor Sequenzierung entfernt. Pro Mutante bzw. Ausgangsstamm wurden zwei Sequenzierungsläufe der verbliebenen mRNA durchgeführt (zwei technische Replikate). Für jede Probe wurde die erhaltene Zahl an Sequenzen pro Gen gegen die Länge der jeweiligen Gensequenz und die absolute Zahl erhaltener Sequenzen für alle Gene normalisiert (RPKM = „Reads per kilobase pair of transcript per million mapped reads“). Schließlich wurde aus den RPKM-Werten die relative Änderung der Transkription (normalisierte Transkription) aller Gene einer Mutanten-Probe im Vergleich zur Probe des Ausgangsstammes berechnet.

5.2.1.2.1. Regulator-Mutante *trpE16* Δ 02880:kan

Im Fall des ausgeschalteten Regulators *Mlut_02880* wurde die verstärkte Transkription von Gencluster *Mlut_19540-70*, ein potenzielles β -Oxidationscluster, sowie die verstärkte Transkription des umliegenden Genclusters *Mlut_02820-02900*, ein potenzielles Isoleucin- und Valin-Abbau-Cluster, festgestellt. In COG-Funktionskategorien ausgedrückt, waren vor allem Lipid- und Aminosäure-Stoffwechsel, deren Reaktionstypen sich überschneiden, betroffen (Abbildung 32).

A



B

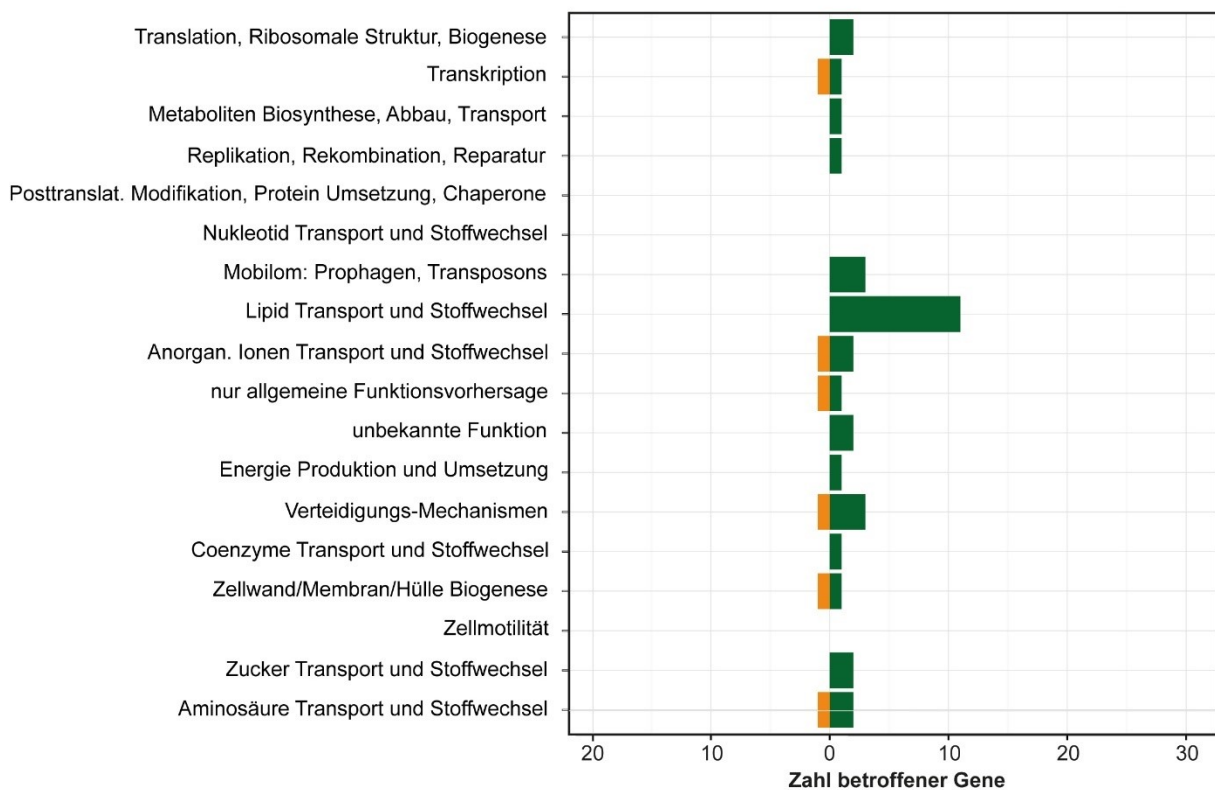
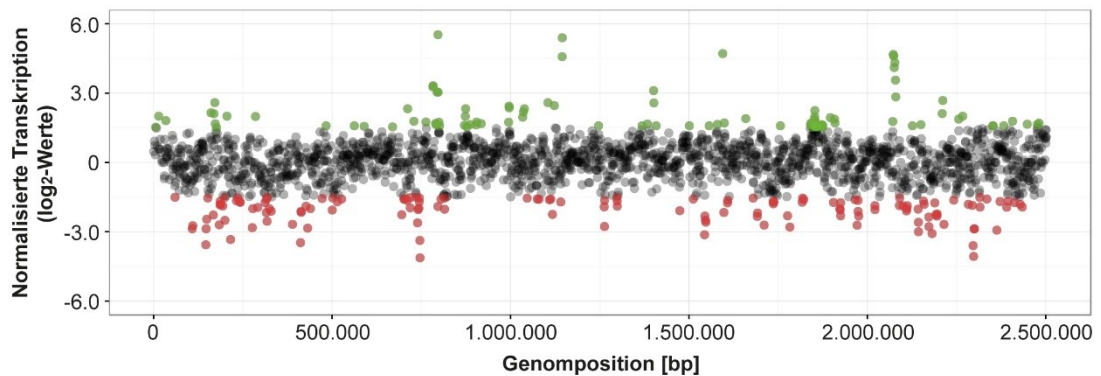


Abbildung 32: Vergleichende Transkriptionsanalyse von Regulator-Mutante *trpE16* Δ 02880:kan und *trpE16*. In (A) ist die verstärkte Transkription (grün) bzw. die verringerte Transkription (rot) von jedem einzelnen Gen aufgetragen gegen die Position im Genom in Basenpaaren für die Mutante *trpE16* Δ 02880:kan im Vergleich zum Ausgangsstamm *trpE16* in der exponentiellen Phase einer LB-Kultur. In (B) ist die Zahl verstärkt (grün) bzw. vermindert (gelb) abgelesener Gene pro COG-Funktionskategorie gezeigt.

5.2.1.2.2. Regulator-Mutante *trpE16* $\Delta 07330$:kan

Im Fall des ausgeschalteten Regulators *Mlut_07330* waren genomweit viele Gene und Gencluster im Vergleich zum Ausgangsstamm verstärkt oder vermindert transkribiert (Abbildung 33A). Gene nahezu aller COG-Funktionskategorien, abgesehen von Zellmotilität, Mobilom und Nukleotid Stoffwechsel, waren dabei betroffen (Abbildung 33B).

A



B

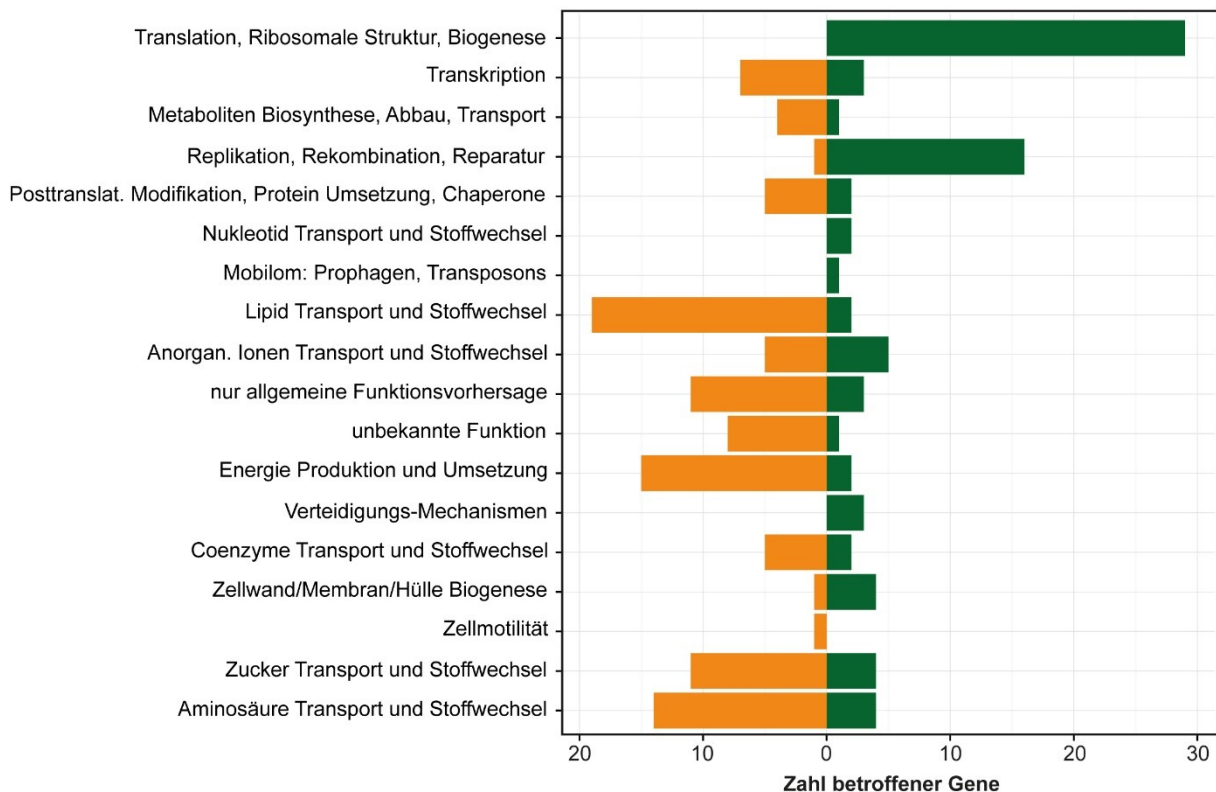


Abbildung 33: Vergleichende Transkriptionsanalyse von Regulator-Mutante *trpE16* $\Delta 07330$:kan und *trpE16*. In (A) ist die verstärkte Transkription (grün) bzw. die verringerte Transkription (rot) von jedem einzelnen Gen aufgetragen gegen die Position im Genom in Basenpaaren für die Mutante *trpE16* $\Delta 07330$:kan im Vergleich zum Ausgangsstamm *trpE16* in der exponentiellen Phase einer LB-Kultur. In (B) ist die Zahl verstärkt (grün) bzw. vermindert (gelb) abgelesener Gene pro COG-Funktionskategorie gezeigt.

5.2.2. Gezielte Optimierung der Olefinsynthese durch Überexpression der OleABCD-Enzyme

Zur Steigerung der Olefinsynthese ist die Überexpression der die katalysierenden Enzyme OleABCD codierenden Gene im Gencluster *oleABCD* ein naheliegender Weg. Der native Promotor des Gencluster *oleABCD* von *M. luteus* trpE16 wurde durch den als stark berichteten Promotor der Succinat-Dehydrogenase (Mlut_04850) ersetzt [70]. Die Mutante wurde ohne Resistenz-Marker erstellt.

Zunächst wurde nach Wachstum in LB-Medium mit einer Probe aus der stationären Phase die Transkription des *oleA*-Gens Mlut_13230 in der Promotoraustausch-Mutante trpE16 ope im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 analysiert.

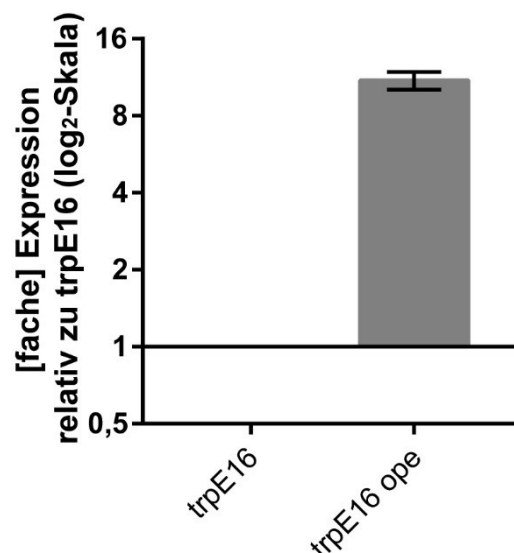


Abbildung 34: Relative Expression von Mlut_13230 der Promotoraustausch-Mutante trpE16 ope zu Ausgangsstamm trpE16 in stationärer Phase nach Wachstum in LB-Medium. Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Einzelmessungen von je 2 biologischen Replikaten sind dargestellt.

Die Transkription des *oleA*-Gens der Promotoraustausch-Mutante trpE16 ope war im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 um das 11-Fache erhöht (Abbildung 34).

Im Anschluss wurde die Auswirkung dieser gesteigerten Transkription auf die Olefinsynthese in Proben aus der stationären Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium untersucht (Abbildung 35).

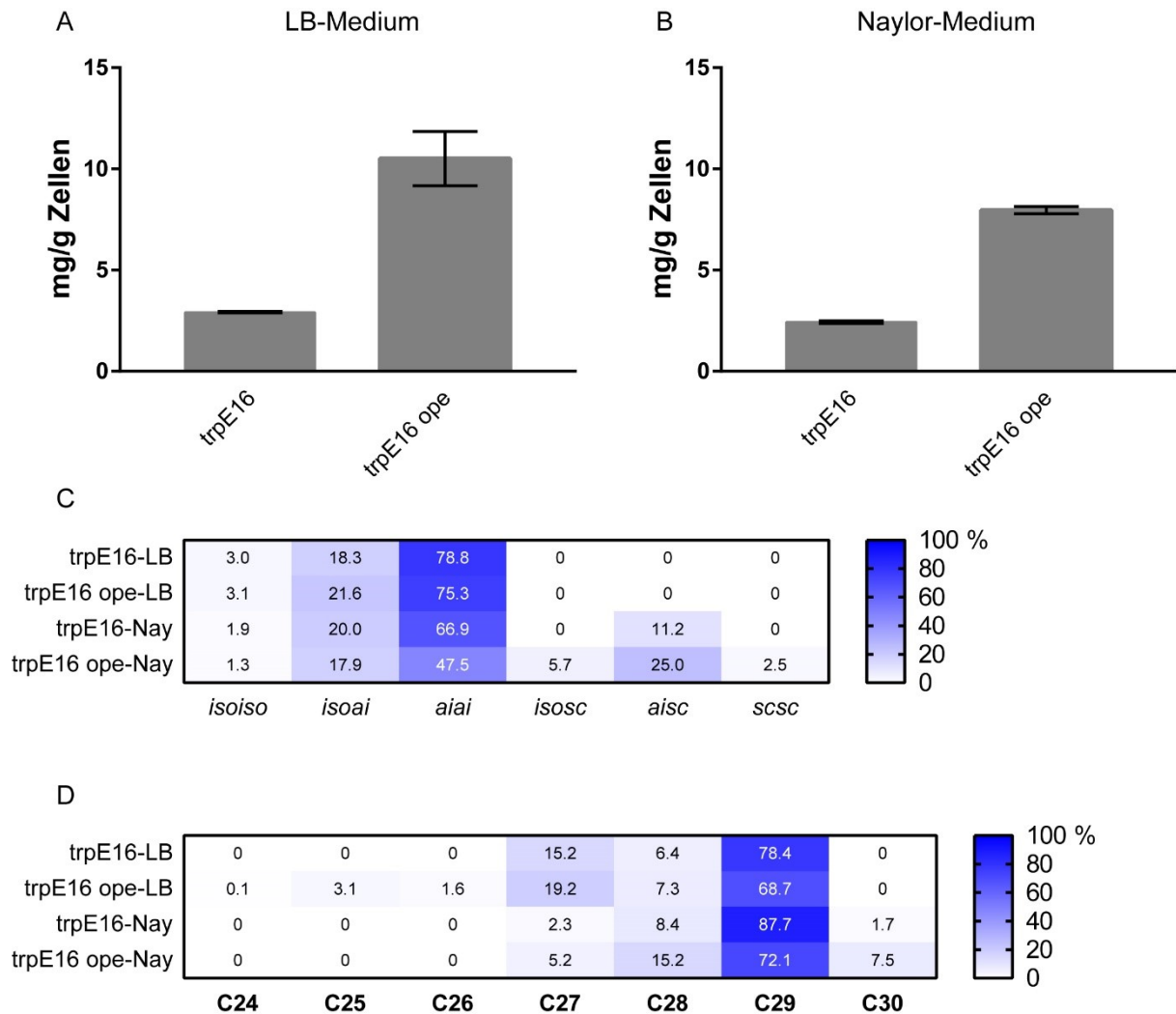


Abbildung 35: Olefinproduktion der Promotoraustausch-Mutante *trpE16 ope* im Vergleich zum Ausgangsstamm *trpE16* in stationärer Phase. In (A) sind die absoluten Olefinmengen im LB-Medium und in (B) im Naylor-Medium dargestellt. In (C) und (D) sind die Verteilung der Isomeren bzw. der Kettenlängen in LB- und Naylor-Medium aufgetragen. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten gezeigt. Die Standardabweichung der Prozentwerte liegt bei maximal 4 %. Abkürzungen: LB, LB-Kultur; Nay, Naylor-Kultur.

Im Naylor- wie im LB-Medium (Abbildung 35A und 35B) führte die Überexpression des *oleABCD*-Genclusters zu einer 3-4fach gesteigerten Olefinproduktion. Sowohl im LB- als auch im Naylor-Medium ging mit der Steigerung der absoluten Olefinmenge eine Verschiebung der Olefin-Isomeren (Abbildung 35C) von *ai*-Verzweigungen zu *iso*-Verzweigungen sowie unverzweigten Isomeren und die verstärkte Nutzung anderer Acyl-CoA-Kettenlängen als C15-Acyl-CoAs einher (Abbildung 35D).

5.2.3. Gezielte Optimierung der Olefinsynthese durch Manipulation der Substratverfügbarkeit

Im Folgenden wurden Gene und Gencluster von aus der Literatur bekannten Schlüsselreaktionen [37], [71] des Fettsäure-Stoffwechsels und des Abbaus der verzweigten Aminosäuren (Isoleucin, Valin und Leucin), die die Substratverfügbarkeit der Olefinsynthese bedingen, durch Deletion und Promotoraustausch im Genom von *M. luteus* identifiziert und manipuliert um die Olefinsynthese zu optimieren. Abbildung 36 zeigt eine Übersicht vom Abbau der verzweigten Aminosäuren über den Fettsäure-Stoffwechsel bis hin zur Olefinsynthese und soll helfen die nachfolgend beobachteten Phänotypen einzuordnen.

5.2.3.1. Die Reaktion der Acetyl-CoA-Carboxylase (AccABCD)

Die Reaktion der Acetyl-CoA-Carboxylase ist die sogenannte „Gatekeeper“-Reaktion der Fettsäure-Biosynthese. Sie steht mit dem Citrat-Zyklus in Konkurrenz um das gemeinsame Substrat Acetyl-CoA und bestimmt maßgeblich die Rate der Fettsäure-Synthese [72].

Zwei für die Acc-Reaktion relevante Gencluster wurden durch Blast-Suche im Genom von *M. luteus* identifiziert. Der Gencluster Mlut_05870-90 ist einziger Kandidat für die Codierung der α - und β -Untereinheiten der Acetyl-CoA-Carboxyltransferase (AccAD). Der Gencluster Mlut_19230-60 ist einziger Kandidat für die Codierung der Acetyl-CoA/Biotin-Carboxylase (AccBC). Der Gencluster enthält darüber hinaus ein Gen für einen Transkriptions-Regulator der GntR (Repressor des Gluconsäure-Operons) -Familie Mlut_19230. Bei den *accAD*- und *accBC*-Genclustern wurde je eine Mutante erstellt, bei der eine Kanamycin-Kassette und der Promotor der Succinat-Dehydrogenase co-linear zwischen den nativen Promotor und den Genstart eingefügt wurde. Der neue Promotor wurde als besonders stark berichtet [70]. Auch wurde vom Regulator Mlut_19230 durch Austausch mit einer Kanamycin-Kassette eine Deletions-Mutante erstellt.

Die Mutanten wurden in Naylor- und LB-Medium kultiviert und in der stationären Phase wurden Proben für RNA-, Fettsäure- und Olefinextraktion genommen.

Aminosäure- und Fettsäure-Stoffwechsel zur Olefinsynthese

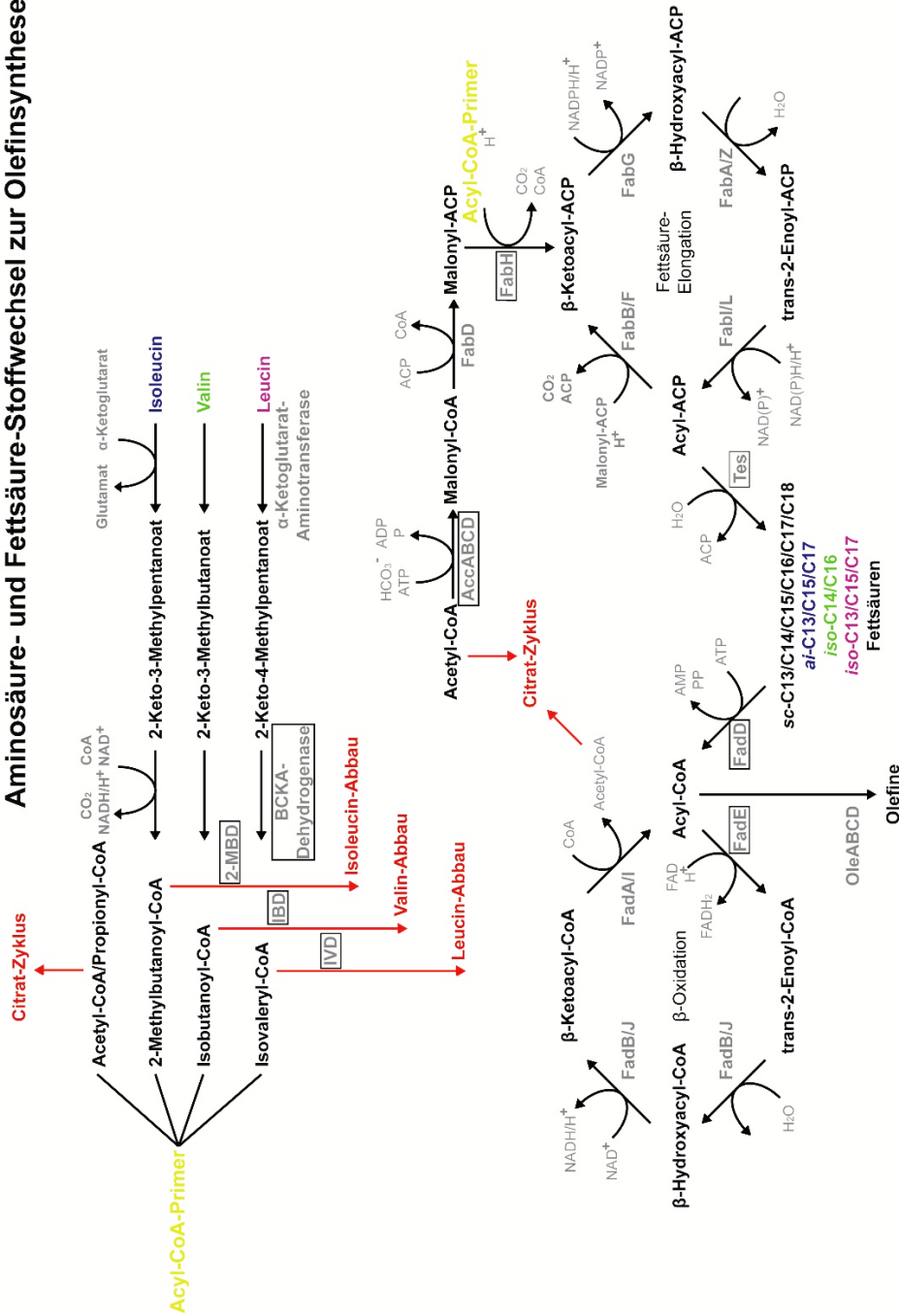


Abbildung 36: Übersicht der relevanten Stoffwechselwege für Substrate der Olefinsynthese. Diese besteht aus dem Anfang des Abbaus der verzweigten Aminosäuren (Isoleucin, Valin und Leucin) und dem Fettsäure-Stoffwechsel. Darin sind in Kästen alle im Folgenden untersuchten Schlüsselreaktionen für die Olefinsynthese hervorgehoben. Rot markiert sind mögliche Kohlenstoffverluste für die Olefinsynthese. Welche verzweigte Aminosäure Grundlage für welche Art von Fettsäuren ist, ist durch gleiche Einfärbung hervorgehoben. Abkürzungen: IVD, Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase; IBD, Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase; 2-MBD, 2-Methylbutyryl-CoA-Dehydrogenase; Acc, Acetyl-CoA-Carboxylase; BCKA, "Branched chain α -Ketoacid"; FabD, Malonyl-CoA-Acyl-Carrier-Protein Transacylase; FabH, β -Ketoacyl-Synthase III; FabG, β -Ketoacyl-Reduktase; FabA/Z, β -Hydroxyacyl-Dehydrogenase; FabI/L, Enoyl-Reduktase; FabB/F, β -Ketoacyl-Synthase I/II; FadD, Acyl-CoA-Synthetase; FadE, Acyl-CoA-Dehydrogenase; FadB/J, β -Hydroxyacyl-Dehydrogenase; FadA/I, β -Ketoacyl-Thioesterase; Tes, Acyl-ACP-Thioesterase; FadR, Transkriptioneller Regulator des Fettsäurestoffwechsels; FabR, Transkriptioneller Regulator der ungesättigten Fettsäure-Biosynthese; Ole, Olefine synthetisierende Enzyme.

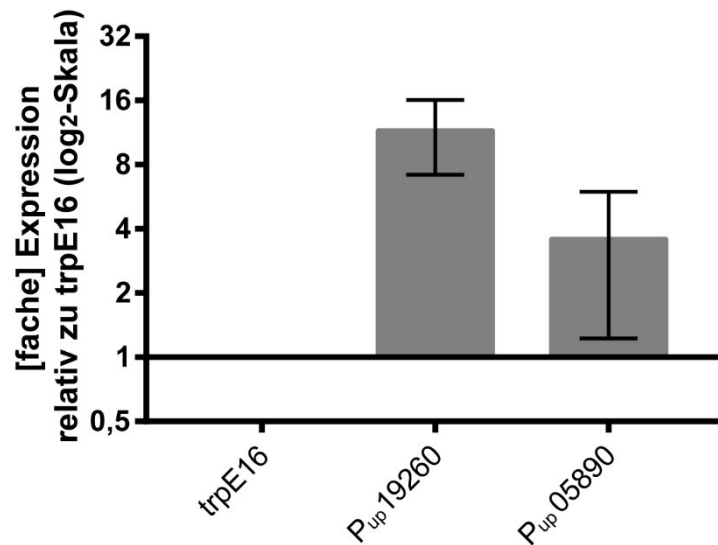


Abbildung 37: Relative Expression von Mlut_19260 bzw. Mlut_05890 der Promotoraustausch-Mutanten trpE16 P_{up}19260:kan und trpE16 P_{up}05890:kan zu Ausgangsstamm trpE16 in stationärer Phase nach Wachstum in LB-Medium. Es sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Einzelmessungen von je 2 biologischen Replikaten dargestellt.

Zunächst wurde das Ergebnis der Promotorinsertion vor den beiden *acc*-Genclustern durch qPCR von in cDNA umgewandelten RNA-Proben geprüft. Abbildung 37 zeigt im Fall von trpE16 P_{up}19260:kan eine im Schnitt 11,6fach höhere Transkription als bei Ausgangsstamm trpE16 im LB-Medium. Die Mutante trpE16 P_{up}05890:kan dagegen zeigte eine im Schnitt 3,6fache Transkription. Im LB-Medium zeigten alle drei *acc*-Gencluster-Mutanten einen auf zwei Drittel reduzierten Fettsäuregehalt. Allerdings konnte für die Mutanten trpE16 P_{up}19260:kan und trpE16 P_{up}05890:kan auch eine um 56 % bzw. 84 % gesteigerte Olefinproduktion festgestellt werden. Die Deletions-Mutante trpE16 Δ 19230:kan zeigte keine deutliche Veränderung der extrahierten Olefinmenge (Abbildung 38A). Im Naylor-Medium wurde für keine Mutante eine auffällige Änderung der produzierten Fettsäuremenge beobachtet. Auf Olefin-Ebene dagegen zeigte trpE16 Δ 19230:kan eine um 68 %, trpE16 P_{up}19260:kan eine um 116 % und trpE16 P_{up}05890:kan eine um 43 % erhöhte Produktion. Abgesehen von den Änderungen der absoluten Olefinmengen konnte im Naylor-Medium sowohl auf Fettsäure- wie auf Olefin-Level für trpE16 P_{up}19260:kan bzw. trpE16 Δ 19230:kan eine leichte Verschiebung von geradzahligen *iso*-verzweigten bzw. *isoiso*-Isomeren zu *ai*- bzw. *aiai*-Isomeren festgestellt werden (Abbildung 38B).

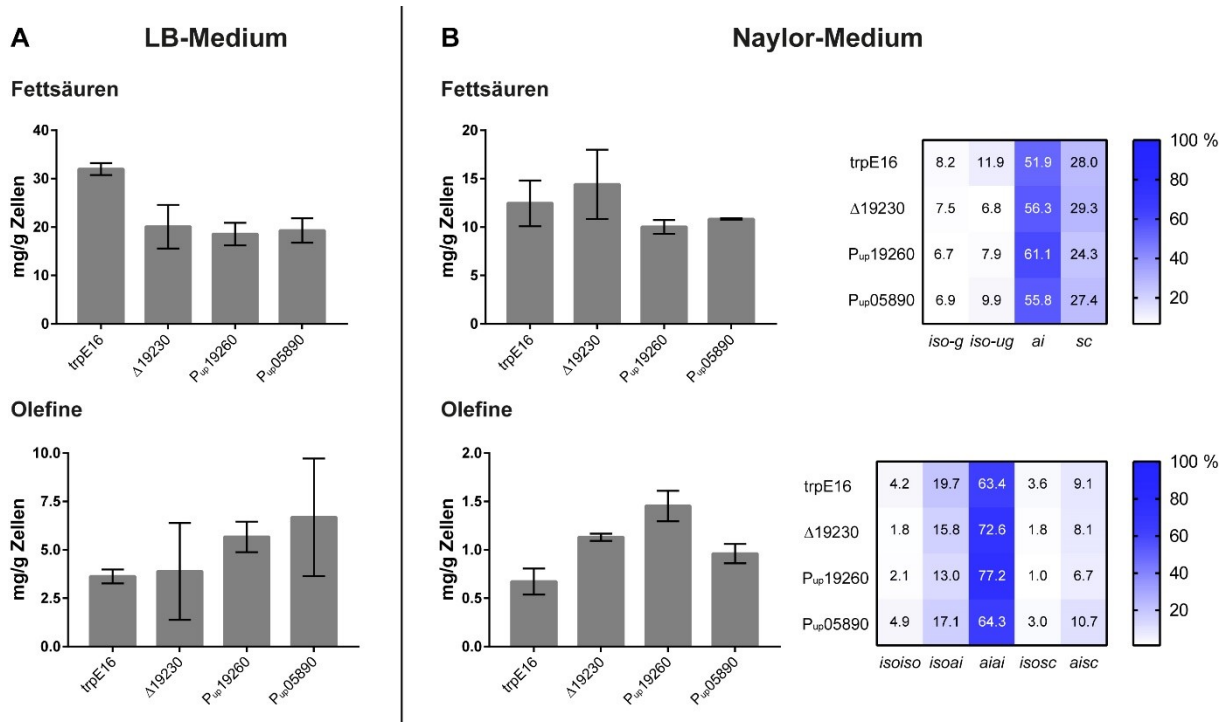


Abbildung 38: Auswertung der Fettsäure- (oben) und Olefin-Extraktionen (unten) in stationärer Phase nach Wachstum in LB-Medium (A) und in Naylor-Medium (B) aller *acc*-Gencluster-Mutanten. Die Mittelwerte von je zwei biologischen Replikaten sind gezeigt. Die Standardabweichungen der Prozentwerte liegen bei maximal 8 % (i.d.R. 1-3 %).

5.2.3.2. Die Reaktion der β -Ketoacyl-Synthase III (FabH)

Die β -Ketoacyl-Synthase III (FabH) katalysiert das Einbringen und bestimmt die Einbringungsrate der Acyl-CoA-Primer 2-Methylbutanoyl-CoA, Isobutanoyl-CoA, Isovaleryl-CoA und Acetyl/Propionyl-CoA in die Fettsäure-Elongation durch eine erste Kondensation mit Malonyl-ACP (Acyl-Carrier-Protein). Durch Homologie-Suchen konnte Mlut_09310 als codierender Genkandidat für *fabH* im Genom von *Micrococcus luteus* identifiziert werden bzw. wurde bereits durch Beller *et al.* als solcher erkannt und beschrieben [29], [70]. Mlut_09310 ist Teil eines Genclusters mit Mlut_09320, das die Malonyl-CoA:ACP-Transacylase (FabD) codiert. FabD katalysiert die der FabH-Reaktion vorangeschaltete Übertragung eines Malonyl-Rests von Coenzym A auf das Acyl-Carrier-Protein. Die Bedeutung dieser Reaktion mit Blick auf die Optimierung der Substratverfügbarkeit der Olefinsynthese ist limitiert, allerdings zieht sie Produkte aus der Reaktion der Acc-Reaktion ab und beeinflusst so indirekt deren Reaktionsrate.

Eigene RNA-Sequenzierungsexperimente von *M. luteus* trpE16-Proben aus exponentieller Phase lieferten für das Gen Mlut_09310 den RPKM-Wert 73 im LB-Medium und 66 im Naylor-Medium (RPKM-Wert LB = 73 /Naylor = 66). Der native Promotor des Genclusters Mlut_09300-20 wurde gegen den gemäß eigenem RNA-Sequenzierungs-Ergebnis starken Promotor von Mlut_16550 (RPKM-Wert LB = 2563 /Naylor = 1219) (siehe auch Anhang 9.3. Tabelle 42) zuzüglich einer co-linearen Kanamycin-Kassette ausgetauscht und eine höhere Transkriptionsrate erwartet.

Die im genomischen Hintergrund von trpE16 und trpE16 ope erzeugten Mutanten wurden in LB-Medium in die stationäre Phase kultiviert und Proben für RNA-, Fettsäure- und Olefinextraktion genommen.

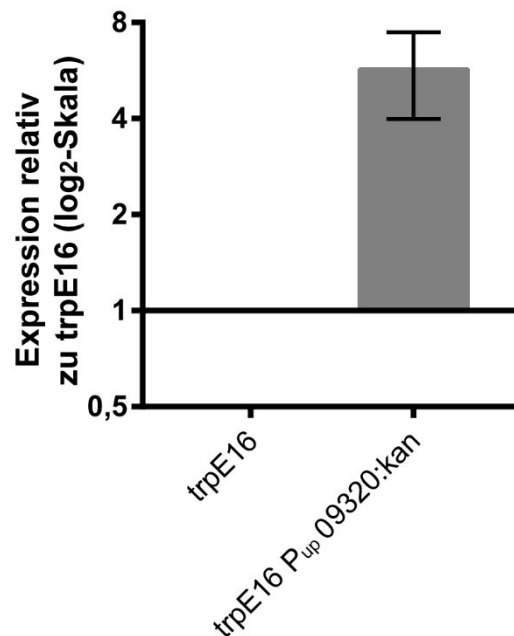


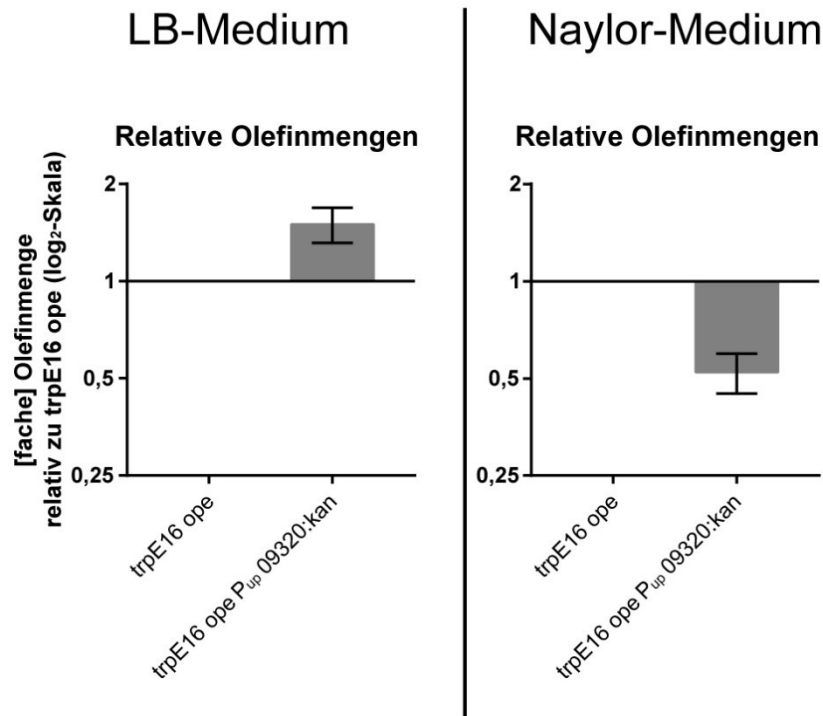
Abbildung 39: Relative Expression von Mlut_09310 der Promotoraustausch-Mutante trpE16 P_{up}09320:kan zu Ausgangsstamm trpE16 in stationärer Phase nach Wachstum in LB-Medium. Die Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Einzelmessungen von je 2 biologischen Replikaten sind dargestellt.

Zunächst wurde das Ergebnis des Promotoraustauschs im genomischen Hintergrund von trpE16 durch qPCR von zu cDNA umgewandelten RNA-Proben im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 betrachtet. Die Mutante zeigte eine im Schnitt 5,7fach erhöhte Transkription (Abbildung 39).

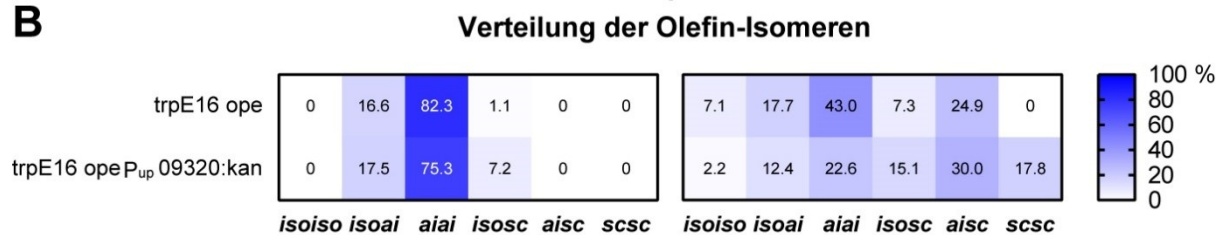
Im genomischen Hintergrund von trpE16 ope wurde die Veränderung der Olefinproduktion durch erhöhte Transkription des *fabH*-Gens im Vergleich zu trpE16 ope nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium analysiert. Im LB-Medium konnte die 1,5fache Olefinmenge, im Naylor-Medium die 0,5fache Menge festgestellt werden (Abbildung 40A).

Im LB-Medium sowie verstärkt im Naylor-Medium zeigte sich eine Verschiebung von verzweigten zu unverzweigten Olefinen (Abbildung 40B). Während im LB-Medium eine deutliche Verschiebung zu kürzeren Kettenlängen feststellbar war, kam es im Naylor-Medium zur verstärkten Nutzung von kürzeren und längeren Acyl-CoA-Kettenlängen (Abbildung 40C).

A



B



C

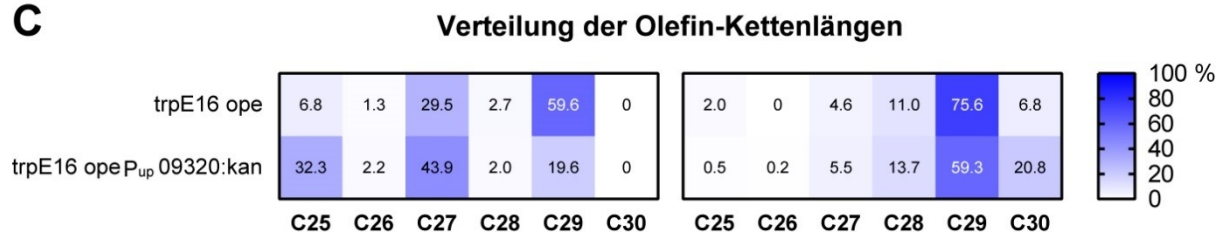


Abbildung 40: Olefinproduktion mit erhöhter Expression des *fabH*-Gens der Promotoraustausch-Mutante trpE16 ope P_{up}09320:kan im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 ope in relativen Mengen (A), in Verteilung der Isomeren (B) und in Verteilung der Kettenlängen (C) in stationärer Phase nach Wachstum in LB-Medium (links) und in Naylor-Medium (rechts). Es sind Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten dargestellt. Die Standardabweichung der Prozentwerte beträgt maximal 8 %.

5.2.3.3. Der Abbau der verzweigten Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin

Im Fokus der Untersuchung des Abbaus der verzweigten Aminosäuren lagen zwei Reaktionen am Beginn des Stoffwechsels. Die erste Reaktion war die der BCKA- (Branched-chain α -Keto acid-) Dehydrogenase, die Teil des allgemeinen Abbauweges aller drei verzweigten Aminosäuren ist. Die zweite Reaktion schließt daran an und ist Teil der individuellen Abbauwegen der Aminosäuren, katalysiert durch Acyl-CoA-Dehydrogenasen mit Spezifität für kurzkettige verzweigte Substrate (Abbildung 36 und 41).

5.2.3.3.1. Die Reaktion der BCKA-Dehydrogenase

Der BCKA-Dehydrogenase-Komplex nutzt Thiaminpyrophosphat (TPP), NAD^+ und CoA-SH als Cofaktoren um 2-Keto-3-Methylpentanoat, 2-Keto-4-Methylpentanoat und 2-Keto-3-Methylbutanoat in 2-Methylbutanoyl-CoA, Isobutanoyl-CoA und Isovaleryl-CoA umzuwandeln, wobei CO_2 frei wird. Der Reaktionstyp ist analog zur Aktivität der Pyruvat- und 2-Ketoglutarat-Dehydrogenase, die auch Konservierung auf Sequenzebene zeigen. Der Enzymkomplex besteht aus vier Untereinheiten: Zwei Untereinheiten der „Branched-chain α -keto acid decarboxylase“ (E1), eine Lipoamid-Acyltransferase (E2) und eine Lipoamid-Dehydrogenase (E3). Im Genom von *M. luteus* konnten drei Gencluster, die potenziell für die BCKA-, die Pyruvat- oder die 2-Ketoglutarat-Dehydrogenase codieren, gefunden werden: Mlut_06800-20, Mlut_13320-40 und Mlut_17790-810. Die Operons Mlut_06800-20 und Mlut_17790-810 codieren E1- und E2-Untereinheiten, während Mlut_13320-40 nur Gene für E2- und E3-Untereinheiten besitzt. Es ist bekannt, dass verschiedene Dehydrogenase-Komplexe die gleiche E3-Untereinheit verwenden können [73], [74].

Um den BCKA-Dehydrogenase-codierenden Gencluster zu identifizieren wurden zwischen den Start des ORF und den nativen Promotor der Gencluster als stark berichtete neue Promotoren [70] und co-linear Kanamycin-Kassetten zur Selektion eingefügt. Die Promotorregion von Mlut_05030 wurde vor Mlut_06800 eingefügt und die Promotorregion von Mlut_04850 vor Mlut_17810.

Zunächst wurden die Veränderung der Transkription der Gencluster Mlut_06800-20 und Mlut_17790-810 durch qPCR von cDNA-Proben nach Wachstum in Naylor-Medium in die exponentielle Phase im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 untersucht (Abbildung 42A). Die relative Quantifizierung mithilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode zeigte, dass die Transkription beider Zielgene Mlut_06800 und Mlut_17810 stark erhöht war.

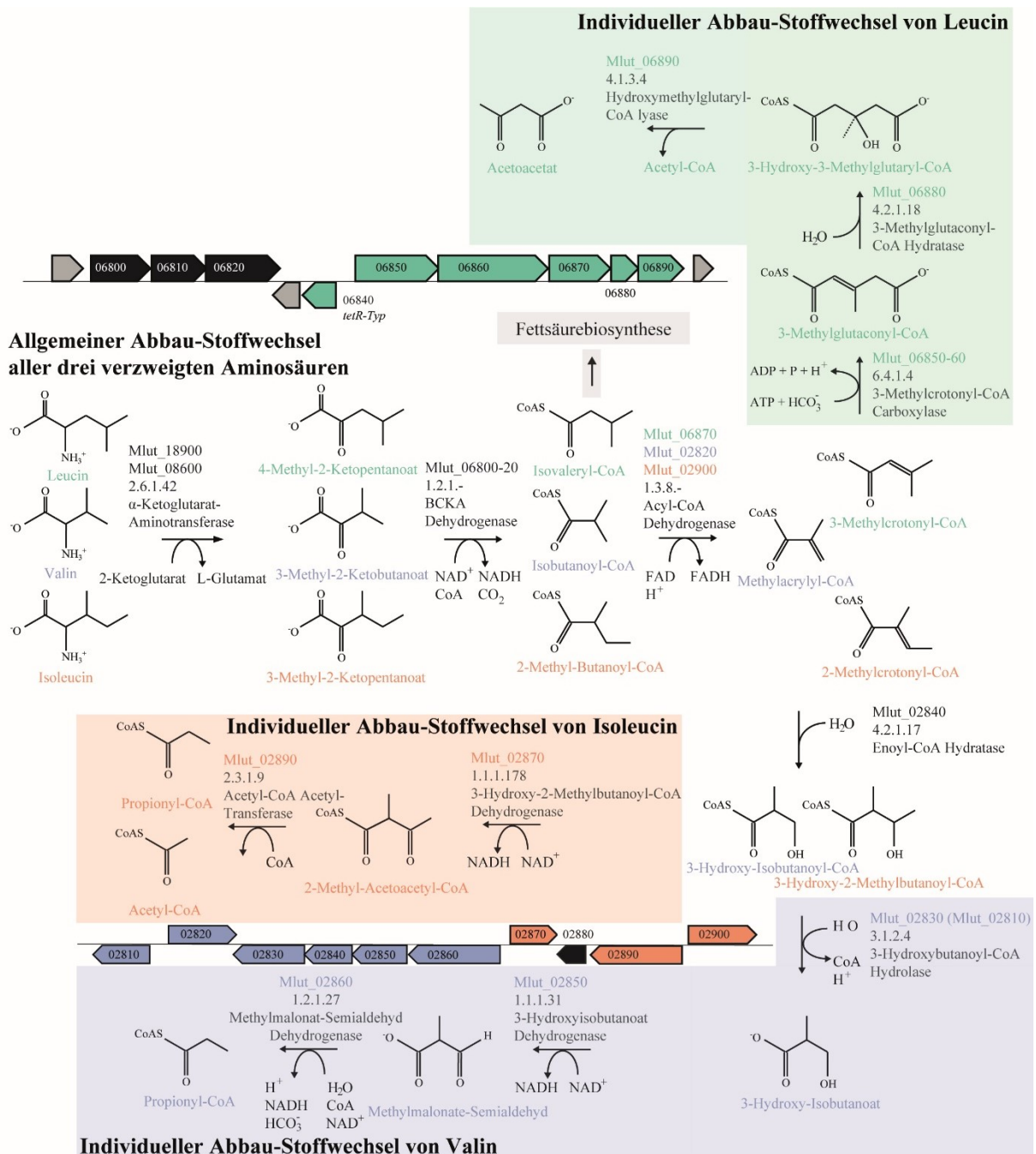


Abbildung 41: Abbau-Stoffwechselwege der verzweigten Aminosäuren in *M. luteus*. Blau geschriebene Metabolite und Gene sind Teil des Valin-Abbaus, in grün geschriebene Metabolite und Gene sind Teil des Leucin-Abbaus und in rot geschriebene Metabolite und Gene sind Teil des Isoleucin-Abbaus. Die Zuordnung bestimmter Gene zu bestimmten Reaktionen erfolgte mithilfe der BIOCYC-Datenbank und blastp-Homologie-Suchen.

Die Analyse der produzierten Olefine nach Wachstum in Naylor-Medium in die stationäre Phase ergab, dass die erhöhte Transkription von Gencluster Mlut_06800-20 zu einer 3fachen Steigerung der Olefinproduktion führte (Abbildung 42B). Die Promotorinsertion des anderen Genclusters hatte auf Olefin-Ebene keinen Effekt. Die Fettsäureproduktion war im Fall von trpE16 P_{up}06800-20:kan nicht beeinflusst, dagegen führte die Promotorinsertion vor Gencluster Mlut_17790-810 zu einem Abfall der Produktion um 30 % (Abbildung 42C). Das passt zur Idee, dass eine gesteigerte Menge aktiver Pyruvat- und/oder 2-Ketoglutarat-Dehydrogenase zur Steigerung der Aktivität des Citrat-Zyklus führt, der in direkter Konkurrenz mit der Fettsäure-Biosynthese um Acetyl-CoA steht. Die Zusammensetzung der Fettsäure- und Olefin-Isomeren bzw. -Kettenlängen wurde durch die gesteigerte Transkription des Mlut_06800-20 Genclusters nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Untersuchung der Rolle der BCKA-Dehydrogenase wurde eine Deletions-Mutante des Genclusters Mlut_06800-20 durch Austausch mit einer Hygromycin-Kassette erstellt. Die Ausschaltung des Genclusters führte zu einer starken Wachstumshemmung in Naylor-Medium, während in LB-Medium nur ein verzögertes Wachstum beobachtet wurde (Abbildung 43C und 43D). Nach Wachstum in beiden Medien zeigte die Deletions-Mutante keinerlei Olefinproduktion. Im Naylor-Medium wurde eine starke Verschiebung der Fettsäure-Zusammensetzung beobachtet. Die gemessenen Fettsäuren waren in der Mutante zu 80 % unverzweigt, während der Anteil der unverzweigten Fettsäuren im trpE16 Ausgangsstamm bei 16 % lag. Gleichzeitig waren die produzierten absoluten Fettsäuremengen deutlich reduziert (Abbildung 43A). Dieser Phänotyp wurde auch im LB-Medium beobachtet, wo die absoluten Fettsäuremengen auf 20 % der Menge des Ausgangsstammes reduziert waren und der Anteil der unverzweigten Fettsäuren bei 60 % lag (Abbildung 43B).

Zur weiteren Bestätigung, dass trpE16 Δ 06800-20:hyg die notwendige Reaktion der BCKA-Dehydrogenase zur Umwandlung der verzweigten Aminosäuren in verzweigte Acyl-CoA-Primer-Moleküle fehlt, wurde Naylor-Medium mit je 4 mM L-Valin, L-Leucin oder L-Isoleucin supplementiert.

Die Supplementierung führte nur im Fall des Ausgangsstammes *trpE16* zu erhöhter Produktion der korrespondierenden verzweigten Fettsäuren (geradzahlige *iso*-verzweigte, ungeradzahlige *iso*-verzweigte oder ungeradzahlige *ai*-verzweigte Fettsäuren), allerdings nicht in der BCKA-Dehydrogenase-Deletions-Mutante (Abbildung 44A). Dieses Ergebnis legt nahe, dass der vom Gencluster *Mlut_06800-20* codierte Enzymkomplex an der Umwandlung verzweigter Aminosäuren in verzweigte Acyl-CoA-Primer-Moleküle für die Fettsäure-Biosynthese beteiligt ist (siehe auch Abbildung 36 oder 41). Die im Naylor-Medium in der Deletions-Mutante verbliebene Synthese verzweigter Fettsäuren geht vermutlich auf unspezifische Aktivität der Pyruvat- oder 2-Ketoglutarat-Dehydrogenasen zurück. Eine alternative Route zur Produktion von Acyl-CoA-Primer-Molekülen sind Acyl-CoA-Synthetasen, die extern zugegebene kurzkettige verzweigte Carbonsäuren direkt zu Acyl-CoA-Primer-Molekülen aktivieren. Um zu testen, ob diese alternative Route in *M. luteus trpE16* vorhanden ist und in der BCKA-Dehydrogenase-Deletions-Mutante noch aktiv ist, wurden Mutante und Ausgangsstamm *trpE16* im Naylor-Medium mit Isobutansäure, 3-Methylbutansäure oder 2-Methylbutansäure supplementiert. In beiden Stämmen erlaubte die Supplementierung die Synthese der korrespondierenden Fettsäuren (geradzahlige *iso*-verzweigte, ungeradzahlige *iso*-verzweigte oder ungeradzahlige *ai*-verzweigte Fettsäuren). Der Effekt der Supplementierung war in der Deletions-Mutante aufgrund fehlender Hintergrund-Produktion noch prägnanter (Abbildung 44B). Des Weiteren erlaubte die Supplementierung der kurzkettigen verzweigten Carbonsäuren in der Mutante wieder die Produktion von korrespondierenden Olefin-Isomeren (Abbildung 44B).

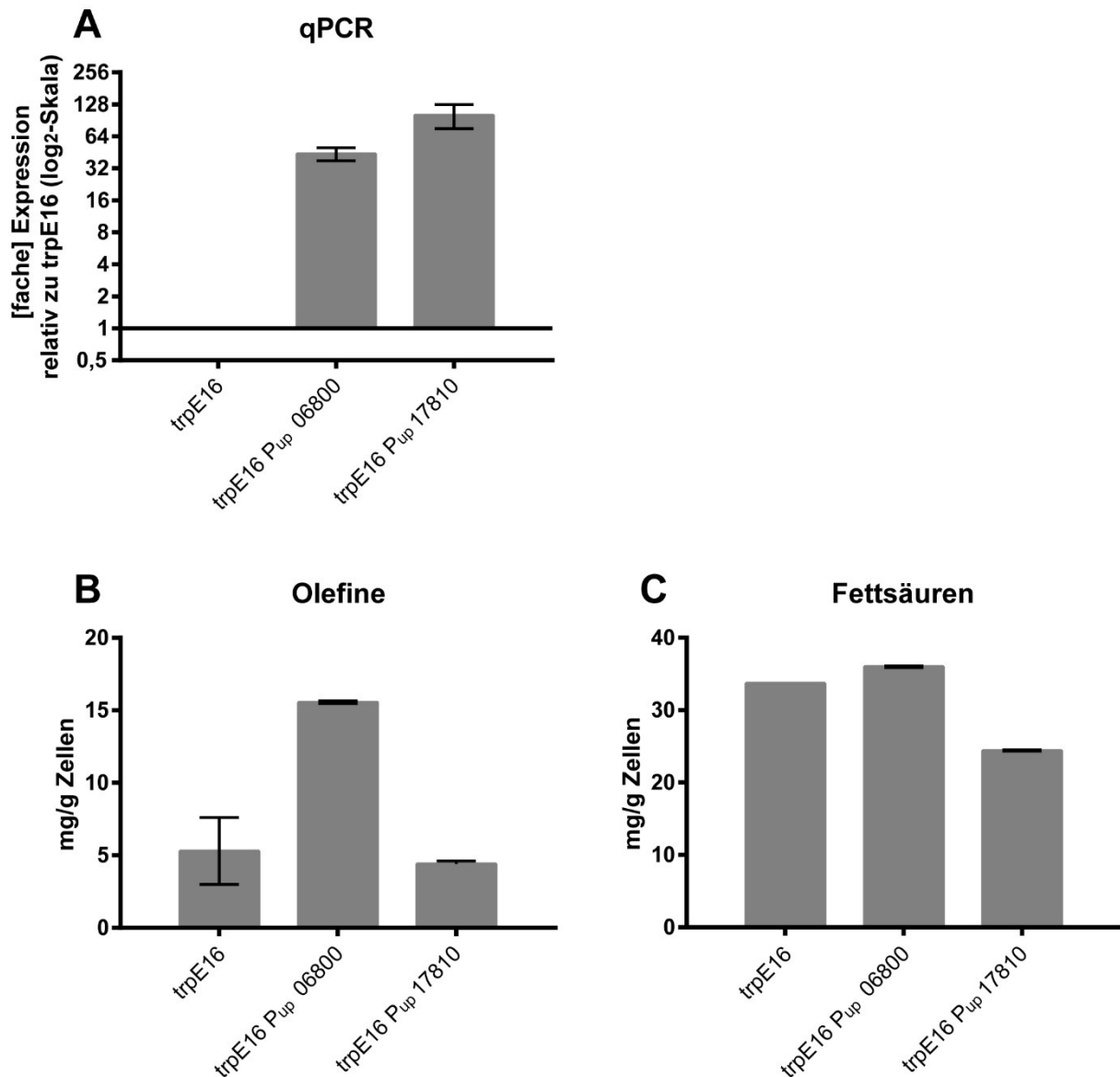


Abbildung 42: Promotoraustausch-Mutanten der BCKA-Dehydrogenase Kandidaten: (A) qPCR-Ergebnisse relativ zum Ausgangsstamm trpE16, (B) Produzierte Olefinmengen und (C) Fettsäuremengen im Naylor-Medium. Die Auswertung der qPCR-Daten erfolgte über die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode und basiert auf drei technischen Messungen von zwei biologischen Replikaten. Die Olefin- und Fettsäure-Konzentrationen sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten. Die gezeigte Fettsäure-Konzentration von trpE16 ist eine einzelne repräsentative Messung.

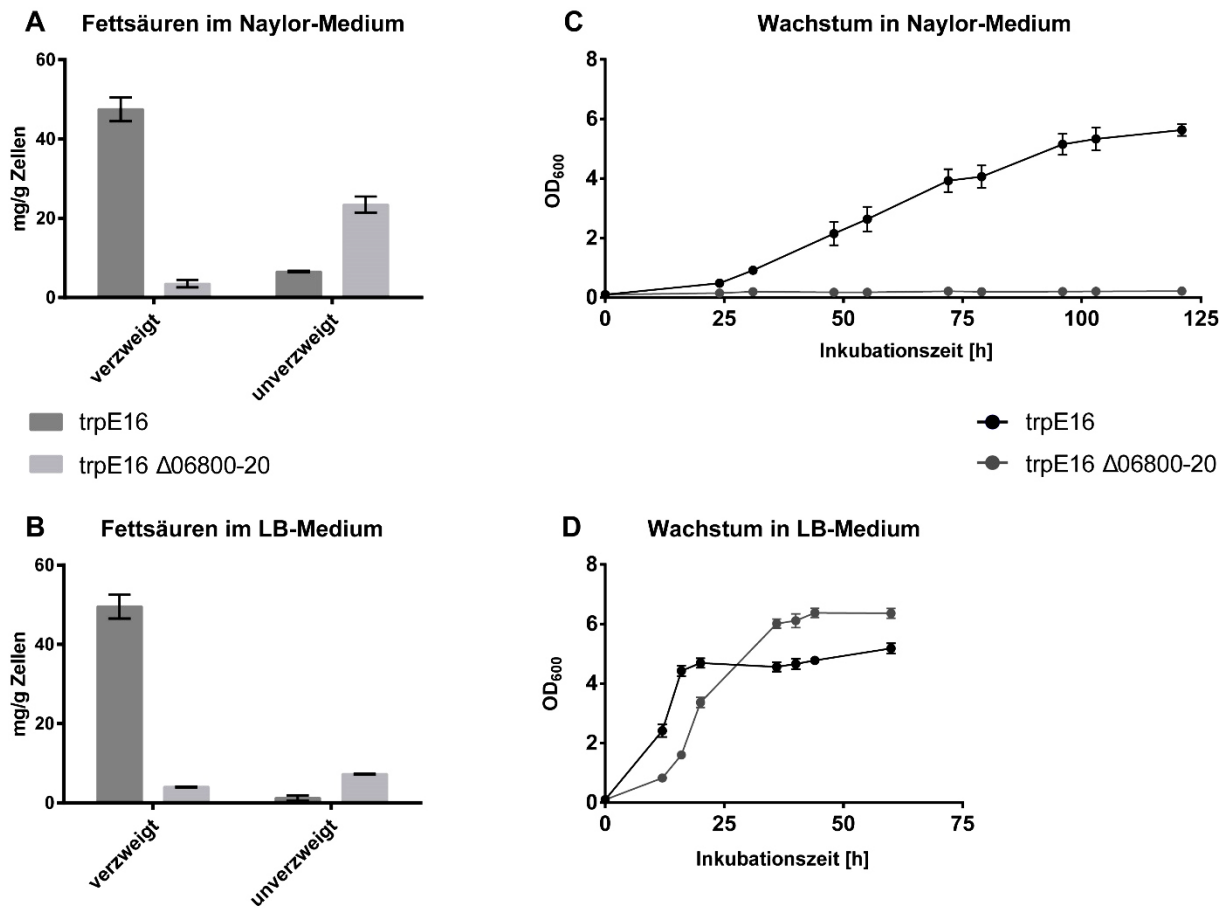


Abbildung 43: Wachstum und Fettsäurezusammensetzung der Deletions-Mutante der BCKA-Dehydrogenase *trpE16* Δ06800-20:hyg im Vergleich zum Ausgangsstamm *trpE16*. In (A) sind die produzierten Mengen an verzweigten und unverzweigten Fettsäuren im Naylor-Medium, in (B) im LB-Medium, in (C) ist das Wachstum in Naylor-Medium und in (D) in LB-Medium im Vergleich zum Ausgangsstamm *trpE16* gezeigt. Die Ergebnisse in (A) und (B) entstammen nicht den gleichen Experimenten wie (C) und (D). Die Mittelwerte aus zwei bzw. drei biologischen Replikaten sind dargestellt.

A Supplementierung
mit verzweigten Aminosäuren

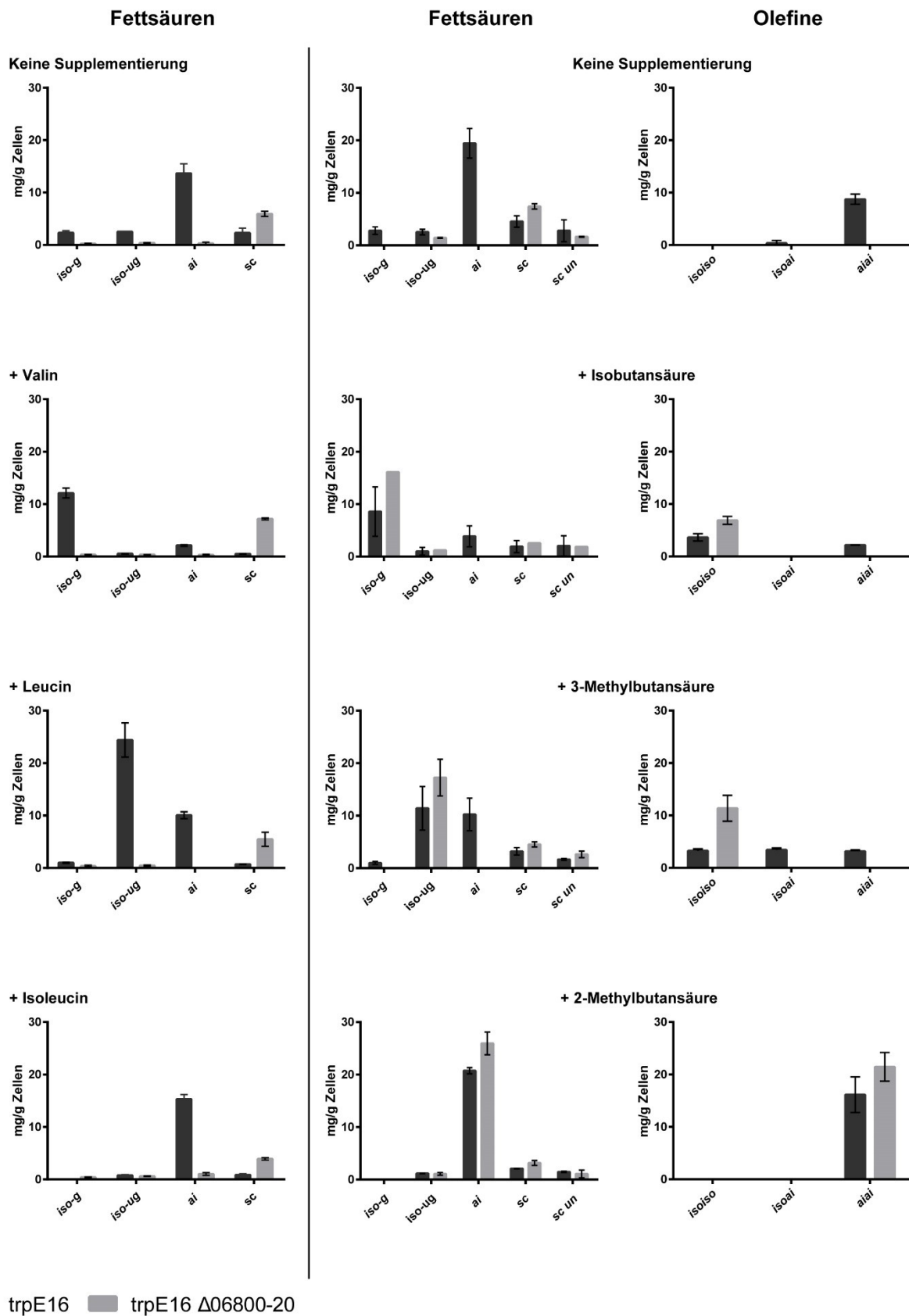
B Supplementierung
mit kurzen verzweigten Carbonsäuren


Abbildung 44: Vergleich der Deletions-Mutante der BCKA-Dehydrogenase *trpE16 Δ06800:hyg* zum Ausgangsstamm *trpE16* bezüglich der Fettsäure- ((A), (B) erste Spalte) und Olefinproduktion ((B) zweite Spalte). Die Supplementierung mit verzweigten Aminosäuren (A) und mit kurzen verzweigten Carbonsäuren (B) im Naylor-Medium ist gezeigt. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten dargestellt.

5.2.3.3.2. Die Reaktion der Isobutanoyl-CoA-, Isovaleryl-CoA- und 2-Methylbutanoyl-CoA-Dehydrogenase

In Gram-positiven Bakterien, z.B. im Modelorganismus *Bacillus subtilis*, wo der Abbau der verzweigten Aminosäuren ebenfalls untersucht wurde [71], teilen sich die verzweigten Aminosäuren einen gemeinsamen Abbau-Stoffwechsel bis zu den Acyl-CoA-Primer-Molekülen. Nachfolgend durchlaufen die Derivate der verzweigten Aminosäuren individuelle Abbauewege beginnend mit spezifischen Acyl-CoA-Dehydrogenasen für die weitere Umsetzung von Isobutanoyl-CoA (Isobutanoyl-CoA-Dehydrogenase, IBD), Isovaleryl-CoA (Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase, IVD) oder 2-Methylbutanoyl-CoA (2-Methylbutanoyl-CoA-Dehydrogenase, 2-MBD) (Abbildung 41).

Durch Homologie-Suchen wurden insgesamt sieben Genkandidaten für die Codierung von FAD-abhängigen Acyl-CoA-Dehydrogenasen ermittelt: Mlut_02820, Mlut_02900, Mlut_03070, Mlut_06870, Mlut_11700, Mlut_19560 und Mlut_23170. Die codierten Enzyme waren Kandidaten für die Reaktionen der IBD, IVD, bzw. 2-MBD im Abbau der verzweigten Aminosäuren, aber auch für die homologe FadE-Reaktion in der β -Oxidation. Die Gene Mlut_02820 und Mlut_02900 liegen innerhalb eines Genclusters, das scheinbar für alle Reaktionsschritte des Isoleucin-/Valin-Abbaus codiert. Das Gen Mlut_06870 ist Teil eines Genclusters, das offensichtlich für alle Schritte des Leucin-Abbaus codiert (Abbildung 41). Als weitere *in silico*-Analyse der Genkandidaten wurde ein Sequenzvergleich der Aminosäure-Sequenzen der Acyl-CoA-Dehydrogenasen mit Enzymen mit aufgelösten Kristallstrukturen und/oder detaillierter Charakterisierung aus der Literatur erstellt. Der resultierende Homologie-Baum (Abbildung 45) zeigt eine enge Verwandtschaft von Mlut_02820 zur ausführlich untersuchten humanen Isobutanoyl-CoA-Dehydrogenase (hIBD) [75] an, während Mlut_06870 stark verwandt zu einem Enzym von *Streptomyces avermitilis* ist, von welchem eine breite Substratspezifität für eine Vielzahl kurzkettiger verzweigter Acyl-CoA-Primer-Moleküle berichtet wurde [76]. Die von Gen Mlut_02900 abgeleitete Acyl-CoA-Dehydrogenase-Sequenz wies keine eindeutigen Homologien mit Dehydrogenasen mit berichteter Spezifität für Leucin- oder Valin-Derivate auf. Die übrigen Genkandidaten wiesen nur geringere Homologien zu Dehydrogenasen für kurzkettige Acyl-CoAs auf.

Diese Beobachtungen erlaubten eine erste Eingrenzung der Genkandidaten für den Abbau der verzweigten Aminosäuren. Im Folgenden wurde erwartet, dass Enzyme, die im Aminosäure-Abbau aktiv sind, die Bereitstellung einzelner verzweigter Acyl-CoA-Primer für die Fettsäuresynthese beeinflussen und daher bei Deletion des entsprechenden Gens und Supplementierung von verzweigten Aminosäuren Veränderungen der Fettsäure- und Olefin-Isomeren-Zusammensetzung zeigen. Die entsprechenden Ergebnisse für die Genkandidaten Mlut_02820, Mlut_02900 und Mlut_06870 werden nachfolgend präsentiert. Die Genkandidaten Mlut_03070, Mlut_11700, Mlut_19560 und Mlut_23170 waren diesbezüglich unauffällig und werden im Abschnitt „5.2.3.6. Die Reaktion der Acyl-CoA-Dehydrogenase (FadE)“ näher besprochen.

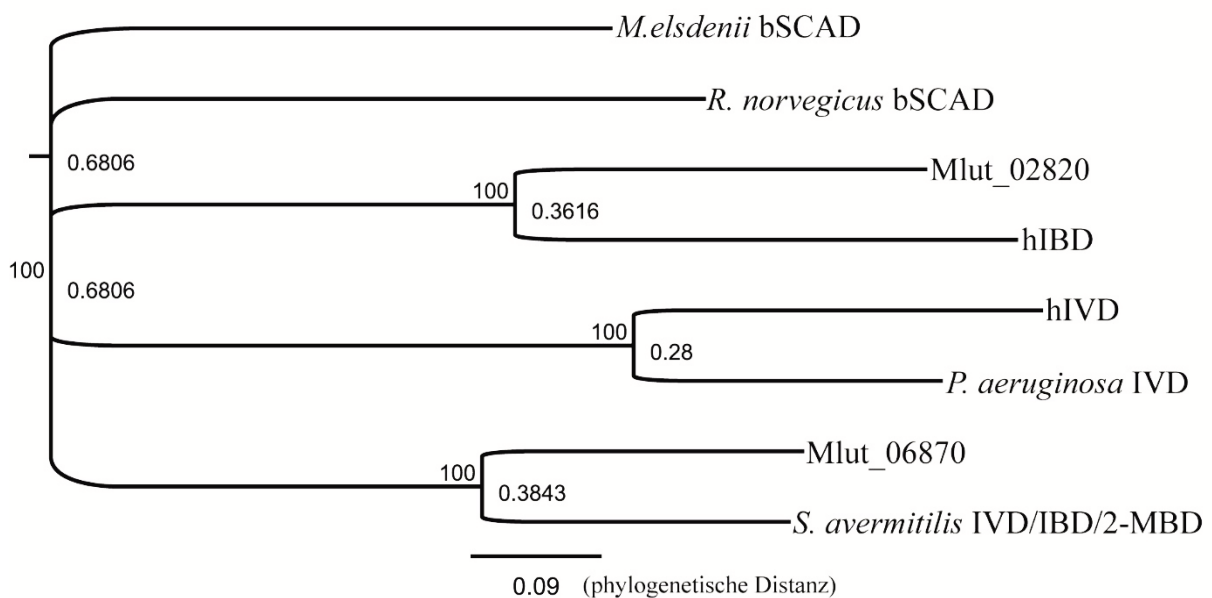


Abbildung 45: Ähnlichkeitsbaum auf Grundlage eines Aminosäuresequenz-Alignments von Acyl-CoA-Dehydrogenasen für kurzketige Substrate. Die dafür genutzten Sequenzen sind Kandidaten, die im Genom von *M. luteus* gefunden wurden, sowie ausgewählte charakterisierte Beispiele aus der Literatur [75]–[80]. Das Alignment wurde mit Clustal Omega [81] und einer Blosom62-Matrix erstellt. Die Umwandlung in einen Homologie-Baum erfolgte in Geneious (am Verzweigungspunkt links „bootstrap“ Prozent, rechts Bayesianische a posteriori Wahrscheinlichkeit) [82]. Abkürzungen: bSCAD, Butanoyl-CoA-Dehydrogenase; hIVD, humane Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase; hIBD, humane Isobutanoyl-CoA-Dehydrogenase; IVD, Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase; IBD, Isobutanoyl-CoA-Dehydrogenase; 2-MBD, 2-Methylbutanoyl-CoA-Dehydrogenase.

Durch Austausch mit einer Kanamycin-Kassette wurde von allen sieben Genkandidaten im genomischen Hintergrund von *trpE16* und *trpE16 ope* Deletions-Mutanten erstellt.

Die GC/MS-Analyse der Olefin- und Fettsäureproduktion zeigte bezüglich der absoluten Mengen und der Isomeren-Zusammensetzung für *trpE16 Δ02820:kan* im Vergleich zum Ausgangsstamm *trpE16* und für *trpE16 ope Δ02900:kan* im Vergleich zum Ausgangsstamm *trpE16 ope* ohne Supplementierung von verzweigten Aminosäuren keine Änderungen (Abbildung 47). Die Supplementierung des Naylor-Mediums mit 4 mM Isoleucin resultierte im *trpE16 ope* Ausgangsstamm wie dem *trpE16 ope Δ02900:kan* Deletions-Stamm in einer 3fach höheren absoluten Olefinproduktion (eine Steigerung von 8 mg/g Zellen ohne Supplementierung auf 25 mg/g Zellen mit Isoleucin-Supplementierung), wobei nahezu exklusiv *aiaI*-Isomeren gebildet wurden. Diese alleinige *aiaI*-Isomeren-Produktion konnte auch für *trpE16 Δ02820:kan* und seinen Ausgangsstamm *trpE16* beobachtet werden (Abbildung 47). Dies erfolgt offensichtlich aufgrund einer Präferenz von *Micrococcus* für das Verstoffwechseln von Isoleucin-Derivaten. Die Supplementierung mit Valin im Naylor-Medium führte dagegen in den Ausgangsstämmen zu einer *iso/iso*-Isomeren dominierten Olefinproduktion, während in den *Mlut_02900* und *Mlut_02820* Deletions-Mutanten größere Anteile von *isoaI*- und *aiaI*-Olefinen erhalten blieben (Abbildung 47). Wie bereits unter Abschnitt „5.2.1. Ungezielte Optimierung der Olefinsynthese“ angesprochen, beinhaltet der Gencluster *Mlut_02820-02900* den Transkriptions-Regulator *Mlut_02880*, der als Repressor auf die benachbarten Gene des Genclusters *Mlut_02820-02900* und den mutmaßlichen β -Oxidationscluster *Mlut_19540-70* wirkt. Es kann angenommen werden, dass im stillgelegten Zustand die einzelne Deletion von *Mlut_02820* oder *Mlut_02900* keine Phänotypen zeigen kann. Um daher weitere Informationen über die Substratspezifität der Dehydrogenasen des Genclusters *Mlut_02820-02900* zu generieren wurden eine Deletions-Mutante des Regulators *Mlut_02880* sowie Doppel-Deletions-Mutanten des Regulators und je einer der beiden Dehydrogenasen im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* erzeugt. Die Fettsäure- und Olefinprofile dieser Mutanten im Vergleich zum *trpE16 ope* Ausgangsstamm wurden nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium per GC/MS untersucht.

Die Deletion des Regulators Mlut_02880 führte im LB- und Naylor-Medium zu einer Steigerung des Anteils der ungeradzahligen *iso*-verzweigten Fettsäuren (Leucin-Derivate) und zu einem Abfall des Anteils der ungeradzahligen *ai*-verzweigten sowie geradzahligen *iso*-verzweigten Fettsäuren (Isoleucin- bzw. Valin-Derivate) (Abbildung 46). Auf Olefin-Ebene resultierte dies in einer fast gleichmäßigen Verteilung von *isoiso*- und *aiai*-verzweigten Olefinen (Abbildung 47). Die zusätzliche Deletion jeder der beiden benachbarten Dehydrogenase-Gene (Mlut_02820, Mlut_02900) regenerierte die *ai*-Fettsäure bzw. *aiai*-Olefin-dominierte Isomeren-Zusammensetzung (Isoleucin-Derivate), aber auch die Anteile geradzahliger *iso*-verzweigter Fettsäuren (Valin-Derivate) des Ausgangsstammes trpE16 ope vollständig (Abbildung 46 und 47). Dieser Phänotyp konnte in abgeschwächter Form auch durch die zusätzliche Ausschaltung der Acyl-CoA-Synthetase Mlut_02890 im selben Gencluster erzeugt werden (siehe Anhang 9.2. Abbildung 82). Diese Synthetase kann dem letzten Reaktionsschritt des Isoleucin-Abbaus zugeordnet werden (Abbildung 41).

Mit dem Rohextrakt der Deletions-Mutante von Mlut_06870 und dem Ausgangsstamm trpE16 wurde zunächst ein DCPIP-basierter *in vitro* Dehydrogenase-Assay [83], [84] unter Benutzung von Isovaleryl-CoA als Substrat durchgeführt. Der Rohextrakt der Deletions-Mutante zeigte reduzierte Aktivität ($-2,22E^{-03}$ OD₆₀₀/min) im Vergleich zum Ausgangsstamm ($-4,24E^{-03}$ OD₆₀₀/min). Auch wenn diese Daten aufgrund der Benutzung von Rohextrakt mit Vorsicht zu bewerten sind, zeigen sie jedoch, dass die Dehydrogenase, codiert durch Mlut_06870, das Intermediat des Leucin-Abbaus Isovaleryl-CoA umsetzt. Somit sollte die Ausschaltung des Gens der mutmaßlichen Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase Mlut_06870 den weiteren Leucin-Abbau an der Abzweigung zur Fettsäure-Biosynthese blockieren (siehe Abbildung 41). Die GC/MS-Untersuchung von trpE16 Δ 06870:kan zeigte höhere Anteile der ungeradzahligen *iso*-verzweigten Fettsäuren (Leucin-Derivate) (Abbildung 46) und in der Folge höhere Anteile der korrespondierenden *isoiso*-Olefine im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 (Abbildung 47). Gleichzeitig fielen die Anteile der *ai*-verzweigten Fettsäuren und in Konsequenz der *aiai*-verzweigten Olefine ab. Insgesamt kam es also zu einer Verschiebung von überwiegender *aiai*- zur *isoiso*-Olefinproduktion in der Deletions-Mutante von Mlut_06870.

Die zusätzliche Supplementierung von 4 mM Leucin im Naylor-Medium führte zu höheren Anteilen *iso*-verzweigter Olefine bei *M. luteus* trpE16, allerdings kam es in der Deletions-Mutante von Mlut_06870 zu fast ausschließlicher Produktion von *iso/iso*-verzweigten Olefinen (Abbildung 47). Diese Verschiebungen zeigten eine verstärkte Verfügbarkeit von Leucin-abgeleiteten Acyl-CoA-Primer-Molekülen für die Fettsäure-Biosynthese, herbeigeführt einmal durch die Supplementierung mit Leucin und nochmal verstärkt durch die gleichzeitige Deletion der mutmaßlichen Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase.

Das Gen Mlut_06840 codiert einen Transkriptions-Regulator und befindet sich zum einen benachbart zu dem vermeintlichen Leucin-Abbaucuster Mlut_06850-90 und zum anderen nahe an dem für den BCKD-Komplex codierenden Gencluster Mlut_06800-20 (siehe Abbildung 41). Der Regulator gehört zur TetR (Tetracyclin-Repressor) -Familie, deren Mitglieder für die Kontrolle von Abbau-Stoffwechselwegen bekannt sind. Um mögliche Ziele des Regulators unter den umgebenden Abbau-Genclustern der verzweigten Aminosäuren zu identifizieren, wurde die Transkription der Gene Mlut_06800 und Mlut_06850 per RT-qPCR in der Deletions-Mutante trpE16 Δ 06840 (markerlose Deletion) und im Ausgangsstamm trpE16 analysiert.

Relative Quantifizierung durch die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode [63] zeigte, dass das Genprodukt von Mlut_06840 als Repressor auf die Gene des Cluster Mlut_06850-90 wirkt, da die Transkription von Mlut_06850 in der Regulator-Deletions-Mutante im Schnitt um das 19,3-Fache im LB-Medium und um das 152,9-Fache im Naylor-Medium erhöht war, aber nicht auf die Gene des Clusters der BCKA-Dehydrogenase Mlut_06800-20, da die Transkription von Mlut_06800 in der Regulator-Deletions-Mutante vergleichsweise unverändert blieb (Abbildung 48). Auf Fettsäure-Ebene führte die Deletion des Regulators im Naylor-Medium zu einer Verschiebung von verzweigten Fettsäuren, abgeleitet von jeder der drei verzweigten Aminosäuren, zu unverzweigten Fettsäuren. Im LB-Medium dagegen betraf die Limitierung der verzweigten Fettsäuren nur die ungeradzahligen *iso*-verzweigten Fettsäuren (Leucin-Derivate) (Abbildung 46). Bezüglich der Olefinproduktion wurden unterschiedliche Phänotypen im Naylor- bzw. LB-Medium beobachtet.

Im Naylor-Medium konnte eine Verschiebung von allen Arten an verzweigten Isomeren (*isoiso*, *isoai* und *aiai*-Isomeren) zu unverzweigten Isomeren festgestellt werden, was den Verschiebungen auf Fettsäure-Ebene entspricht. Im LB-Medium wurde nur eine leichte Verschiebung von *isoai*- zu *aiai*-Olefinen beobachtet (Abbildung 47).

5.2.3.3.3. Wachstumsstudien der Mutanten des Abbaus der verzweigten Aminosäuren

Zur weiteren Bestätigung der Rolle des von Mlut_06800-20 codierten Enzymkomplexes als BCKA-Dehydrogenase sowie von Mlut_06870 als Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase wurde das Wachstum der Deletions-Mutanten in abgewandeltem Naylor-Medium ohne Ammoniumchlorid und nur mit verschiedenen Aminosäuren als einzige Stickstoffquelle untersucht (Abbildung 49). Der Ausgangsstamm trpE16 war nicht in der Lage auf den verzweigten Aminosäuren L-Isoleucin und L-Valin als einzige Stickstoffquelle zu wachsen (Daten nicht gezeigt). Die Supplementierung mit L-Leucin unterstützte dagegen das Wachstum von trpE16. Für die Deletions-Mutanten von Mlut_06800-20 und Mlut_06870 war dieses Wachstum jedoch nicht mehr möglich. Die Ausschaltung des BCKA-Dehydrogenase-Komplexes verhindert zum einen die Bildung verzweigter Acyl-CoA-Primer-Moleküle ausgehend von jeder supplementierten Aminosäure, was vermeintlich zu drastischen Änderungen des Lipidprofils der Membran und der Membranfluidität führt und zum anderen führt es zur Aufkonzentrierung der Substrate der BCKA-Dehydrogenase-Reaktion, die wiederum die Produkte der vorangeschalteten Transaminase-Reaktion sind. Dies hemmt vermutlich zusätzlich die weitere Desaminierung von Aminosäuren und die Übertragung von Ammonium auf α -Ketoglutarat unter Bildung von Glutamat, das wiederum essentiell ist für die Bildung anderer Aminosäuren. Dies scheint jedoch im Fall der BCKA-Dehydrogenase-Komplex-Deletions-Mutante nicht entscheidend, da auch die Supplementierung von L-Glutamat und wie bereits oben erwähnt auch die zusätzliche Stickstoffquelle Ammoniumchlorid in normalen Naylor-Medium der Mutante kein Wachstum erlaubte.

Die Deletion der Dehydrogenase Mlut_06870 verhinderte, wie gesehen, nicht die Synthese verzweigter Fettsäuren und Olefine, aber auch hier kann die Blockade des weiteren Leucin-Abbaus, sollte dieser normalerweise stark genutzt werden, die weitere Desaminierung und Abbau von Aminosäuren und die Bildung des zentralen Stickstoff-Metaboliten Glutamat verhindern. Deshalb erlaubte die Supplementierung mit L-Glutamat der Deletions-Mutante trpE16 Δ 06870:kan wiederum das Wachstum. Die Vermutung, dass das Wachstum von *M. luteus* auf L-Isoleucine oder L-Valine als einziger Stickstoffquelle nicht möglich ist, weil das entsprechende Abbau-Gencluster Mlut_02820-02900 durch den Regulator Mlut_02880 kontinuierlich stillgelegt ist, konnte durch ein zusätzliches Wachstumsexperiment mit der Deletions-Mutante des Regulators und deshalb induziertem Isoleucin- bzw. Valin-Abbau-Gencluster nicht bestätigt werden. Das Wachstum von *M. luteus* auf L-Isoleucine oder L-Valine war weiterhin nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

Fettsäuren

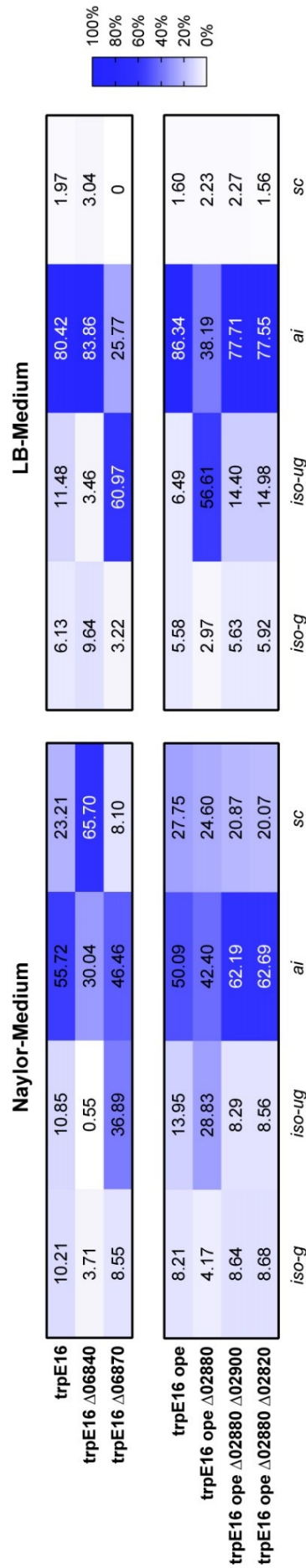


Abbildung 46: Verteilung der Fettsäure-Isomeren in der Deletions-Mutante des Transkriptions-Regulators Mlut_02880 im Vergleich zu Doppelmutanten mit zusätzlicher Deletion der Dehydrogenasen Mlut_02900 oder Mlut_02820 für kurzketige und verzweigte Substrate sowie der Deletions-Mutante des Regulators Mlut_06840 im Vergleich zum Ausgangsstamm *trpE16* im Naylor- (links) und LB- (rechts) Medium. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten dargestellt. Die Standardabweichungen der Prozentwerte lagen bei maximal 10 % (i.d.R. 1-4 %).

Olefine

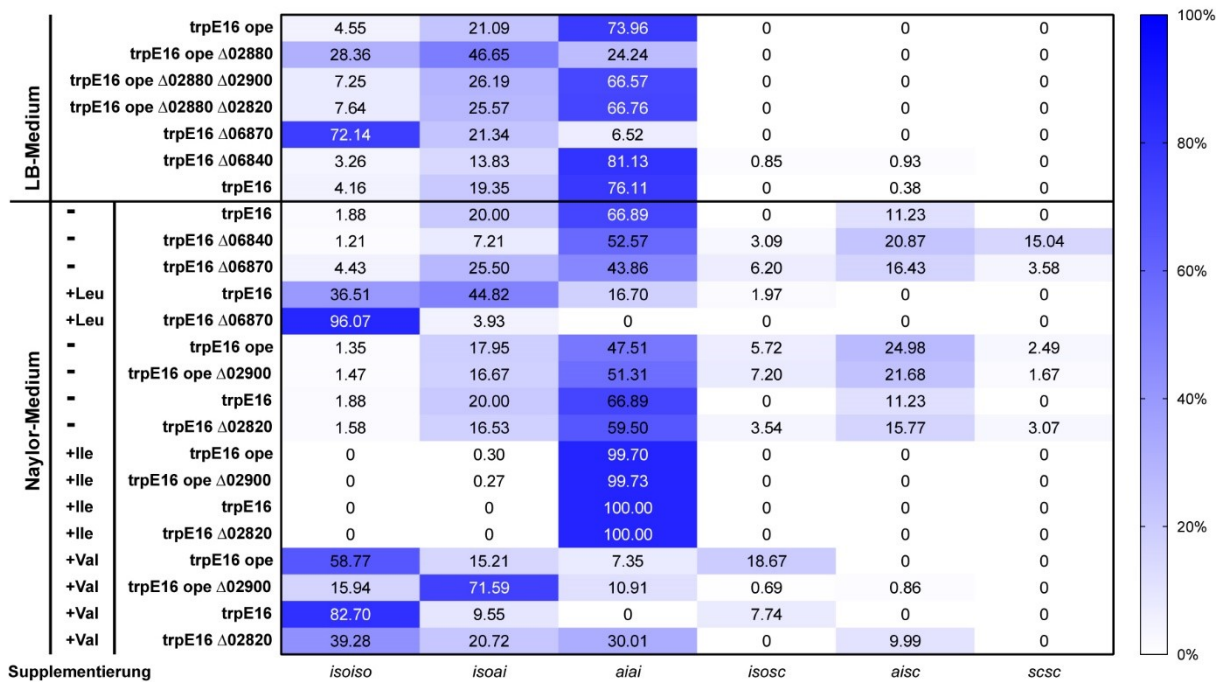


Abbildung 47: Verteilung der Olefin-Isomeren in der Deletions-Mutante des Transkriptions-Regulators Mlut_02880 im Vergleich zu Doppelmutanten mit zusätzlicher Deletion der Acyl-CoA-Dehydrogenasen Mlut_02900 oder Mlut_02820 für kurzkettige verzweigte Substrate im LB-Medium, der Deletions-Mutante des Regulators Mlut_06840 sowie der Deletions-Mutante der Acyl-CoA-Dehydrogenase Mlut_06870 für kurzkettige verzweigte Substrate im LB-Medium und im Naylor-Medium mit und/oder ohne Supplementierung von Leucin im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 und der Deletions-Mutanten der Acyl-CoA-Dehydrogenasen Mlut_02820 und Mlut_02900 im Naylor-Medium mit und ohne Supplementierung von Isoleucin und Valin im Vergleich zu ihren Ausgangsstämmen. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten dargestellt. Die Standardabweichungen der Prozentwerte lagen bei maximal 10 % (i.d.R. 1-4 %).

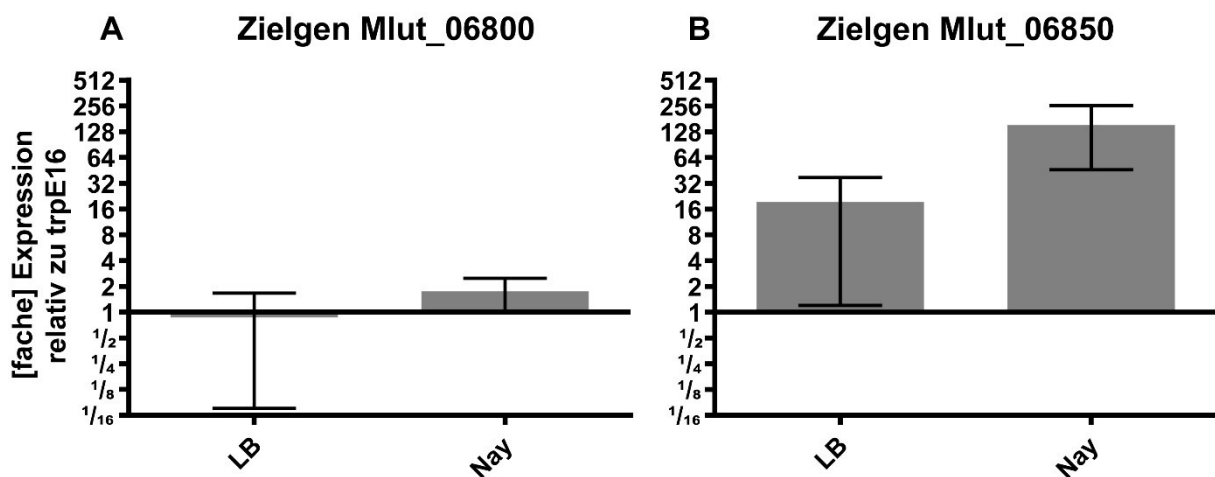


Abbildung 48: Effekt der Deletion des Regulatorgens Mlut_06840 auf das Transkriptionsniveau der Gene Mlut_06800 (A) und Mlut_06850 (B). Die Ergebnisse der qPCR basierend auf zu cDNA umgewandelten RNA-Proben der Mutanten und des Ausgangsstammes trpE16 wurden mithilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Drei technische Einzelmessungen von zwei biologischen Replikaten, gewachsen in LB- oder Naylor-Medium sind aufgetragen.

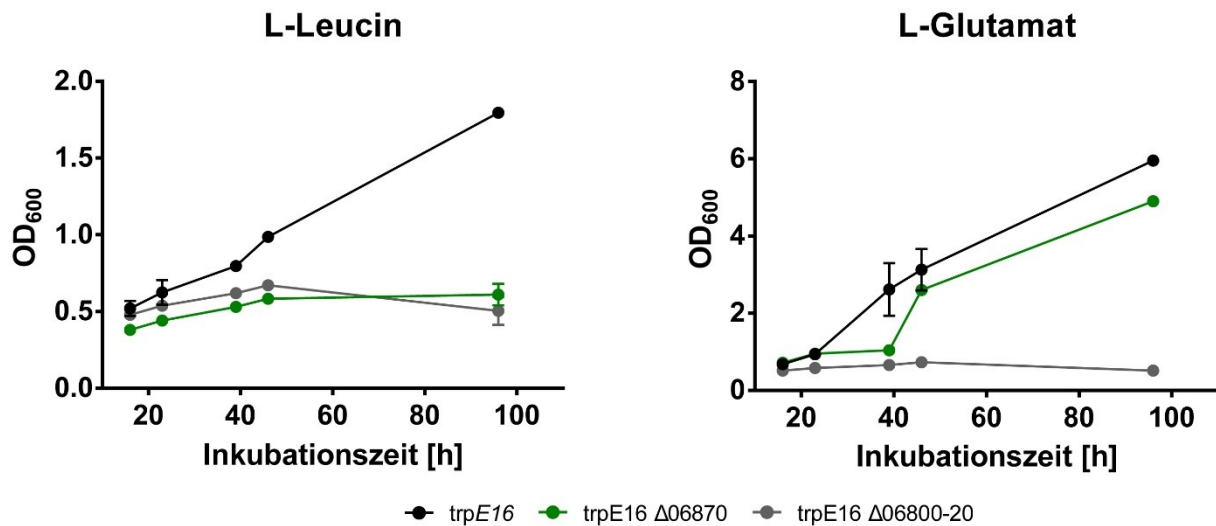


Abbildung 49: Wachstumskurven von Deletions-Mutanten des Abbaus verzweigter Aminosäuren in einem abgewandelten Naylor-Medium mit entweder L-Leucin oder L-Glutamat als einzige Stickstoffquelle. Die OD_{600} -Werte sind gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten sind dargestellt.

5.2.3.4. Die Reaktion der Acyl-ACP-Thioesterase (Tes)

Die Acyl-ACP-Thioesterase katalysiert die Hydrolyse von Acyl-ACPs zu freien Fettsäuren, den letzten Schritt der Fettsäure-Biosynthese (Abbildung 36). Die Aktivität des Enzyms ist aus zwei Gründen für die Substratverfügbarkeit der Olefinsynthese relevant. Die Anhäufung von Acyl-ACPs am Ende der Fettsäure-Biosynthese führt zu deren nachhaltiger Unterdrückung [37], weshalb Acyl-ACPs rasch zu spalten sind. Auch besitzen die Acyl-ACP-Thioesterasen verschiedener Bakterien oder Eukaryoten unterschiedliche Kettenlängen-Spezifitäten [40], was die Kettenlängen der freien Fettsäuren und in der Folge der Acyl-CoAs, die Substrate der Olefinsynthese, bestimmt. Durch Homologie-Suchen mit Aminosäuresequenzen bereits erfolgreich identifizierter und charakterisierter bakterieller und pflanzlicher Acyl-ACP-Thioesterasen konnten sechs Genkandidaten im Genom von *M. luteus* ausgemacht werden (Tabelle 37).

Tabelle 37: Liste ermittelter Acyl-ACP-Thioesterase-Genkandidaten mit aktueller Annotation und charakterisierten Pfam-Domänen (E-Wert $\leq 0,01$) [85], [86]. Abkürzungen: FadM, Domäne der Acyl-CoA-Thioesterase FadM; 4HBT_2, Domäne einer „thioesterase-like“ Superfamilie; Abhydrolase_6, Domäne einer α/β -Hydrolase-Familie; TesB, Domäne der Acyl-CoA-Thioesterase II; 4HBT_3, Domäne einer „thioesterase-like“ Superfamilie; 4HBT, Domäne der 4-Hydroxybenzoyl-CoA-Thioesterase; Abhydrolase_1, α/β -Hydrolase-Faltung.

ORF	Annotation	Domänen
Mlut_04420	Thioesterase	FadM; 4HBT_2
Mlut_07570	Hypothetisches Protein	Abhydrolase_6
Mlut_09760	Acyl-CoA Thioesterase II	TesB; 4HBT_3
Mlut_19420	Thioesterase	4HBT_2
Mlut_22190	Thioesterase Superfamilie	FadM; 4HBT
Mlut_22730	Hydrolase oder Acyltransferase der α/β -Superfamilie	Abhydrolase_1

Von allen Genkandidaten wurden durch Austausch mit einer Kanamycin-Kassette Deletions-Mutanten in *M. luteus* trpE16 hergestellt.

Die Olefin- und Fettsäureproduktion der Deletions-Mutanten wurde in Proben der stationären Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 untersucht.

Im LB-Medium wiesen trpE16 Δ 09760:kan und trpE16 Δ 04420:kan tendenziell etwas erhöhte Olefinmengen auf, im Naylor-Medium dagegen trpE16 Δ 09760:kan und trpE16 Δ 19420:kan (Abbildung 50A). Gleichzeitig konnten für trpE16 Δ 04420:kan Verschiebungen der Fettsäuren von ungeradzahligen *iso*-verzweigten zu unverzweigten Fettsäuren und von C15- zu C16-Kettenlängen beobachtet werden (Abbildung 50B). Auf Olefin-Ebene dagegen waren Verschiebungen von *aiai*- zu *isoiso*-Isomeren, aber auch von kürzeren zu längeren Kettenlängen feststellbar (Abbildung 50C). Die hier im genomischen Hintergrund von trpE16 beobachteten Phänotypen, nämlich die Steigerungen der Olefinproduktion, konnten im Hintergrund von trpE16 ope mit erhöhter Transkription des *oleABCD*-Genclusters nicht mehr beobachtet werden.

Weiterhin wurde versucht durch die Expression heterologer Acyl-ACP-Thioesterasen Einfluss auf die produzierten Fettsäure-Kettenlängen zu nehmen sowie möglicherweise eine wirksame Inhibition der Fettsäure-Biosynthese durch Acyl-ACPs aufzuheben.

Dazu wurden die charakterisierten pflanzlichen Acyl-ACP-Thioesterasen von *Cuphea palustris* FatB1 mit Kettenlängenspezifität für C8-Fettsäuren (cpTE) und *Umbellularia californica* FatB1 mit Kettenlängenspezifität für C12-Fettsäuren (ucTE) sowie die charakterisierten bakteriellen Acyl-ACP-Thioesterasen von *Bacteroides thetaiotaomicron* mit Kettenlängenspezifität für C4-/C14-Fettsäuren (bacTE) und *Clostridium thermocellum* mit Kettenlängenspezifität für C14-Fettsäuren (closTE) [40] verwendet.

Die neuen für *M. luteus* codon-optimierten Thioesterase-Gene wurden hinter den nativen Promotor von Mlut_19390 zusammen mit einer Kanamycin-Kassette in den genomischen Hintergrund von *M. luteus* trpE16 ope kloniert. Dabei wurde das Gen Mlut_19390 ersetzt. Der Promotor von Mlut_19390 gehört laut eigenen RNA-Sequenzierungsdaten (siehe Anhang 9.3. Tabelle 42) zu den stärksten im Genom von *M. luteus*.

Die Olefinproduktion der Acyl-ACP-Thioesterase-Mutanten wurde in Proben aus der stationären Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 ope untersucht.

Die Mutante mit möglicher Expression der Thioesterase von *Cuphea palustris* (cpTE) zeigte im Naylor-Medium eine Reduktion der Olefinmenge auf 50 %, davon abgesehen war keine deutliche Beeinflussung der produzierten Olefinmengen durch eine andere Thioesterase in LB- oder Naylor-Medium feststellbar (Abbildung 51A). Die zusätzliche Thioesterase von *Bacteroides thetaiotaomicron* (bacTE) führte im LB-Medium zu leichten Verschiebungen von *ai*- zu *iso*-verzweigten Olefinen, dagegen im Naylor-Medium zu deutlichen Verschiebungen von *iso*- zu *ai*-verzweigten Olefinen. Die zusätzliche Thioesterase von *Clostridium thermocellum* (closTE) führte im LB-Medium zu leichten Verschiebungen von *ai*- zu *iso*-verzweigten und unverzweigten Olefinen, dagegen im Naylor-Medium zu deutlichen Verschiebungen von *iso*-verzweigten und unverzweigten Olefinen zu *ai*-verzweigten Olefinen. Die zusätzliche Thioesterase von *Cuphea palustris* (cpTE) führte in LB-Medium zu Verschiebungen der Isomeren von unverzweigten zu verzweigten, vor allem *ai*-verzweigten, Olefinen sowie C29-Kettenlängen. In Naylor-Medium führte die pflanzliche Thioesterase zu Verschiebungen der Isomeren von unverzweigten und *iso*-verzweigten Olefinen zu *ai*-verzweigten Olefinen sowie auch zu C29-Kettenlängen.

Die zusätzliche Thioesterase von *Umbellularia californica* (ucTE) führte in LB-Medium zu Verschiebungen von unverzweigten zu verzweigten Olefinen, dagegen in Naylor-Medium von verzweigten zu unverzweigten Olefinen sowie von längeren zu kürzeren Kettenlängen (Abbildung 51).

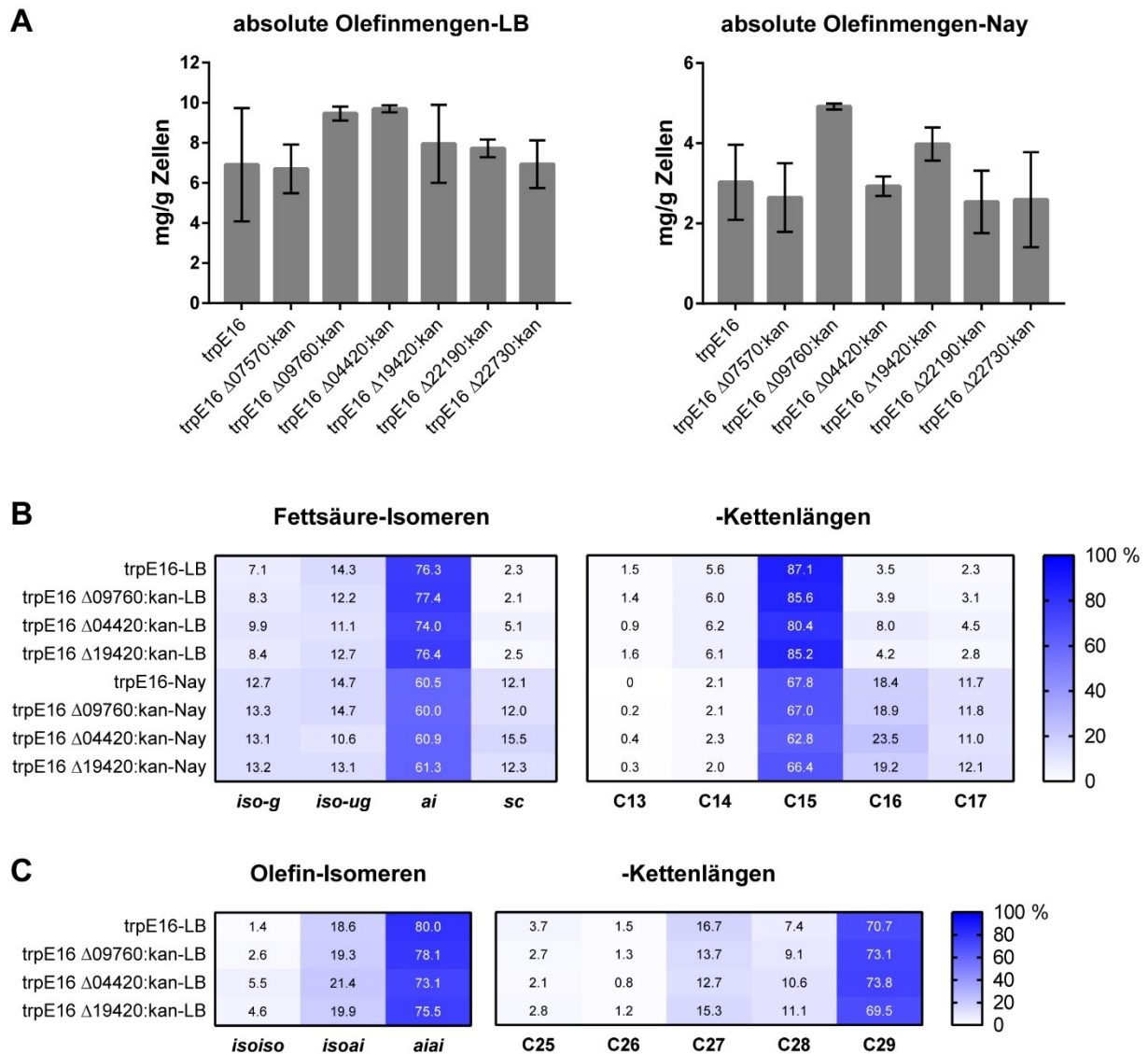


Abbildung 50: Olefin- und Fettsäureproduktion der Acyl-ACP-Thioesterase Deletions-Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 in der stationären Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium. In (A) sind die absoluten Olefinmengen in LB- und Naylor-Medium, in (B) sind die Fettsäure-Isomeren und -Kettenlängen in LB- und Naylor-Medium und in (C) sind die Olefin-Isomeren und -Kettenlängen im LB-Medium gezeigt. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten gezeigt. Die Standardabweichung der Prozentwerte liegt bei maximal 4 %. Abkürzungen: LB, Probe aus LB-Kultur; Nay, Probe aus Naylor-Kultur.

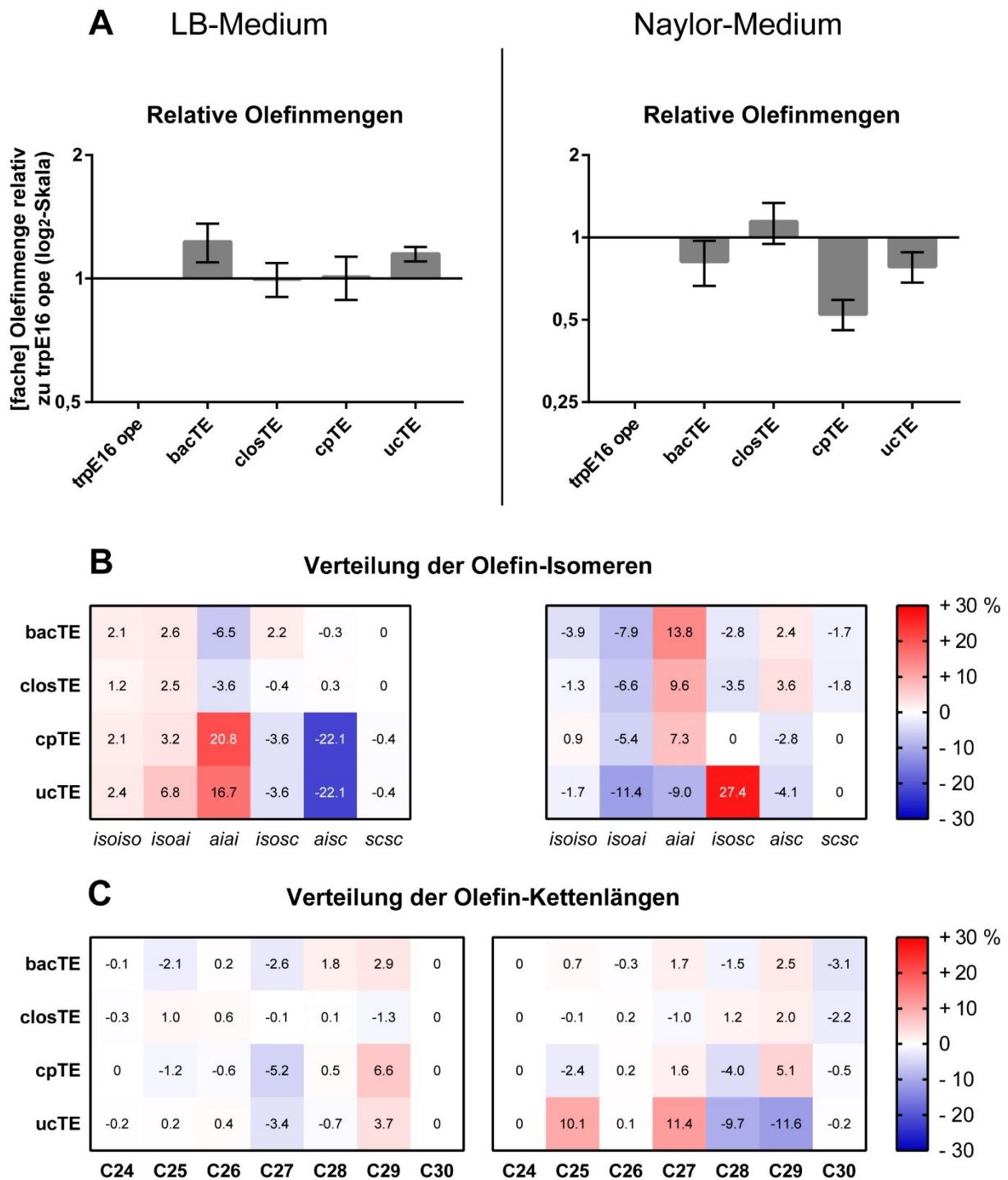


Abbildung 51: Olefinproduktion rekombinanter *M. luteus*-Stämme mit möglicher Expression von heterologen pflanzlichen oder bakteriellen Acyl-ACP-Thioesterasen im Vergleich zum Ausgangsstamm *trpE16 ope* in stationärer Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium. In (A) sind relative Olefinmengen, in (B) die Olefin-Isomeren-Verteilungen und in (C) die Olefin-Kettenlängen-Verteilungen im LB- und Naylor-Medium gezeigt. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Die Standardabweichung der Prozentunterschiede zu *trpE16 ope* beträgt maximal 5 %. Abkürzungen: LB, Probe aus LB-Kultur; Nay, Probe aus Naylor-Kultur; bacTE, Mutante mit Thioesterase von *Bacteroides thetaiotaomicron*; closTE, Mutante mit Thioesterase von *Clostridium thermocellum*; cpTE, Mutante mit Thioesterase von *Cuphea palustris*; ucTE, Mutante mit Thioesterase von *Umbellularia californica*.

5.2.3.5. Die Reaktion der Acyl-CoA-Synthetase (FadD)

Acyl-CoA-Synthetasen stellen den ersten Schritt der β -Oxidation dar und katalysieren die Aktivierung der freien Fettsäuren zu Acyl-CoAs, die sowohl der weiteren β -Oxidation als auch der Olefinsynthese als Substrate dienen. Die Rate der FadD-Reaktion sowie eventuelle Kettenlängen- und Isomeren-Spezifitäten der aktiven Enzyme beeinflussen die Substratverfügbarkeit der Olefinsynthese unmittelbar (siehe Abbildung 36).

Durch Homologie-Suchen mit Aminosäuresequenzen bereits erfolgreich identifizierter und charakterisierter bakterieller Enzyme konnten neun Genkandidaten im Genom von *M. luteus* ausgemacht werden (Tabelle 38).

Tabelle 38: Liste ermittelter Acyl-CoA-Synthetase-Genkandidaten mit aktueller Annotation und charakterisierten Pfam-Domänen (E-Wert $\leq 0,01$) [85], [86]. Abkürzungen: AMP-binding, Domäne einer AMP-bindenden Protein-Superfamilie; ACAS_N, N-Terminus einer Acetyl-CoA-Synthetase; AMP-binding_C, C-Terminus eines AMP-bindenden Proteins; PRK00174, Domäne einer Acetyl-CoA-Synthetase; Ac_CoA_lig_AcsA, Domäne einer Acetat-CoA-Ligase bzw. Acetyl-CoA-Synthetase; ACS, Domäne einer Acetyl-CoA-Synthetase; VL_LC_FACS_like, Domäne einer Acyl-CoA-Synthetase für lange bzw. sehr lange „bubblegum-like“ Fettsäuren; ATP-grasp_5, Domäne von Proteinen mit ATP-abhängiger Carboxylat-Amin Ligase-Aktivität; Acetyltransf_1, Domäne einer Familie von N-Acetyltransferasen; Acetyltransf_4, Domäne einer Familie von N-Acetyltransferasen; CoA_binding_2, CoA-bindende Domäne mit „Rossmann“-Faltung; Succ_CoA_lig, katalytische Domäne der Succinyl-CoA-Ligase-Untereinheit A; AMP-binding super family, Domäne einer AMP-bindenden Protein-Superfamilie; AMP-binding_C_2, Domäne im C-Terminus von AMP-bindenden Enzymen; PaaK super family, Domäne einer Phenylacetat-CoA-Ligase Superfamilie; AFD_class_I super family, Domäne Adenylat-bildender Protein-Superfamilie; FC-FACS_FadD_like, Domäne prokaryotischer langkettiger Acyl-CoA-Synthetasen ähnlich zu FadD in *E. coli*.

ORF	Annotation	Domänen
Mlut_02430	Acetyl-CoA Ligase	AMP-binding; ACAS_N; AMP-binding_C; PRK00174; Ac_CoA_lig_AcsA; ACS
Mlut_05330	Acyl-CoA Ligase für langkettige Fettsäuren	AMP-binding; VL_LC_FACS_like
Mlut_13180	Acyl-CoA Synthetase (NDP bildend)	ATP-grasp_5; Acetyltransf_1; Acetyltransf_4; CoA_binding_2; Succ_CoA_lig
Mlut_13790	Acyl-CoA Ligase für langkettige Fettsäuren	AMP-binding; VL_LC_FACS_like
Mlut_17630	AMP-bindendes Protein	AMP-binding; AMP-binding_C; AMP-binding super family
Mlut_19550	Acyl-CoA Synthetase	AMP-binding; AMP-binding_C; AMP-binding super family
Mlut_20330	Phenylacetat-CoA Ligase	AMP-binding; AMP-binding_C_2; PaaK super family
Mlut_20370	Acyl-CoA Synthetase/AMP-Säure Ligase	AMP-binding; AMP-binding_C; AFD_class_I super family
Mlut_22810	Acyl-CoA Ligase für langkettige Fettsäuren	AMP-binding; AMP-binding_C; FC-FACS_FadD_like

Von allen Genkandidaten wurden durch Austausch mit einer Kanamycin-Kassette Deletions-Mutanten im genomischen Hintergrund von *trpE16* und *trpE16* ope $\Delta 02880$:*hyg* mit induziertem mutmaßlichen β -Oxidationscluster *Mlut_19540-70* (siehe Abbildung 32) erstellt (von den Genkandidaten *Mlut_05330* und *Mlut_13790* nur im *trpE16* Hintergrund). Für die Mutanten *trpE16* $\Delta 05330$:*kan* und $\Delta 13790$:*kan* konnte ein deutlicher und reproduzierbarer Phänotyp beobachtet werden. Alle anderen Kandidaten zeigten nach Deletion keinen Phänotyp in keinem der genannten genomischen Hintergründe und unter keiner der genannten Wachstumsbedingungen.

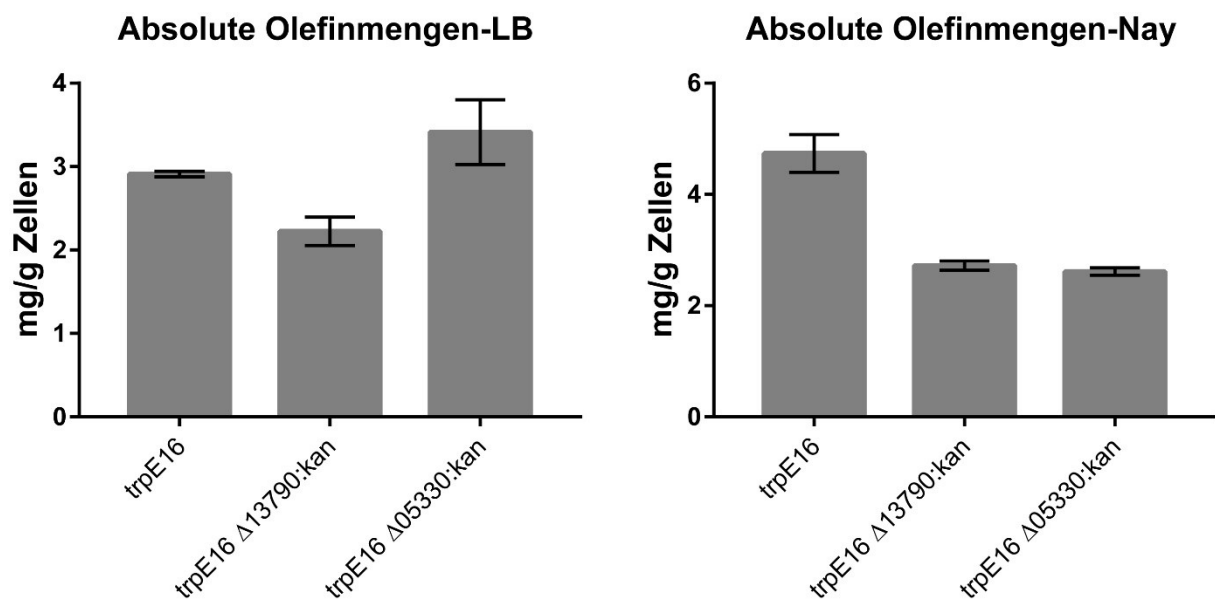


Abbildung 52: Olefinproduktion der Acyl-CoA-Synthetase Deletions-Mutanten *trpE16* $\Delta 13790$:*kan* und $\Delta 05330$:*kan* im Vergleich zu *M. luteus* *trpE16* in stationärer Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Abkürzungen: LB, Probe aus LB-Kultur; Nay, Probe aus Naylor-Kultur.

Im LB-Medium ergab nur die Deletion von *Mlut_13790* eine Reduktion der Olefinproduktion um ca. 20 %. Allerdings führten sowohl die Ausschaltung von Gen *Mlut_13790* als auch *Mlut_05330* im Naylor-Medium zu einer Reduktion der Olefinmenge auf fast 50 % (Abbildung 52).

5.2.3.6. Die Reaktion der Acyl-CoA-Dehydrogenase (FadE)

Die FadE-Reaktion stellt die zweite Reaktion der β -Oxidation dar, die die Acyl-CoAs, die Substrate der Olefinsynthese weiter abbaut. Diese Reaktion steht somit in unmittelbarer Konkurrenz zur Olefinsynthese und die Ausschaltung sollte sich auf die Substratverfügbarkeit positiv auswirken (Abbildung 36).

Durch Homologie-Suchen mit Aminosäure-Sequenzen von charakterisierten bakteriellen und tierischen FadE-Enzymen konnten neben den Acyl-CoA-Dehydrogenasen des Aminosäure-Abbaus Mlut_02820, Mlut_02900 und Mlut_06870 noch drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen und eine Acyl-CoA-Oxidase für die FadE-Reaktion ermittelt werden (Tabelle 39).

Tabelle 39: Liste ermittelter FadE-Reaktions-Genkandidaten mit aktueller Annotation und charakterisierten Pfam-Domänen (E-Wert $\leq 0,01$) [85], [86]. Abkürzungen: Acyl-CoA_dh_1, C-terminale Domäne einer Acyl-CoA-Dehydrogenase; Acyl-CoA_dh_M, mittlere Domäne einer Acyl-CoA-Dehydrogenase; Acyl-CoA_dh_N, N-terminale Domäne einer Acyl-CoA-Dehydrogenase; ACAD super family, Domäne einer Superfamilie von Acyl-CoA-Dehydrogenasen; ACOX, Domäne einer Acyl-CoA-Oxidase.

ORF	Annotation	Domänen
Mlut_03070	Acyl-CoA-Dehydrogenase	Acyl-CoA_dh_1; Acyl-CoA_dh_M; Acyl-CoA_dh_N; ACAD super family
Mlut_11700	Acyl-CoA-Dehydrogenase	ACOX; Acyl-CoA_dh_M; Acyl-CoA_dh_1; ACAD super family
Mlut_19560	Acyl-CoA-Dehydrogenase	Acyl-CoA_dh_1; Acyl-CoA_dh_M; Acyl-CoA_dh_N; ACAD super family
Mlut_23170	Acyl-CoA-Dehydrogenase	Acyl-CoA_dh_1; Acyl-CoA_dh_M; Acyl-CoA_dh_N; ACAD super family

Von den Genkandidaten wurden einzelne Deletions-Mutanten durch Austausch mit einer co-linearen Kanamycin-Kassette im genomischen Hintergrund von trpE16 und von trpE16 ope, der Stamm mit erhöhter Transkription des *oleABCD*-Genclusters, erstellt. Es wurde auch die kombinierte Deletion von zwei bzw. allen vier Genkandidaten ohne Kanamycin-Resistenz im genomischen Hintergrund von trpE16 ope hergestellt. In diesen kombinierten Deletionen auch enthalten ist die Deletion von Mlut_02900. Das Genprodukt zählte im frühen Stadium der Arbeit auch zu den FadE-Reaktions-Genkandidaten. Zuletzt wurden auch Doppel-Deletions-Mutanten der einzelnen Genkandidaten mit zusätzlicher Ausschaltung von Regulator Mlut_02880, die zur Induktion des putativen β -Oxidation-Genclusters Mlut_19540-70 und des Isoleucin-/Valin-Abbaus führt, erstellt (siehe Abbildung 32).

Die Olefinproduktion aller Mutanten wurde anschließend in der stationären Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium im Vergleich zu ihren Ausgangsstämmen trpE16 bzw. trpE16 ope analysiert.

Relative Olefinmengen zu trpE16 bzw. trpE16 ope

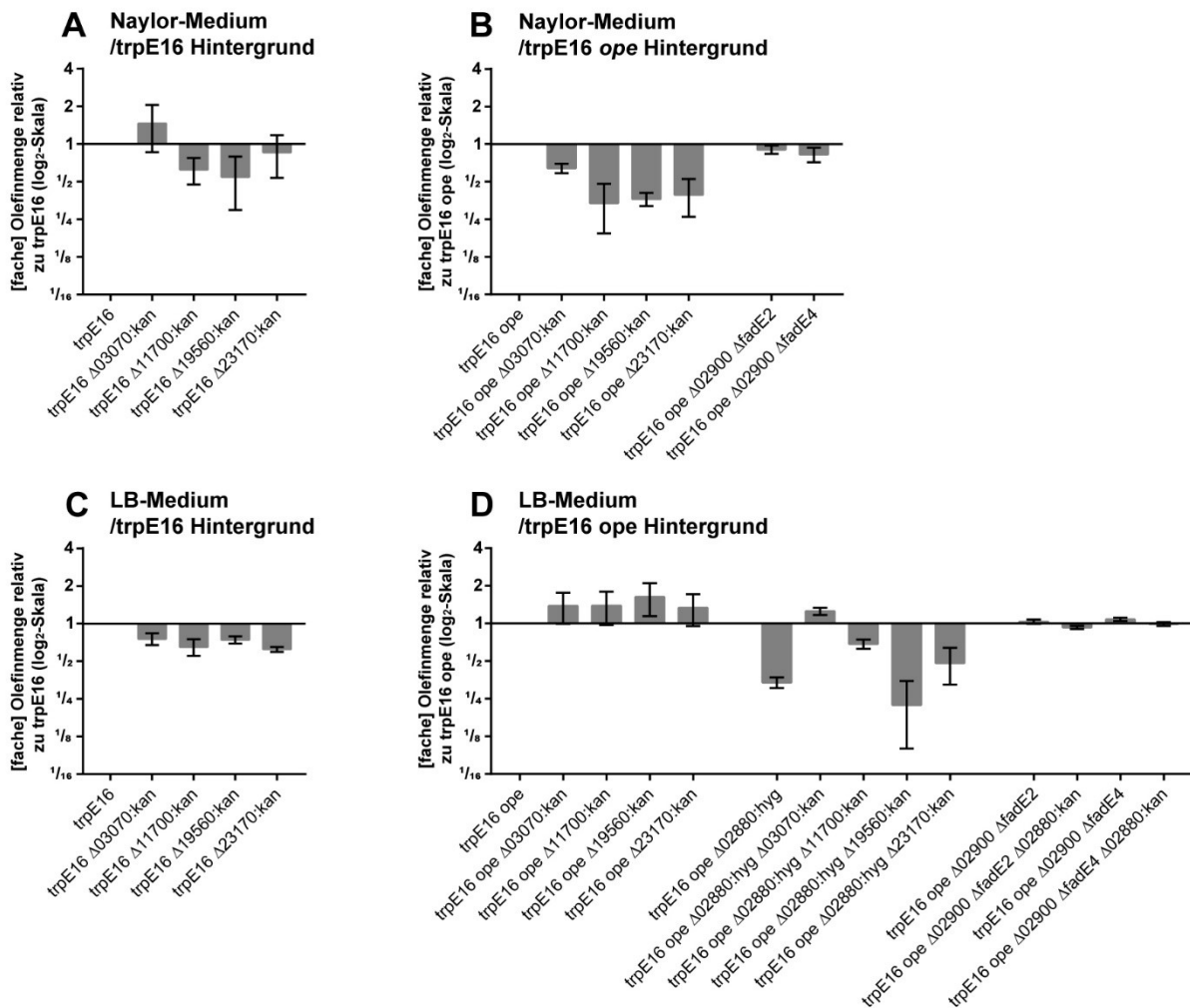


Abbildung 53: Olefinproduktion der Δ fadE-Mutanten relativ zu den Ausgangsstämmen trpE16 bzw. trpE16 ope in stationärer Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium. In (A) ist die Olefinproduktion der Deletions-Mutanten der einzelnen Genkandidaten im genomischen Hintergrund von trpE16 im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 nach Wachstum in Naylor-Medium gezeigt. In (B) ist die Olefinproduktion der Deletions-Mutanten der einzelnen Genkandidaten und die kombinierten Deletionen von zwei bzw. allen Genkandidaten (2.Abschnitt) im genomischen Hintergrund von trpE16 ope im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 ope nach Wachstum in Naylor-Medium gezeigt. In (C) ist die Olefinproduktion der Deletions-Mutanten der einzelnen Genkandidaten im genomischen Hintergrund von trpE16 im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 nach Wachstum in LB-Medium gezeigt. In (D) ist die Olefinproduktion der Deletions-Mutanten der einzelnen Genkandidaten, der einzelnen Genkandidaten zuzüglich der Deletion von Mlut_02880 (2.Abschnitt) und die kombinierten Deletionen von zwei bzw. allen Genkandidaten (3.Abschnitt) im genomischen Hintergrund von trpE16 ope im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 ope nach Wachstum in LB-Medium gezeigt. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Abkürzungen: Δ fadE2, Deletion von Mlut_11700 und Mlut_19560; Δ fadE4, Deletion von Mlut_11700, Mlut_19560, Mlut_03070 und Mlut_23170.

Die einzelnen Deletions-Mutanten im genomischen Hintergrund von *trpE16* zeigten im Naylor-Medium (Abbildung 53A) entweder keine wesentliche Änderung (Mlut_03070, Mlut_23170) oder bereits eine deutliche Reduktion (Mlut_11700, Mlut_19560) der Olefinproduktion. Diese Reduktion verstärkte sich bzw. weitete sich auf alle einzelnen Deletions-Mutanten im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* im Naylor-Medium aus (Abbildung 53B).

Wurden die Deletionen von zwei (Δ *fadE2*) oder allen vier *fadE*-Genkandidaten (Δ *fadE4*) im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* im Naylor-Medium kombiniert (Abbildung 53B, 2. Abschnitt) hob sich der Einbruch der Olefinproduktion komplett auf. Die einzelnen Deletions-Mutanten im genomischen Hintergrund von *trpE16* zeigten alle im LB-Medium (Abbildung 53C) leichte Einschränkungen der Olefinproduktion. Diese Einschränkung hob sich jedoch im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* im LB-Medium auf und wandelte sich in leichte Mehrproduktion für alle Genkandidaten um (Abbildung 53D). Die kombinierte Deletion aller Genkandidaten (Δ *fadE4*) im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* führte auch im LB-Medium zu einer verglichen mit *trpE16 ope* gleichbleibenden Olefinproduktion (Abbildung 53D, 3. Abschnitt). Die Doppel-Deletions-Mutanten mit Deletion des Regulators Mlut_02880 und zusätzlich von Mlut_03070 oder Mlut_11700 zeigten im Vergleich zur einfachen Deletion des Regulators Mlut_02880 im LB-Medium im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* weitgehend regenerierte Olefinmengen, mit Deletion von Mlut_19560 oder Mlut_23170 unverändert geringe oder leicht verbesserte Olefinmengen (Abbildung 53D, 2. Abschnitt). Die Deletion des Regulators Mlut_02880 hatte in Kombination mit der Deletion aller *FadE*-Reaktions-Genkandidaten keine Auswirkung auf die produzierte Olefinmenge (Abbildung 53D, 3. Abschnitt).

5.2.3.6.1. Das Elektronen-transferierende Flavoprotein (Etf)

Acyl-CoA-Dehydrogenasen nutzen als Cofaktor FAD, der die Elektronen der Acyl-CoA-Oxidation aufnimmt und zu FADH₂ reduziert wird. Dieser Cofaktor ist dabei in einem Protein namens Elektronen-transferierendes Flavoprotein (Etf) lokalisiert, mit dem die Acyl-CoA-Dehydrogenasen eine spezifische Interaktion eingehen. Etf wird wiederum durch eine Etf-Dehydrogenase und die Abführung der Elektronen an die Atmungskette regeneriert. Wird Etf ausgeschaltet, so werden alle Acyl-CoA-Dehydrogenasen lahmgelegt.

Durch Homologie-Suchen mit bekannten bakteriellen Orthologen konnte als einziger Gencluster-Kandidat Mlut_02780-90 für die Codierung der α - und β -Untereinheit des Etf im Genom von *M. luteus* ausgemacht werden.

Die Deletion des Genclusters Mlut_02780_90 wurde durch Austausch mit einer co-linearen Kanamycin-Kassette im genomischen Hintergrund von *M. luteus* trpE16 und trpE16 ope bewerkstelligt.

Die Olefin- und Fettsäureproduktion der trpE16 Δ 02780-90:kan und trpE16 ope Δ 02780-90:kan Deletions-Mutanten im Vergleich zu ihren Ausgangsstämmen wurde in der stationären Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium untersucht.

Sowohl im trpE16 wie im trpE16 ope Hintergrund zeigte die Mutante im LB- wie im Naylor-Medium eine deutlich reduzierte Olefinproduktion (Abbildung 54A und 54B). Zusätzlich konnte im trpE16 Hintergrund im LB-Medium eine Verschiebung zu kürzeren Kettenlängen festgestellt werden. Die trpE16-Mutante zeigte außerdem im Naylor-Medium eine Verschiebung von *iso*- zu *ai*-Verzweigung der Olefine. Die trpE16 ope-Mutante wies im LB-Medium eine Verschiebung von *ai*- zu *iso*-Verzweigung und zu kürzeren Kettenlängen auf. Im Naylor-Medium zeigte die trpE16 ope-Mutante eine Verschiebung von verzweigten zu unverzweigten Olefinen sowie einen Verlust der Kettenlängenspezifität (Abbildung 54C und 54D).

Die Δ 02780-90:kan Mutante wies im genomischen Hintergrund von trpE16 ope im LB-Medium einen doppelt so hohen Fettsäuregehalt auf als der Ausgangsstamm trpE16 ope. Dagegen war die Auswirkung der Mutation auf die Fettsäuremenge im Naylor-Medium sowie im genomischen Hintergrund von trpE16 in beiden Medien nicht wesentlich (Abbildung 55A).

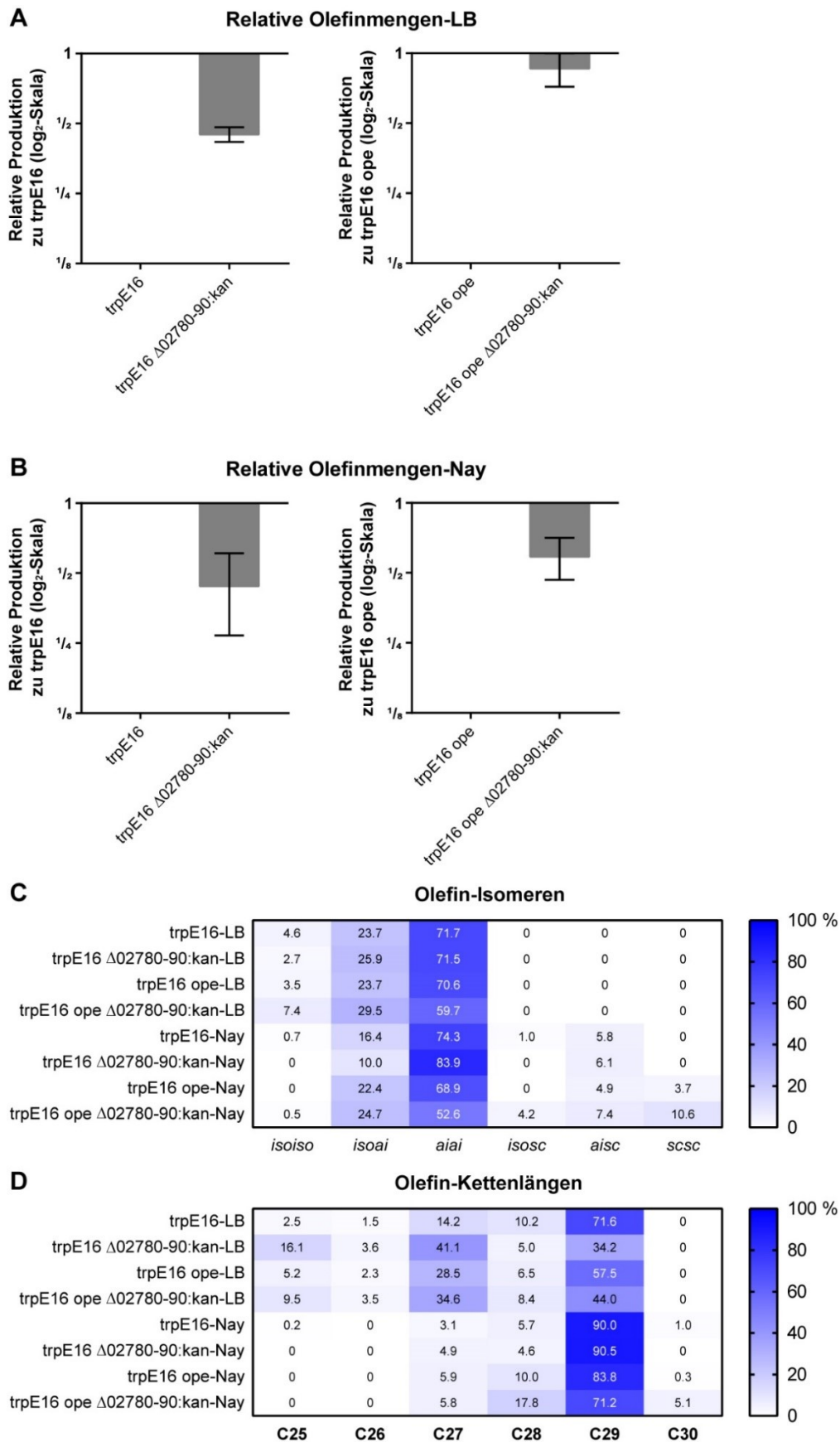


Abbildung 54: Olefinproduktion in relativen Mengen (A, B), Isomeren- (C) und Kettenlängen-Verteilung (D) der Deletions-Mutante von *Mlut_02780-90* im genomischen Hintergrund von *trpE16* und *trpE16 ope* im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsstamm in der stationären Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Die Standardabweichung der Prozentwerte beträgt maximal 3 %.

Zusätzlich wies die *trpE16*-Mutante im LB-Medium eine leichte Verschiebung von *ai*-verzweigten zu ungeradzahligen *iso*-verzweigten Fettsäuren auf. Im Naylor-Medium erfolgte die Verschiebung von beiden *iso*-verzweigten Fettsäuren zu *ai*-verzweigten und unverzweigten sowie zu kürzeren Fettsäuren. Auch die *trpE16 ope*-Mutante zeigte im LB-Medium nur die leichte Verschiebung von *ai*-verzweigten zu ungeradzahligen *iso*-verzweigten Fettsäuren. Im Naylor-Medium konnte eine Verschiebung von geradzahligen *iso*-verzweigten und *ai*-verzweigten zu unverzweigten Fettsäuren beobachtet werden (Abbildung 55B und 55C).

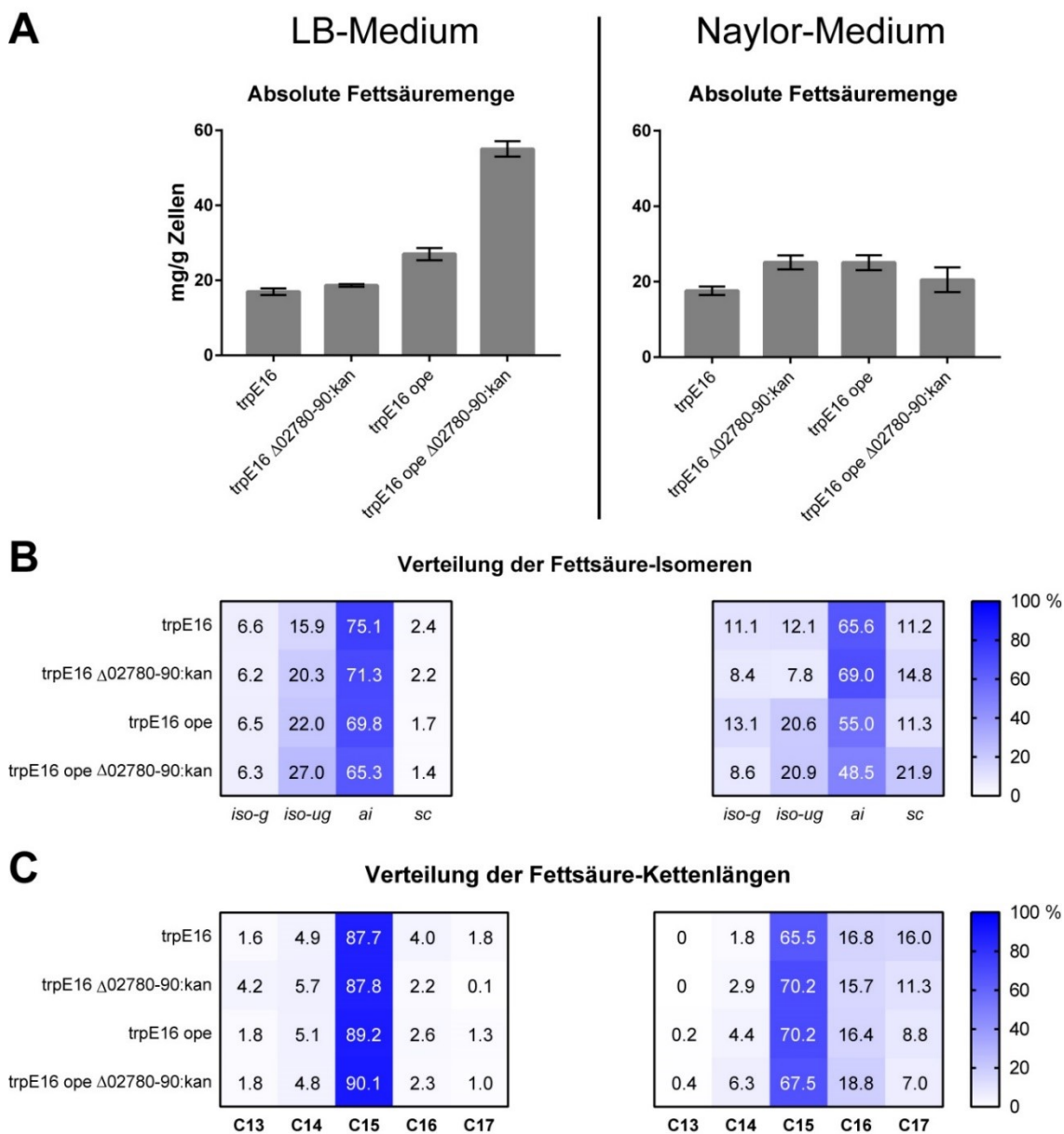
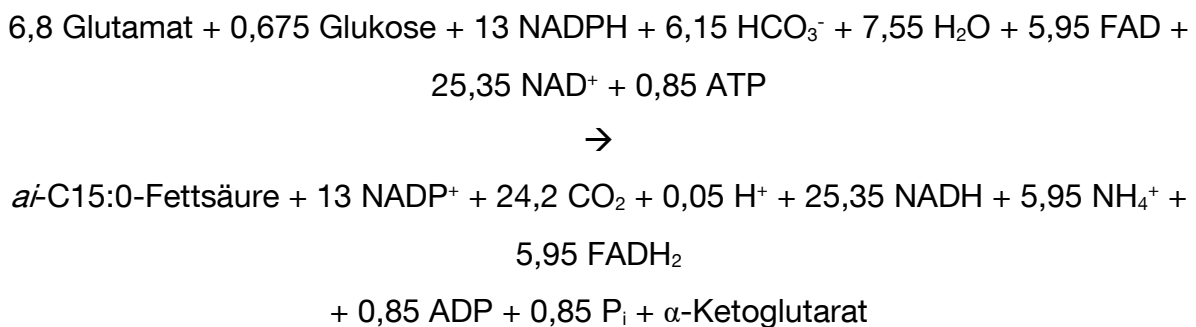


Abbildung 55: Auswirkung der Deletion von *Mlut_02780-90* auf die Fettsäurebildung und -zusammensetzung. Die Fettsäureproduktion in absoluten Mengen (A), Isomeren- (B) und Kettenlängen-Verteilung (C) der Deletions-Mutante von *Mlut_02780-90* im genomischen Hintergrund von *trpE16* und *trpE16 ope* im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsstamm in der stationären Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium ist gezeigt. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Die Standardabweichung der Prozentwerte beträgt maximal 5 %.

5.2.3.7. Die Reaktion der NADH-Kinase

In Naylor-Medium wächst *M. luteus* auf L-Glutamat und Glukose als Kohlenstoffquelle. Die Supplementierung einer *M. luteus* trpE16-Kultur mit vollständig ¹³C-markierter Glukose anstelle von natürlicher Glukose ergab, dass die von *M. luteus* synthetisierte gesättigte *a*-verzweigte C15-Fettsäure zu 85 % aus Glutamat besteht (Daten nicht gezeigt). Die anteilige Summenformel für die Synthese einer gesättigten *a*-verzweigten C15-Fettsäure aus L-Glutamat und Glukose lautet (eigene Berechnung):



Es kommt zu einem hohen Umsatz von Redox-Äquivalenten, NADPH und NAD⁺ werden in großen Mengen verbraucht, NADP⁺ und NADH in großen Mengen produziert. Durch Verfolgung des Kohlenstoffflusses in *Yarrowia lipolytica* über ¹³C-Isotopenmarkierung konnte gezeigt werden, dass die Fettsäure- bzw. Lipidsynthese durch die Verfügbarkeit von NADPH wesentlich limitiert ist [42]. Eine Strategie zur Aufhebung dieser Limitierung kann die Überexpression von Enzymen sein, die Überschüsse von NADH in NADPH umwandeln. Dazu zählen Transhydrogenasen oder NADH-Kinasen.

Die Homologie-Suche mit Aminosäure-Sequenzen von bekannten Enzymen aus Hefen und Bakterien lieferte für eine NADH-Kinase als einzigen signifikanten Treffer im Genom von *M. luteus* das Gen Mlut_14220 (RPKM-Wert LB = 55 / Naylor = 155). Der laut eigenen RNA-Sequenzierungsdaten starke Promotor von Mlut_16550 (RPKM-Wert LB = 2563 / Naylor = 1219) (siehe auch Anhang 9.3. Tabelle 42) wurde zusammen mit einer co-linearen Kanamycin-Kassette im genomischen Hintergrund von trpE16 ope zwischen den nativen Promotor und das Gen eingefügt.

Die Olefinproduktion der Mutante wurde in der stationären Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 ope untersucht.

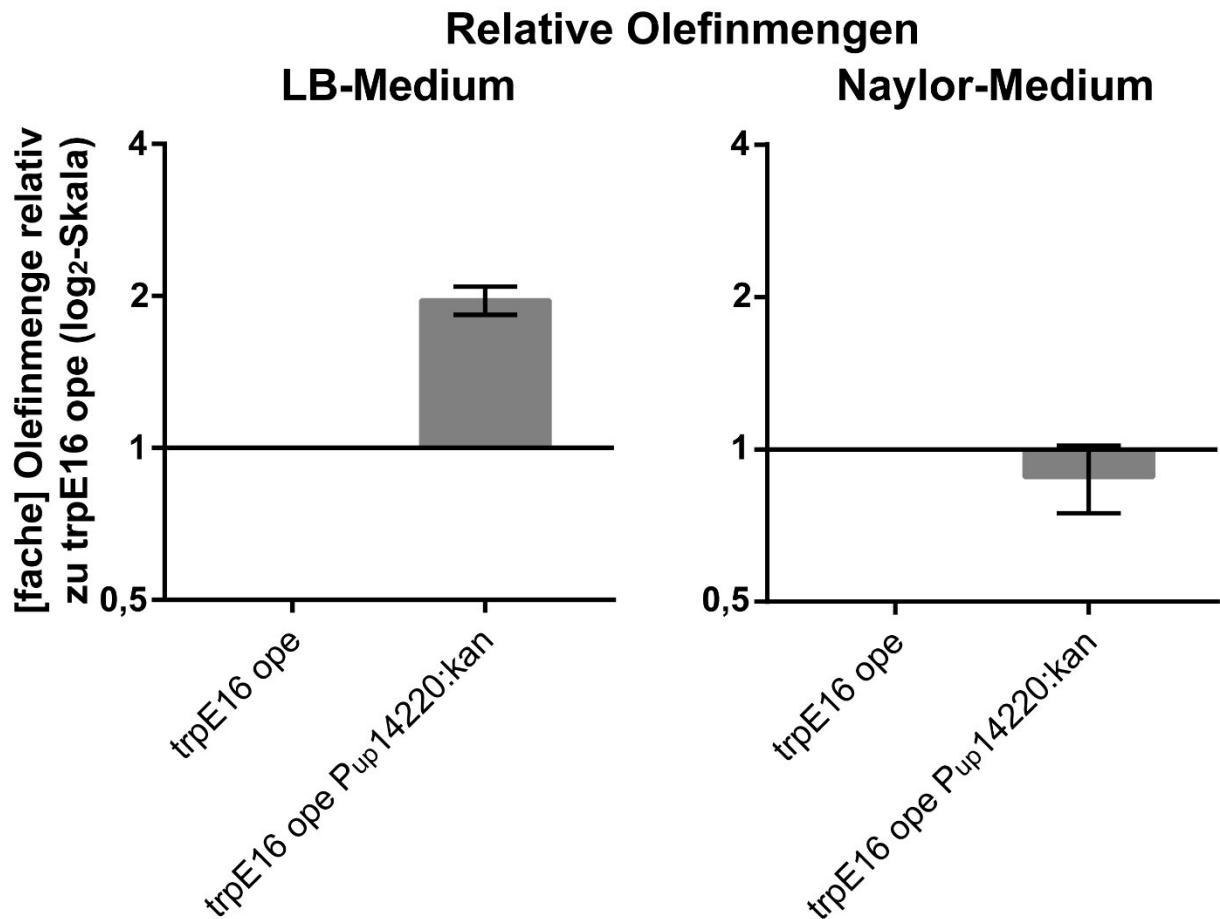


Abbildung 56: Relative Olefinproduktion der Mutante *trpE16 ope P_{up14220:kan}* im Vergleich zum Ausgangsstamm *trpE16 ope* in der stationären Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium. Es sind Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Abkürzungen: LB, Probe aus LB-Kultur; Nay, Probe aus Naylor-Kultur.

Im LB-Medium führte die *Mlut_14220*-Mutation zu einer Steigerung der Olefinproduktion um 100 %, im Naylor-Medium dagegen war die Produktion stabil (Abbildung 56).

5.2.3.8. Die Kombination identifizierter Optimierungsmöglichkeiten der Olefinsynthese

Im Laufe des Ergebnisabschnitts „5.2.3. Gezielte Optimierung der Olefinsynthese durch Manipulation der Substratstoffwechsel“ konnten mehrere für Enzyme von zentralen Reaktionen des Abbaus verzweigter Aminosäuren und des Fettsäurestoffwechsels codierende Gene identifiziert bzw. bestätigt werden. Die gesteigerte bzw. stillgelegte Transkription der Gene wirkte sich positiv oder negativ auf die erhaltenen Olefinmengen aus. Die für die Olefinproduktion förderlichen Mutationen wurden daraufhin ohne Verwendung eines Resistenz-Markers im *M. luteus* trpE16 ope-Stamm kombiniert (Tabelle 40).

Tabelle 40: Stamm-Abkürzungen für die Kombination von Mutationen. Aufgelistet sind die Abkürzung, die dahinterstehenden Mutationsarten, betroffene Gene und die zugeordneten Stoffwechselreaktionen. Bei Promotorinsertions-Mutationen ist in eckigen Klammern der Ursprung des stärkeren Promotors plus in runden Klammern der RPKM-Wert des Gens mit nativem Promotor und des Ursprungsgens des neuen Promotors angegeben (siehe auch Anhang 9.3. Tabelle 42).

Stamm-Abkürzung	Deletion	Stärkerer Promotor für (RPKM LB/Nay) [Promotor von (RPKM LB/Nay)]	Stoffwechselreaktion
ΔfadE5	Mlut_02900, Mlut_11700, Mlut_19560, Mlut_03070, Mlut_23170		FadE
AFB123	Mlut_19230	Mlut_19260 (6/155) [Mlut_04090 (4820/1362)], Mlut_05890 (78/86) [Mlut_16550 (2563/1219)]	AccABCD
AFB1234	Mlut_19230	Mlut_19260, Mlut_05890, Mlut_09320 (73/66) [Mlut_19160 (3928/801)]	AccABCD, FabD/FabH
AFB12345	Mlut_19230	Mlut_19260, Mlut_05890, Mlut_09320, Mlut_06800 (103/51) [Mlut_03770 (2919/912)]	AccABCD, FabD/FabH, BCKD

Die Stämme mit mehreren kombinierten Mutationen sowie mit einzelnen Mutationen wurden im Vergleich zu den Ausgangsstämmen trpE16 bzw. trpE16 ope in der stationären Phase nach Wachstum in LB-, Naylor-Medium und Naylor-Medium mit zusätzlicher Supplementierung von 2 mM 2-Methylbutansäure auf ihre Olefinproduktion hin untersucht.

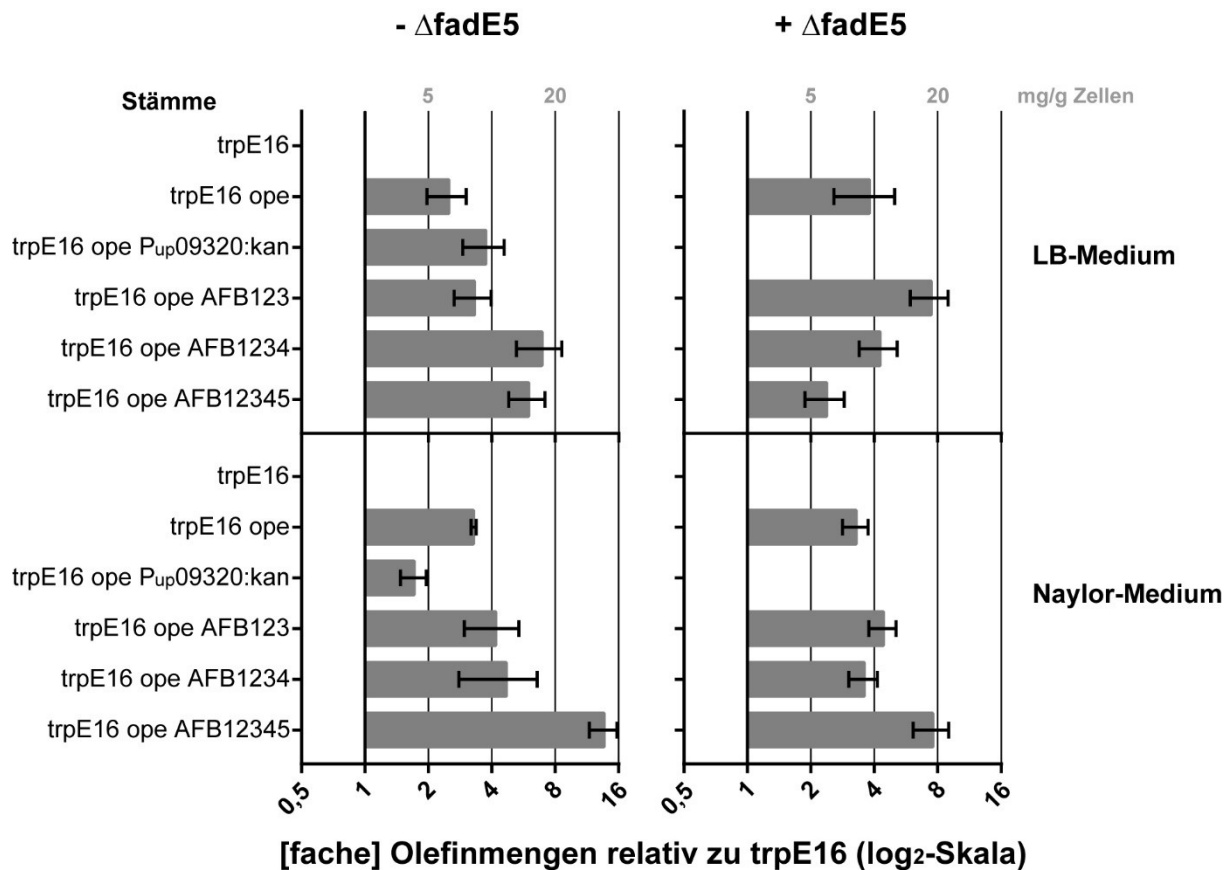


Abbildung 57: Relative Olefinproduktion von Stämmen mit einzelnen oder mehreren kombinierten Mutationen des Abbaus verzweigter Aminosäuren oder des Fettsäurestoffwechsels im Vergleich zum Ausgangsstamm *M. luteus* trpE16 in der stationären Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium. Es sind die Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Auf der oberen x-Achse sind zur Orientierung produzierte absolute Olefinmengen dargestellt. Zur Erklärung der Abkürzungen AFB123, AFB1234, AFB12345 und Δ fadE5 siehe Tabelle 40 und Text.

Im LB-Medium führte die gesteigerte Transkription des *oleABCD*-Genclusters (trpE16 ope) zur 2,5fachen Steigerung der Olefinproduktion. Eine weitere Steigerung der Olefinproduktion auf das Siebenfache wurde durch die gleichzeitige gesteigerte Transkription von *accABCD* und *fabH* (trpE16 ope AFB1234) erreicht. Die zusätzliche Ausschaltung aller die FadE-Reaktion katalysierenden Enzyme (Δ fadE5) wirkte sich bei gesteigerter Transkription des *oleABCD*- und des *accABCD*-Genclusters (trpE16 ope AFB123 Δ fadE5) mit Steigerung der Mehrproduktion vom 3,5- auf das 7,5-Fache noch positiv aus. Mit der gesteigerten Transkription von *accABCD* und zusätzlich *fabH* (trpE16 ope AFB1234 Δ fadE5) wurde die Olefinproduktion durch die vermeintliche Unterdrückung der β -Oxidation gehemmt (Abbildung 57 oben).

Im Naylor-Medium führte die gesteigerte Transkription des *oleABCD*-Genclusters (*trpE16 ope*) zu einer 3,3fachen Steigerung der Olefinproduktion. Eine weitere deutliche Zunahme konnte bei der zusätzlichen gesteigerten Transkription von *accABCD*, *fabH* und des Gens der BCKA-Dehydrogenase (*trpE16 ope AFB12345*) auf das 13,6-Fache beobachtet werden. Die zusätzliche einzelne Promotorinsertion vor *fabH* zusätzlich zu *trpE16 ope* wirkte sich im Naylor-Medium negativ auf die Olefinproduktion aus (*trpE16 ope P_{up}09320:kan*). Die zusätzliche vermeintliche Unterdrückung der β -Oxidation (Δ *fadE5*) wirkte sich bei gleichzeitig gesteigerter Transkription von *oleABCD*, *accABCD* und *fabH* (*trpE16 ope AFB1234* Δ *fadE5*) negativ auf die Olefinproduktion aus (Abbildung 57 unten).

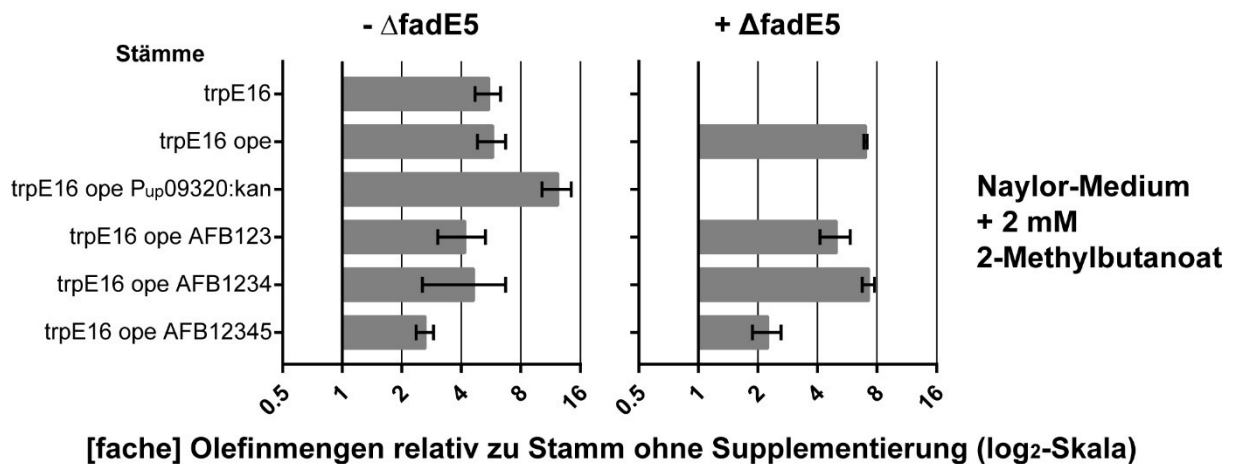


Abbildung 58: Relative Olefinproduktion von Stämmen mit einzelnen oder mehreren kombinierten Mutationen des Abbaus verzweigter Aminosäuren oder des Fettsäurestoffwechsels im Vergleich zum gleichen Stamm im Naylor-Medium ohne Supplementierung in der stationären Phase. Es sind die Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten aufgetragen.

Die zusätzliche Supplementierung des Naylor-Mediums mit 2 mM 2-Methylbutansäure führte in *trpE16* zu einer 5fachen Steigerung seiner Olefinproduktion. Allerdings kann der Stamm *trpE16 ope P_{up}09320:kan* die gleiche Supplementierung besser nutzen, er steigerte seine Olefinproduktion um das 12,3-Fache. Der Stamm mit gleichzeitiger gesteigerter Transkription von *oleABCD*, *accABCD*, *fabH* und des Gens der BCKA-Dehydrogenase kann die Supplementierung dagegen deutlich schlechter nutzen und kam nur auf das 2,6-Fache der Olefinproduktion ohne Supplementierung im Naylor-Medium. Die zusätzliche Ausschaltung aller die FadE-Reaktion katalysierenden Enzyme (Δ *fadE5*) wirkte sich in allen Fällen förderlich auf die Nutzung der Supplementierung für die Olefinproduktion aus (Abbildung 58).

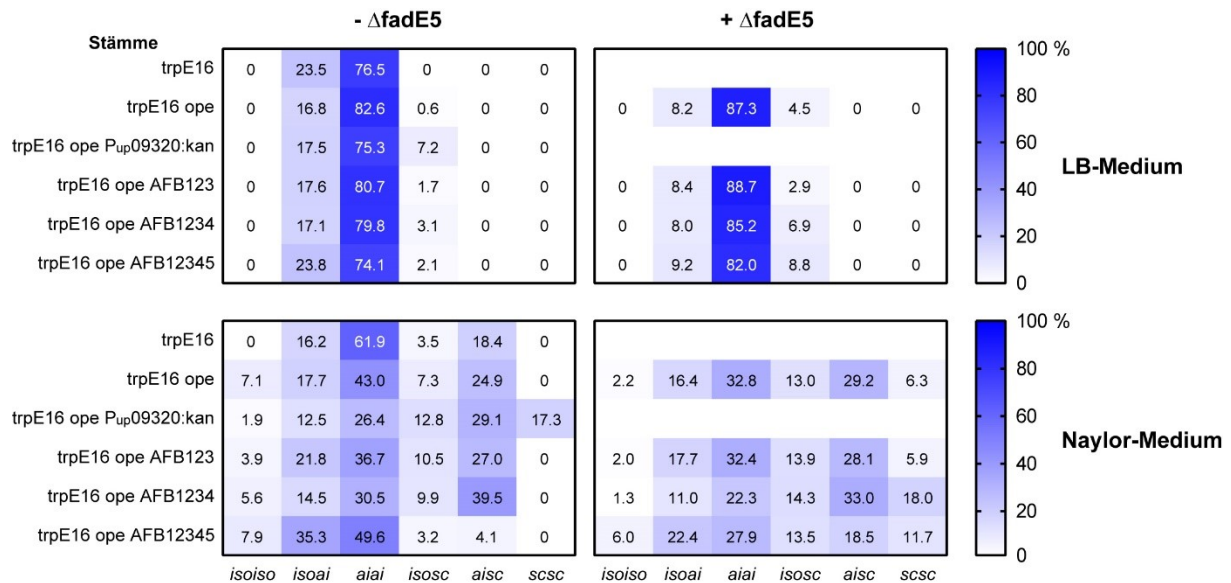


Abbildung 59: Olefin-Isomeren-Verteilung von Stämmen mit einzelnen oder mehreren kombinierten Mutationen des Abbaus verzweigter Aminosäuren oder Fettsäurestoffwechsels in stationärer Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Die Standardabweichung der Prozentwerte beträgt maximal 8 %.

Im LB-Medium führte die zusätzliche gesteigerte Transkription der Gene des BCKD-Komplexes (*trpE16 ope AFB12345*) zu einer Verschiebung von *aiai*- zu *isoai*-Olefin-Isomeren. Die zusätzliche vermeintliche Ausschaltung der β -Oxidation (ΔfadE5) führte in allen Fällen zu einer starken Verschiebung von *isoai*- zu *aiai*- und *isosc*-Olefin-Isomeren (Abbildung 59 oben). (Der Phänotyp von *trpE16 ope* und *trpE16 ope P_{up}09320:kan* wurde bereits in den jeweiligen Ergebnisabschnitten beschrieben)

Im Naylor-Medium wurde die Verschiebung von verzweigten zu unverzweigten Olefin-Isomeren der gesteigerten Transkription von *fabH* (*trpE16 ope P_{up}09320:kan*) auch in Kombination mit der erhöhten Transkription von *accABCD* (*trpE16 ope AFB1234*) noch beobachtet. Jedoch führte die zusätzliche gesteigerte Transkription der Gene des BCKD-Komplexes zu Überkompensierung und zu einem deutlichen höheren Anteil von verzweigten Olefinen im Vergleich zu *trpE16 ope*. Die zusätzliche vermeintliche Ausschaltung der β -Oxidation (ΔfadE5) führte in allen Fällen zu einer starken Verschiebung von verzweigten zu unverzweigten Olefin-Isomeren (Abbildung 59 unten). (Der Phänotyp von *trpE16 ope* und *trpE16 ope P_{up}09320:kan* wurde bereits in den jeweiligen Ergebnisabschnitten beschrieben)

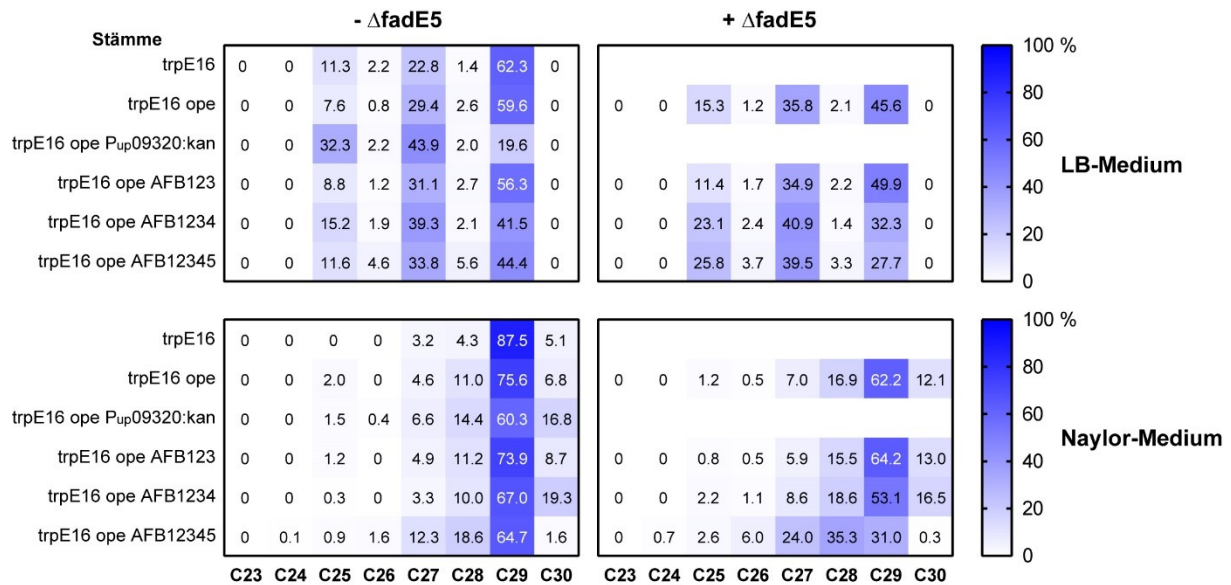


Abbildung 60: Olefin-Kettenlängen-Verteilung von Stämmen mit einzelnen oder mehreren kombinierten Mutationen des Abbaus verzweigter Aminosäuren oder Fettsäurestoffwechsels in stationärer Phase nach Wachstum in LB- und Naylor-Medium. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Die Standardabweichung der Prozentwerte beträgt maximal 6 %.

Im LB-Medium ergab die zusätzliche gesteigerte Transkription der *accABCD*-Gencluster (trpE16 ope AFB1234) die Kompensation der Verschiebung zu kürzeren Kettenlängen durch die Steigerung der Transkription des *fabH*-Gens (trpE16 ope P_{up}09320:kan). Die vermeintliche Ausschaltung der β -Oxidation (ΔfadE5) führte in allen Fällen zur Verschiebung zu kürzeren Kettenlängen (Abbildung 60 oben). (Der Phänotyp von trpE16 ope und trpE16 ope P_{up}09320:kan wurde bereits in den jeweiligen Ergebnisabschnitten beschrieben)

Im Naylor-Medium ergab die zusätzliche Steigerung der Transkription des Genclusters der BCKA-Dehydrogenase (trpE16 ope AFB12345) eine Verschiebung hin zu kürzeren Kettenlängen. Die vermeintliche Ausschaltung der β -Oxidation (ΔfadE5) führte in allen Fällen zur Verschiebung hin zu kürzeren Kettenlängen, wobei in Einzelfällen auch die Zunahme der von unverzweigten Isomeren dominierten C30-Kettenlänge beobachtet wurde (Abbildung 60 unten). (Der Phänotyp von trpE16 ope und trpE16 ope P_{up}09320:kan wurde bereits in den jeweiligen Ergebnisabschnitten beschrieben)

5.3. Die Substratspezifität der Olefinsynthese in *M. luteus*

5.3.1. Supplementierung mit Carbonsäuren verschiedener Kettenlänge

Um die Substratspezifität der Olefinsynthese bzw. von OleA aus *M. luteus* zu untersuchen wurde zunächst *trpE16 ope* in LB-Medium ohne und mit Supplementierung von 4 mM gesättigten unverzweigten Carbonsäuren mit Kettenlängen von C6-C18 kultiviert. In der stationären Phase wurden Proben für die Analyse der Olefin- und Fettsäureproduktion genommen.

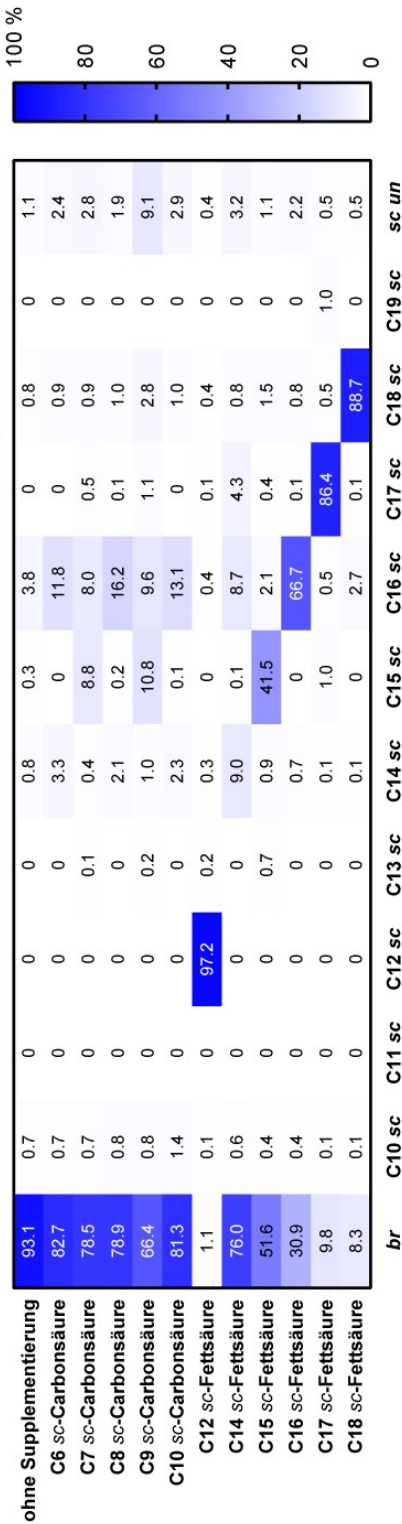
Auf Fettsäure-Ebene wurde analysiert welche zellulären Fettsäuren aus den gewaschenen Zellen extrahiert werden können und der Olefinsynthese zur Verfügung standen. Es wurde nach Supplementation von Carbonsäuren ausgewertet, ob die supplementierte Kettenlänge, verkürzte (β -Oxidation) oder verlängerte (Fettsäure-Elongation) unverzweigte Carbonsäuren wiedergefunden wurden (Abbildung 61A). Für die Supplementierung der kürzeren Carbonsäuren C6-C10 ist festzuhalten, dass die ursprüngliche Kettenlänge nicht extrahiert werden konnte, sondern dass nur verlängerte unverzweigte C15- und C16-Kettenlängen für die ungeradzahligen bzw. C16-Kettenlängen für die geradzahligen Supplementationen vorlagen. Nach Supplementation von ungeradzahligen C7- und C9-Carbonsäuren bzw. geradzahligen C6-, C8- und C10-Carbonsäuren wurden keine C11- oder C13- bzw. C10- oder C12-Carbonsäuren extrahiert. Außerdem zeigte sich in diesen Fällen, dass die verzweigten Fettsäuren weiterhin die Mehrheit der verfügbaren Substrate für die Olefinsynthese ausmachten. Ab einer supplementierten Kettenlänge von zwölf C-Atomen mit Ausnahme der C14-Kettenlänge wurde genau die supplementierte Kettenlänge aus den gewaschenen Zellen wieder extrahiert. Die supplementierte C14-Fettsäure lies aus den Zellen neben C14- auch C16-Kettenlängen extrahierbar werden.

Auf Olefin-Ebene wurde analysiert wie die Supplementierung die produzierten Olefinmengen beeinflusst (Abbildung 61B) sowie ob und in welche Olefin-Kettenlängen welche zur Verfügung stehenden Fettsäure-Kettenlängen eingebaut wurden (Abbildung 61C). Generell hemmten alle Supplementierungen von gesättigten, unverzweigten Carbonsäuren die Olefinsynthese insgesamt deutlich. Dies war besonders stark für die Supplementierung von C9-C12-Kettenlängen ausgeprägt.

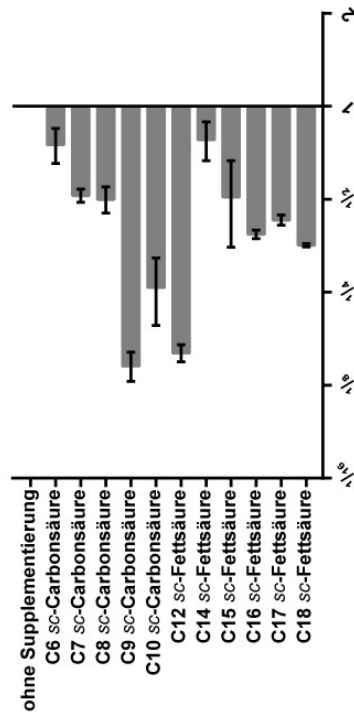
Dagegen zeigten die supplementierten Kettenlängen C6 und C14 eine vergleichsweise geringe Hemmung der Olefinsynthese.

Die durch Supplementierung von ungeradzahligen kurzen C7- und C9-Kettenlängen gebildeten C15- und C16-Fettsäuren wurden in C28-C30-Olefine, vor allem aber C29 Olefine, eingebaut. Die durch Supplementierung von geradzahligen kurzen C6-, C8- und C10-Kettenlängen gebildeten C16-Fettsäuren wurden auch in C28-C30-Olefine, vor allem in C28- und C30-Olefine, eingebaut. Die supplementierten C12- und C18-Fettsäuren, die als identische Kettenlänge auch wieder aus den Zellen extrahiert werden konnten, wurden gar nicht bzw. kaum für die Olefinsynthese verwendet. Die durch Supplementation von C14-Fettsäuren vorliegenden zellulären C14- und C16-Fettsäuren wurden in C27-C30-Olefine, aber vor allem C28-Olefine, eingebaut. Die durch Supplementation von C15-Fettsäuren vorliegenden zellulären C15-Fettsäuren wurden fast ausschließlich in C29-Olefine eingebaut. Die durch Supplementation von C16-Fettsäuren vorliegenden zellulären C16-Fettsäuren wurden in C28-C30-Olefine, aber vor allem C30-Olefine, eingebaut. Die durch Supplementation von C17-Fettsäuren vorliegenden zellulären C17-Fettsäuren wurden in C28-C30-Olefine, aber vor allem und wesentlich stärker als bei den supplementierten C15-Fettsäuren in C29-Olefine, eingebaut. Trotz zur Verfügung stehender zellulärer C16- und C17-Fettsäuren wurden keine Olefine mit größerer Kettenlänge als C30 beobachtet.

A Verteilung unverzweigter Fettsäure-Kettenlängen



B Relative Olefinmengen



C Verteilung unverzweigter Olefin-Kettenlängen

zu Stamm ohne Supplementierung (log2-Skala)

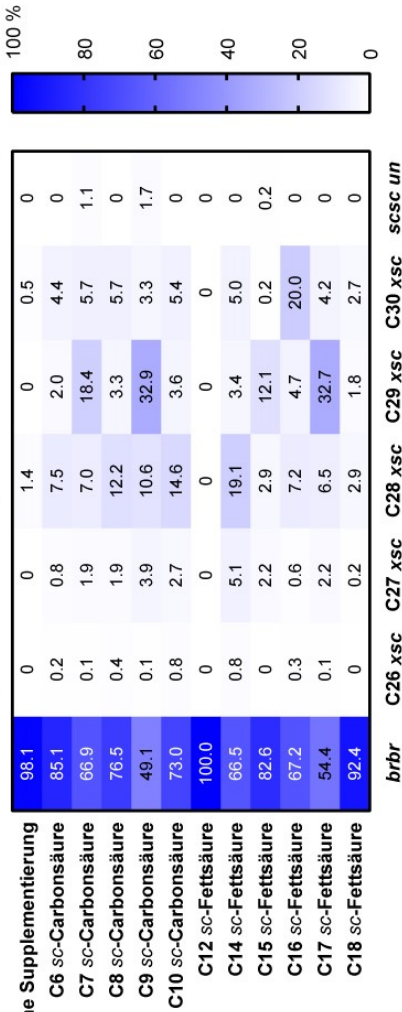


Abbildung 61: Verteilung gebildeter Fettsäure-Spezies (A), Olefin-Spezies (C) und produzierte relative Olefinmengen (B) von *trpE16* ope in stationärer Phase nach Wachstum in LB-Medium mit Supplementierung von 4 mM gesättigten unverzweigten Fettsäuren verschiedener Kettenlänge im Vergleich zu ohne Supplementierung. Die Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten sind gezeigt. Die Standardabweichung der Prozentwerte beträgt maximal 9 % bei den Fettsäuren und maximal 4 % bei den Olefinen. Abkürzungen: *br*, verzweigte Fettsäuren; *sc*, unverzweigte Fettsäuren; *brbr*, komplett verzweigte Fettsäuren; *xsc*, zumindest auf einer Seite unverzweigte Olefine; *scsc un*, komplett unverzweigte und zusätzlich ungesättigte Olefine.

5.3.2. Supplementierung mit ungesättigten Carbonsäuren

M. luteus trpE16 ope wurde in LB-Medium ohne und mit Supplementierung von 4 mM unverzweigter Non-8-ensäure (C9:1 (Δ^8)) und cis-Tetradec-9-ensäure (C14:1 (cis- Δ^9)) sowie im Vergleich mit Supplementierung von 4 mM unverzweigter Nonansäure (C9:0) und Tetradecansäure (C14:0) kultiviert. In der stationären Phase wurden Proben für die Analyse der Fettsäure- und Olefinproduktion genommen.

Auf Fettsäure-Ebene wurde analysiert welche zellulären Carbonsäuren aus den gewaschenen Zellen extrahiert werden können und der Olefinsynthese zur Verfügung standen. Es wurde ausgewertet, ob die supplementierte Kettenlänge, verkürzte (β -Oxidation) oder verlängerte (Fettsäure-Elongation) unverzweigte ungesättigte Carbonsäuren wiedergefunden werden (Abbildung 62A). Nach Supplementierung ungesättigter C9-Carbonsäuren wurden aus den gewaschenen Zellen wie bei der Supplementierung der entsprechenden gesättigten Carbonsäure nicht die ursprüngliche Kettenlänge, sondern verlängerte ungesättigte C15-Fettsäuren extrahiert. Zusätzlich wurden aber auch Anteile von ungesättigten C17-Fettsäuren gefunden. Die Supplementierung führte außerdem wie die Supplementierung der gesättigten Carbonsäure zu hohen Anteilen von gesättigten C16-Fettsäuren. Die Supplementierung der ungesättigten cis-C14-Fettsäure führte nicht wie die entsprechende gesättigte Fettsäure zu Anteilen von der supplementierten Kettenlänge und verlängerten C16-Fettsäuren, sondern ausschließlich zur Extraktion der supplementierten Kettenlänge. Zusätzlich war die Synthese von gesättigten C14- und C16-Fettsäuren induziert.

Auf Olefin-Ebene wurde analysiert, wie die Supplementierung die produzierten Olefinmengen beeinflusst (Abbildung 62B) sowie ob und in welche Olefine zur Verfügung stehende ungesättigte Carbonsäuren eingebaut werden (Abbildung 62C). Die Supplementierung der ungesättigten C9-Carbonsäure beeinträchtigte die Olefinsynthese im Vergleich zur entsprechenden gesättigten Carbonsäure nicht zusätzlich negativ. Wie bei der gesättigten Carbonsäure wurden die gebildeten ungesättigten C15/C17-Fettsäuren neben C28- vor allem in C29-Olefinen verarbeitet und erreichten dort gleich große Anteile wie die gesättigten unverzweigten Olefine bei Supplementierung der gesättigten unverzweigten C9-Carbonsäuren.

Durch die Supplementierung der ungesättigten unverzweigten cis-C14-Fettsäure dagegen wurde die Olefinsynthese im Vergleich zur entsprechenden gesättigten Fettsäure deutlich unterdrückt. Außerdem wurden die in der Zelle vorliegenden ungesättigten unverzweigten cis-C14-Fettsäuren im Gegensatz zu den vorliegenden unverzweigten gesättigten C14-Fettsäuren bei Supplementation der entsprechenden gesättigten Fettsäure nicht in Olefine eingebaut. Die Zellen bildeten ausschließlich an beiden Enden verzweigte Olefine.

5.3.3. Supplementierung mit kurzkettigen, unterschiedlich verzweigten Carbonsäuren

Die Mutante *trpE16* Δ 06800-20:hyg, wie bereits beschrieben, ist ohne die Supplementierung entsprechender kurzkettiger verzweigter Carbonsäuren (2-Methylbutansäure, 3-Methylbutansäure und Isobutansäure) nicht zur ausreichenden Synthese von verzweigten Fettsäuren (ungeradzahlige *ai*-, ungeradzahlige *iso*- und geradzahlige *iso*-Fettsäuren) bzw. Acyl-CoAs als Substrate für die Olefinsynthese in der Lage. Es findet keine Olefinsynthese statt. Es wurde untersucht, ob *M. luteus* in dieser Situation auch kurzkettige Substrate mit unnatürlichen Verzweigungen in langkettige Fettsäuren und schließlich in Olefine einbaut.

Die BCKA-Dehydrogenase-Mutante wurde zunächst im Naylor-Medium mit 4 mM 3-Methylpentansäure, 3,3-Dimethylbutansäure und 2-Ethylbutansäure supplementiert (Strukturformeln der supplementierten Carbonsäuren in Abbildung 63).

In Abbildung 64 ist in Gas-Chromatogramm und Massenspektrum gezeigt, dass *M. luteus* ohne die natürlichen Substrate aus dem Aminosäure-Abbau die supplementierte 3-Methylpentansäure in der Fettsäure-Elongation zu geradzahligen *ai*-verzweigten C14- und C16-Fettsäuren in großen Mengen umgesetzt hat. Die extrahierte Fettsäuremenge stieg um das 3-4-Fache im Vergleich zum Medium ohne Supplementierung. Auch die 3,3-Dimethylbutansäure und die 2-Ethylbutansäure wurden in etwas geringerem Maße zu langkettigen geradzahligen C14- und C16- bzw. C16- und C18-Fettsäuren mit Dimethyl- bzw. Ethyl-Verzweigung umgesetzt. Die extrahierten Fettsäuremengen stiegen im Vergleich zum Medium ohne Supplementierung um das 2-3-Fache. Diese Fettsäuren werden natürlicherweise nicht produziert.

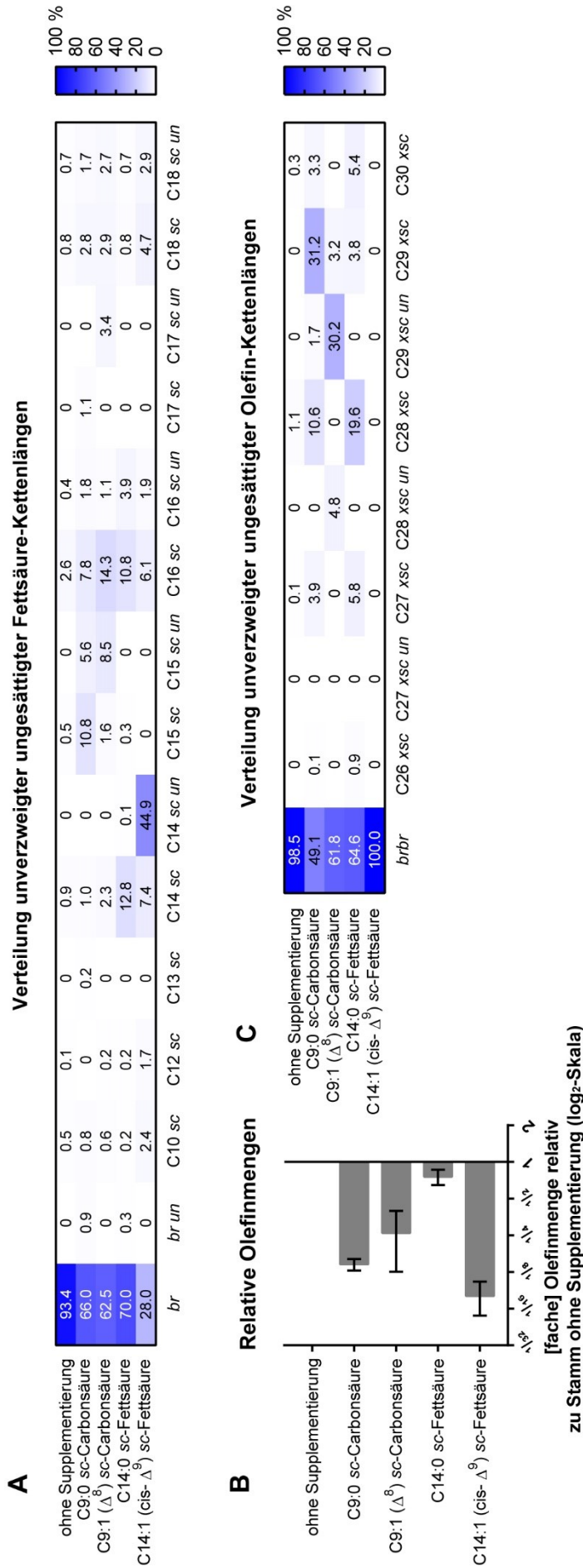


Abbildung 62: Verteilung gebildeter Fettsäure-Spezies (A), Olefin-Spezies (C) und produzierte relative Olefinmengen (B) von *trpE16 ope* in stationärer Phase nach Wachstum in LB-Medium mit Supplementierung von 4 mM gesättigten und ungesättigten unverzweigten Fettsäuren im Vergleich zu ohne Supplementierung. Die Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten sind gezeigt. Die Standardabweichung der Prozentwerte beträgt maximal 5 % bei den Fettsäuren und maximal 10 % bei den Olefinen. Abkürzungen: *br*, verzweigte Fettsäuren; *br un*, verzweigte ungesättigte Fettsäuren; *sc un*, unverzweigte ungesättigte Fettsäuren; *sc*, unverzweigte gesättigte Fettsäuren; *brbr*, komplett verzweigte Olefine; *xsc*, zumindest auf einer Seite unverzweigte und zusätzlich ungesättigte Olefine.

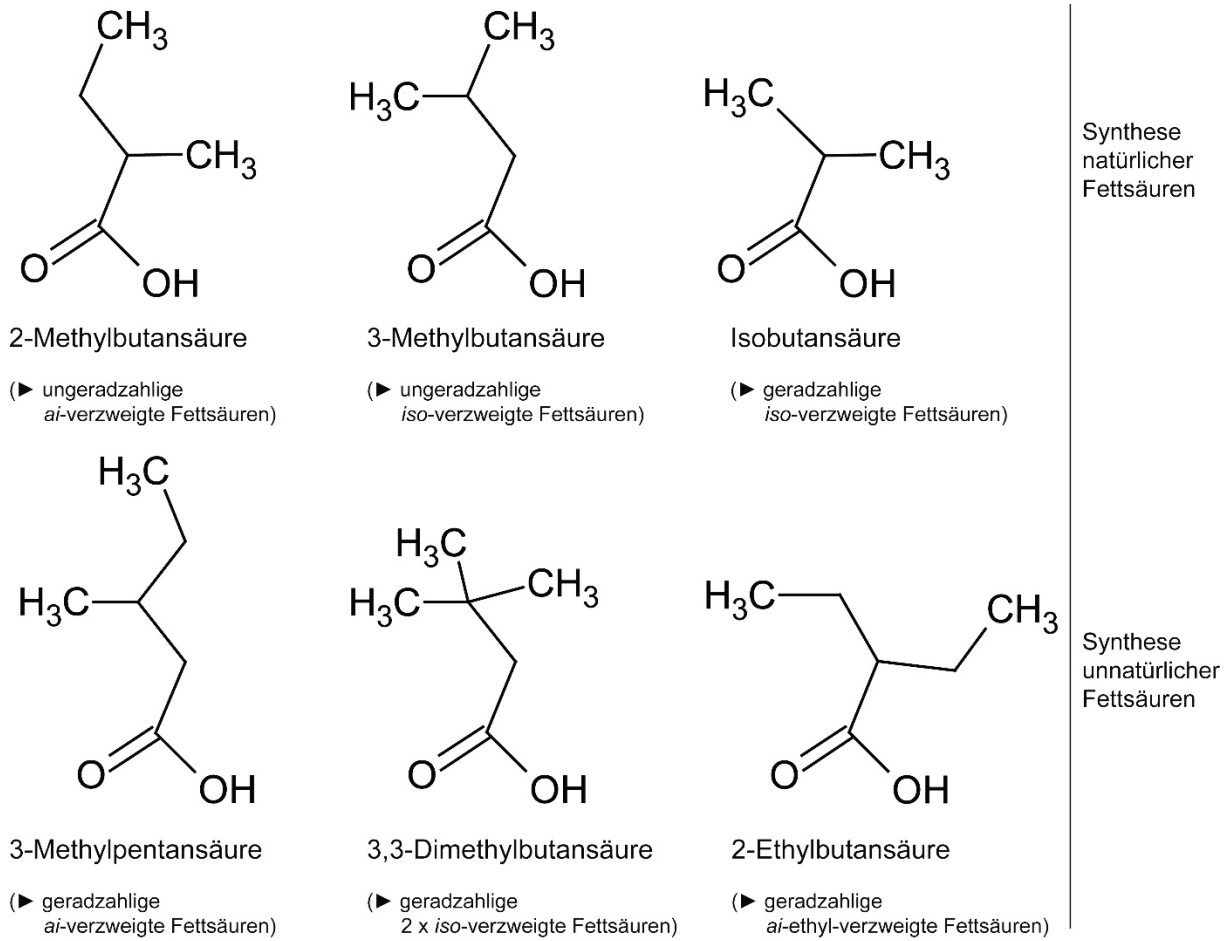


Abbildung 63: Strukturformeln der supplementierten Carbonsäuren und die daraus resultierenden Fettsäureprodukte.

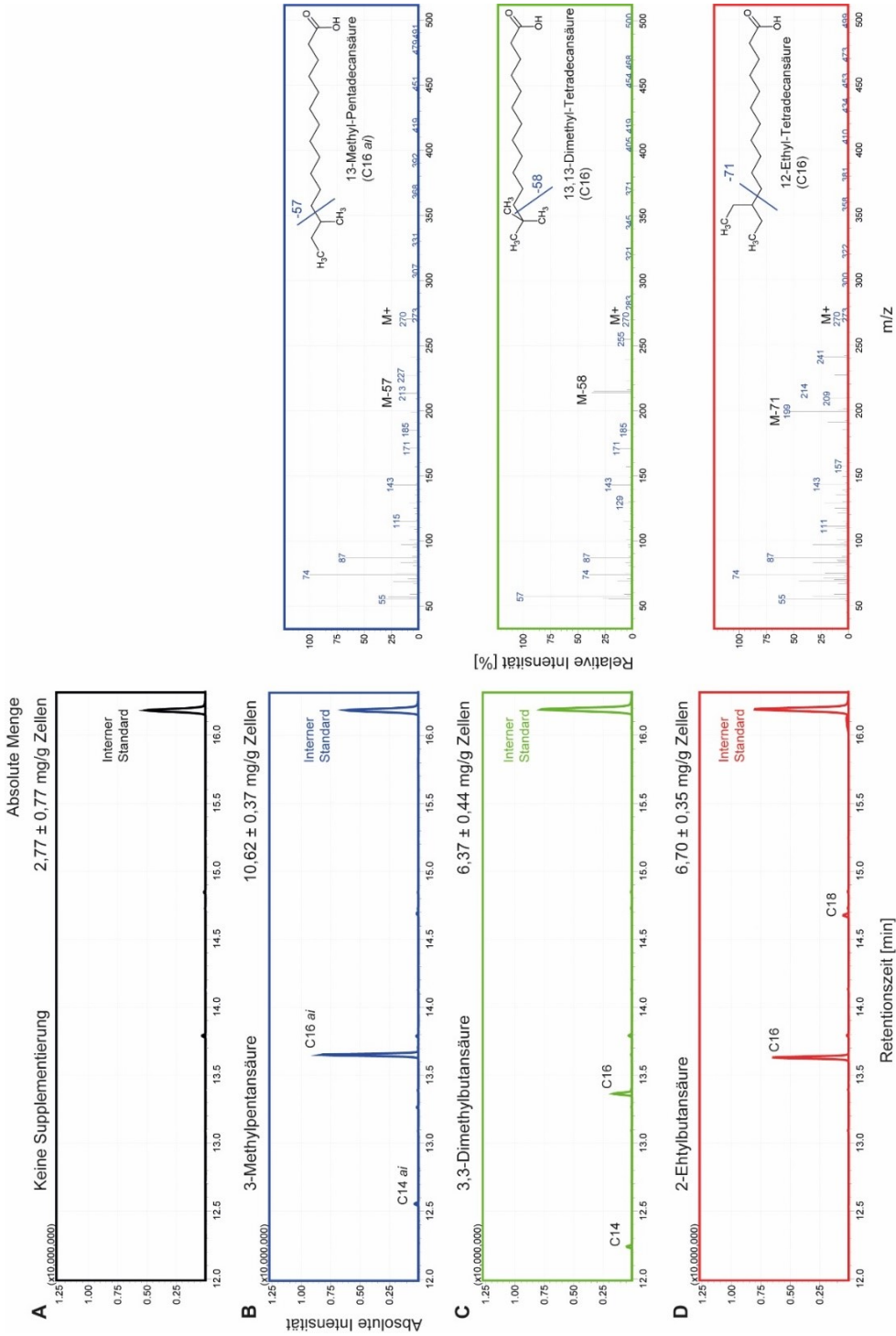


Abbildung 64: Fettsäure-Produktion der BCKA-Dehydrogenase-Deletions-Mutante trpE16 Δ 06800-20:hyg in der stationären Phase nach Wachstum in Naylor-Medium ohne (A) und mit Supplementierung von 4 mM 3-Methylpentansäure (B), 3,3-Dimethylbutansäure (C) und 2-Ethylbutansäure (D) als repräsentatives Gas-Chromatogramm (links). Die produzierten absoluten Fettsäuremengen sind in der rechten oberen Ecke des Gas-Chromatogramms angegeben. Die Massenspektren zuzüglich Strukturformel der am stärksten produzierten Fettsäuren in Folge der jeweiligen Supplementierung sind rechts zu den Gas-Chromatogrammen angefügt. In der Strukturformel ist das Spaltungsmuster zur Bildung des analytischen Ions, das auch im Massenspektrum angezeigt ist, angegeben. Die Molekül-Ionen (M^+) sind ebenfalls beschriftet.

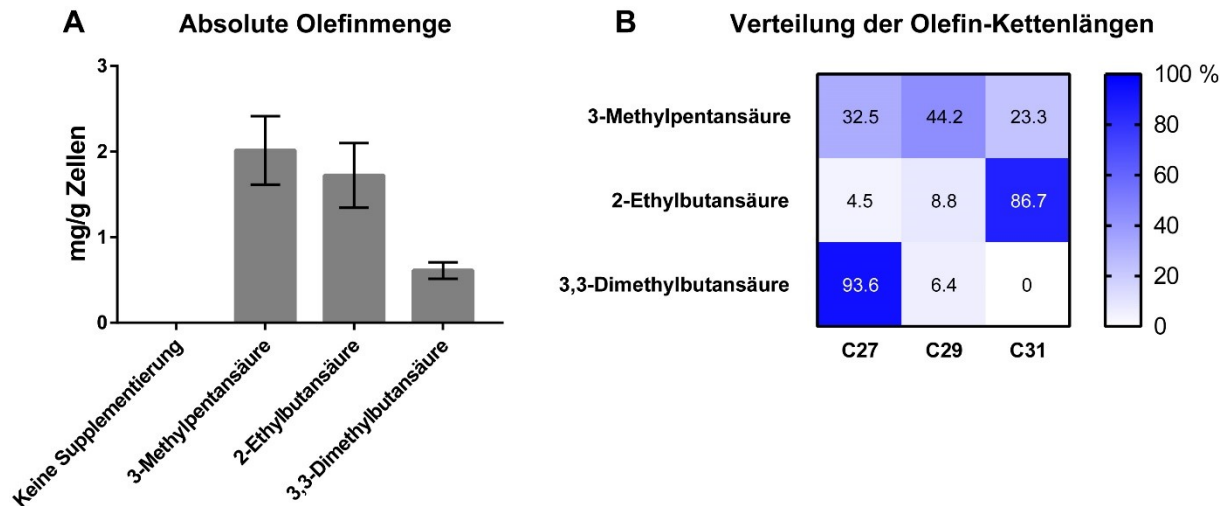


Abbildung 65: Olefinproduktion der BCKA-Dehydrogenase-Deletions-Mutante *trpE16* Δ 06800-20:hyg in stationärer Phase nach Wachstum in Naylor-Medium ohne und mit Supplementierung von 4 mM 3-Methylpentansäure, 3,3-Dimethylbutansäure und 2-Ethylbutansäure. In (A) ist die produzierte absolute Olefinmenge bei der jeweiligen Supplementierung angegeben. In (B) ist die Verteilung der erzeugten Olefin-Kettenlängen aufgetragen. Es sind Mittelwerte von drei biologischen Replikaten gezeigt. Die Standardabweichung der Prozentwerte beträgt maximal 11 % (i.d.R. 3-4 %).

Die unnatürlichen, verzweigten kurzkettigen Supplementierungen erlaubten der Mutante, wie die Supplementierung der natürlich verzweigten kurzkettigen Fettsäuren auch die Olefinsynthese. Die unnatürlichen, verzweigten Carbonsäuren wurden im Stamm *trpE16* Δ 06800-20:hyg im Naylor-Medium im Fall der supplementierten 3-Methylpentansäure und 2-Ethylbutansäure in vergleichbare Mengen Olefine umgesetzt. Nur die durch Supplementierung der 3,3-Dimethylbutansäure produzierten Fettsäure-Substrate durch geringere Akzeptanz der Acyl-CoA-Synthetasen oder der Ole-Enzyme führten zu geringeren Olefin-Ausbeuten (Abbildung 65A). Festzuhalten ist auch, dass im Fall der *ai*-verzweigten C14- und C16-Fettsäuren die Bildung von C29-Olefinen häufiger erfolgte als die Kombination zu C27- oder C31-Olefinen. Im Fall der Ethyl-verzweigten C16- und C18-Fettsäuren erfolgte vor allem die Bildung von C31-Olefinen, im Fall der 3,3-Dimethyl-verzweigten C14- und C16-Fettsäuren wurden dagegen überwiegend C27-Olefine produziert. Hier wurde in der Mutante *trpE16* Δ 06800-20:hyg im Naylor-Medium unter diesen Supplementierungsbedingungen erstmals in dieser Arbeit die Bildung von C31-Olefinen in *M. luteus* beobachtet (Abbildung 65B).

In der Mutante *trpE16* $\Delta 06800$ -20:hyg wurde die Untersuchung der durch die Supplementierung von 4 mM 3-Methylpentansäure ermöglichten Synthese verzweigter Fettsäuren und Olefine durch Vergleich mit der Supplementierung des natürlichen, verzweigten, kurzkettigen Substrats 2-Methylbutansäure im LB-Medium fortgesetzt.

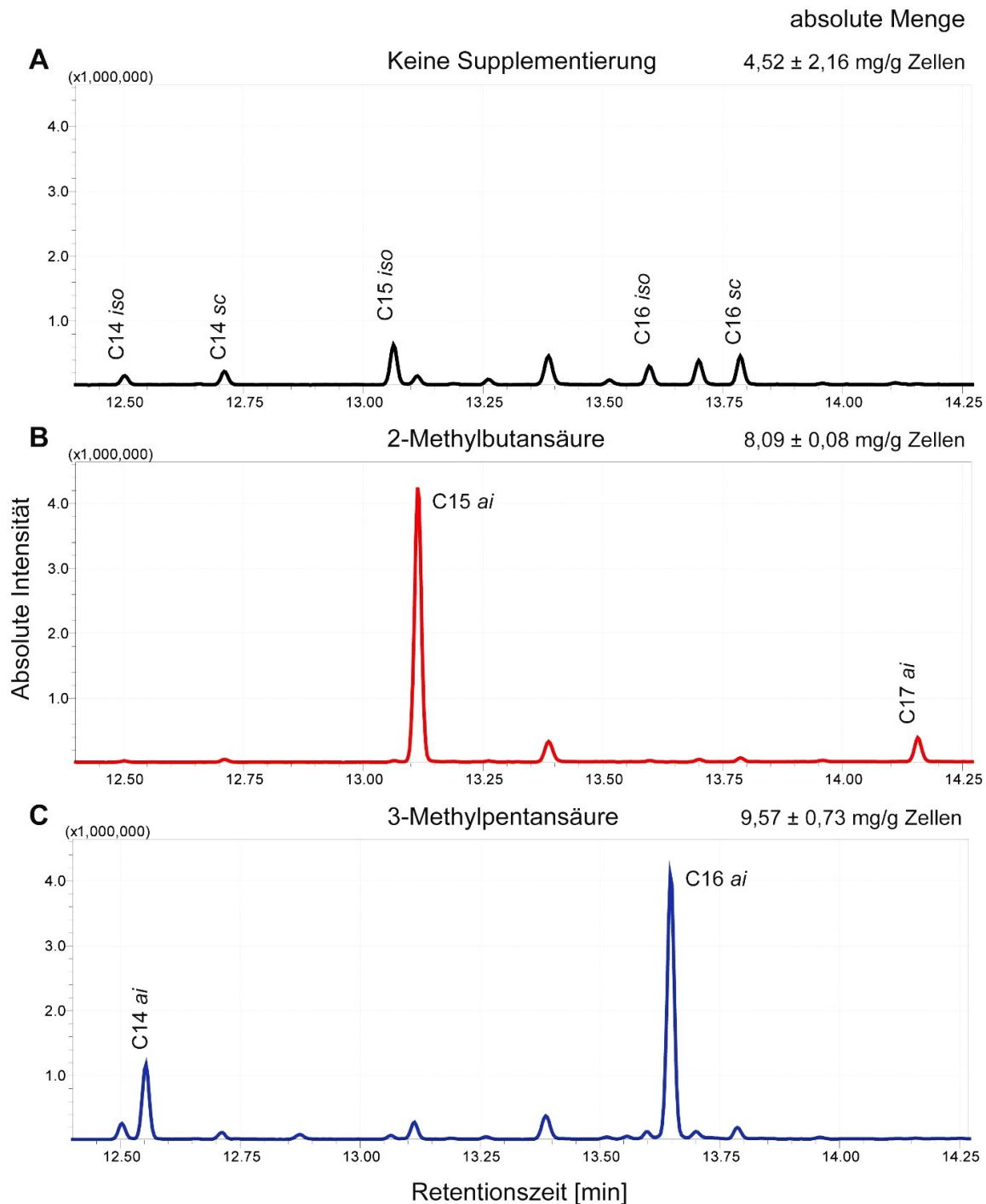


Abbildung 66: Fettsäure-Produktion der BCKA-Dehydrogenase-Deletions-Mutante *trpE16* $\Delta 06800$ -20:hyg in stationärer Phase nach Wachstum in LB-Medium ohne (A) und mit Supplementierung von 2-Methylbutansäure (B) und 3-Methylpentansäure (C) als repräsentatives Gas-Chromatogramm. Die produzierten Fettsäuremengen sind in der rechten oberen Ecke des Gas-Chromatogramms angegeben.

Die BCKA-Dehydrogenase-Mutante konnte im LB-Medium aus der Supplementierung von 3-Methylpentansäure tendenziell mehr *ai*-verzweigte C14- und C16-Fettsäuren produzieren als aus der Supplementierung von 2-Methylbutansäure *ai*-verzweigte C15- und C17-Fettsäuren (Abbildung 66). Die Fettsäure-Biosynthese unterschied nicht zwischen beiden Starter-Molekülen.

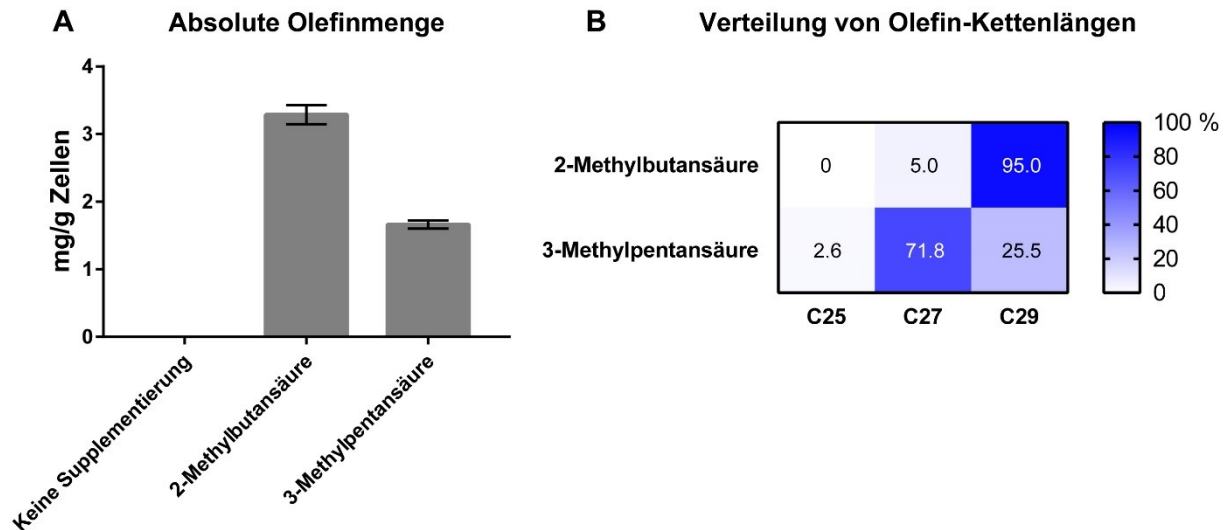


Abbildung 67: Olefinproduktion der BCKA-Dehydrogenase-Deletions-Mutante *trpE16* Δ 06800-20:hyg in stationärer Phase nach Wachstum in LB-Medium ohne und mit Supplementierung von 2-Methylbutansäure und 3-Methylpentansäure. In (A) sind die produzierten absoluten Olefinmengen aufgetragen. In (B) ist die Verteilung der produzierten Olefin-Kettenlängen bei der jeweiligen Supplementierung angegeben. Es sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Die Standardabweichung der Prozentwerte beträgt maximal 2 %.

Auf Olefin-Ebene dagegen zeigte sich, dass die Acyl-CoA-Synthetasen oder die Olefin-Enzyme zwischen den *ai*-verzweigten C14- und C16-Fettsäuren nach Supplementierung von 3-Methylpentansäure sowie den *ai*-verzweigten C15- und C17-Fettsäuren nach Supplementierung von 2-Methylbutansäure unterschieden. Die Supplementierung von 3-Methylpentansäure führte trotz tendenziell höherer Fettsäureproduktion zu halb so großen Olefin-Ausbeuten als die Supplementierung von 2-Methylbutansäure (Abbildung 67A). Auffällig ist außerdem, dass aus *ai*-verzweigten geradzahigen Fettsäuren (3-Methylpentansäure) mehr C27-Olefine und aus *ai*-verzweigten ungeradzahigen Fettsäuren (2-Methylbutansäure) mehr C29-Olefine gebildet wurden (Abbildung 67B).

Abschließend wurde die Supplementierung von 4 mM 3-Methylpentansäure im LB-Medium auch in *M. luteus* trpE16 mit bestehender Synthese natürlicher, verzweigter Fettsäuren durchgeführt.

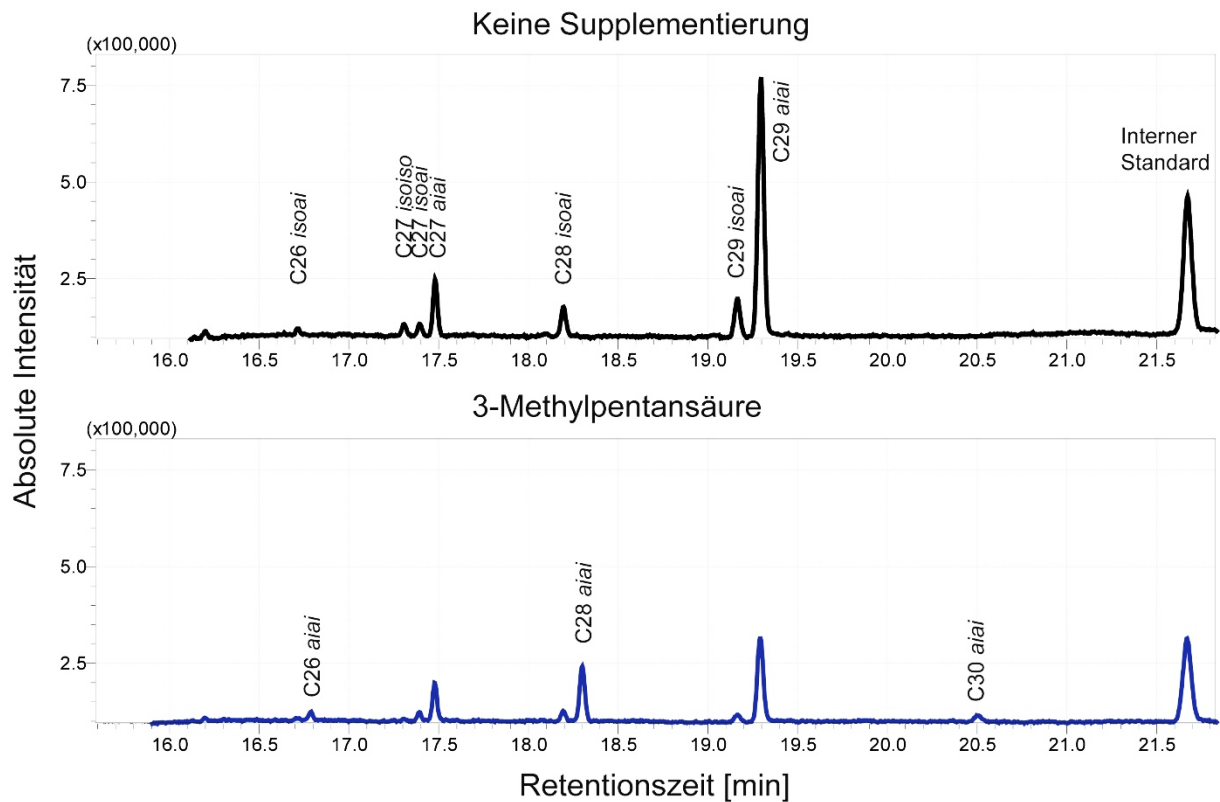


Abbildung 68: Olefinproduktion von *M. luteus* trpE16 in stationärer Phase nach Wachstum in LB-Medium ohne und mit Supplementierung von 3-Methylpentansäure als repräsentatives Gas-Chromatogramm.

Die Kombination der natürlich produzierten, ungeradzahigen und durch die Supplementierung von 3-Methylpentansäure ermöglichten geradzahigen *ai*-verzweigten Fettsäuren erlaubte hier die Bildung von *aiai*-verzweigten C26-, C28- und C30-Olefinen, die natürlicherweise aufgrund fehlender geradzahiger *ai*-verzweigter Fettsäuren nicht gebildet werden können (Abbildung 68). Dieses Ergebnis diente auch der Bestätigung der in Abschnitt „5.1.2. Bestimmung des produzierten Olefinprofils von *M. luteus*“ vorgenommenen Annotation der geradzahigen Olefine.

5.3.4. Die *oleA*-Austausch-Stämme (olex-Stämme)

Zur weiteren Untersuchung der Substratspezifität der Ole-Enzyme bzw. des OleA-Enzyms wurden die *oleA*-Gene von *K. palustris* DSM 20319, *Kocuria sp.* 3352, *Kytococcus sedentarius* TW93 und *Micrococcus sp.* 2148 zusammen mit einer angefügten co-linearen Kanamycin-Kassette ohne Terminator-Sequenz in *M. luteus* trpE16 ope hinter den *sdh* (Succinat-Dehydrogenase) -Promotor eingebracht und das native *oleA*-Gen ausgetauscht. Die nativen *oleBCD*-Gene aus *M. luteus* blieben in diesen Stämmen erhalten.

Die Olefinproduktion der *oleA*-Austausch-Stämme (olex-Stämme) im Vergleich zum trpE16 ope Akzeptor-Stamm und den jeweiligen Donor-Stämmen wurde in der stationären Phase nach Wachstum in LB-Medium analysiert.

Im Fall des Austausches des nativen *M. luteus oleA*-Gens gegen das *oleA*-Gen eines anderen *Micrococcus*-Stammes (*Micrococcus sp.* 2148) konnten im Vergleich zum Donor-Stamm Verschiebungen der Olefinproduktion von C28- zu C29- und von *isoiso*- zu *aiai*-Olefinen beobachtet werden sowie eine deutliche Steigerung der gesamten Olefinproduktion. Im Vergleich zum Akzeptor-Stamm blieb das Olefinprofil in Kettenlängen und Isomeren komplett erhalten, aber die gesamte Olefinproduktion war reduziert. Die Einführung des *oleA*-Gens von *Kocuria sp.* 3352 führte zu einer Verschiebung der produzierten Kettenlängen von C27-C29 zu C23-C25 in den Bereich des *Kocuria*-Donor-Stammes und zu einer Verschiebung von *aiai*- zu *isoiso*- und *scsc*-Olefinen im Vergleich zum Akzeptor-Stamm trpE16 ope. Der *Kocuria sp.* 3352-Donor-Stamm wies ebenfalls größere Anteile von *iso*-verzweigten Olefinen auf. Es kam zu einer deutlichen Abnahme der insgesamt extrahierten Olefinmenge im Vergleich zum *M. luteus*-Akzeptor- und *Kocuria sp.* 3352-Donor-Stamm. Die Einführung des *oleA*-Gens von *K. palustris* DSM 20319 führte zu einer Verschiebung des produzierten Kettenlängenbereichs von C27-C29 zu C25 in Richtung des Bereichs des Donor-Stammes (C23-C25) und zu einer Verschiebung von *ai*- zu *iso*- und unverzweigten Olefinen im Vergleich zum Akzeptor-Stamm trpE16 ope. Der *K. palustris* DSM 20319-Donor-Stamm wies eine unspezifische Isomeren-Produktion von *iso*-, *ai*- und unverzweigten Olefinen auf. Außerdem kam es zu einer deutlichen Abnahme der insgesamt extrahierten Olefinmenge im Vergleich zum *M. luteus*-Akzeptor- und *Kocuria sp.* 3352-Donor-Stamm.

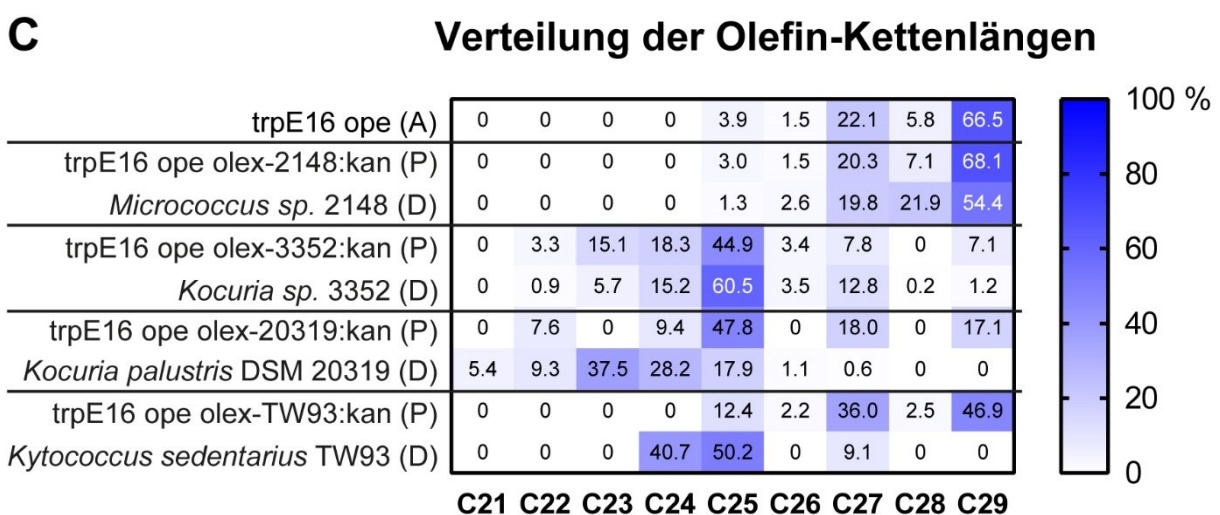
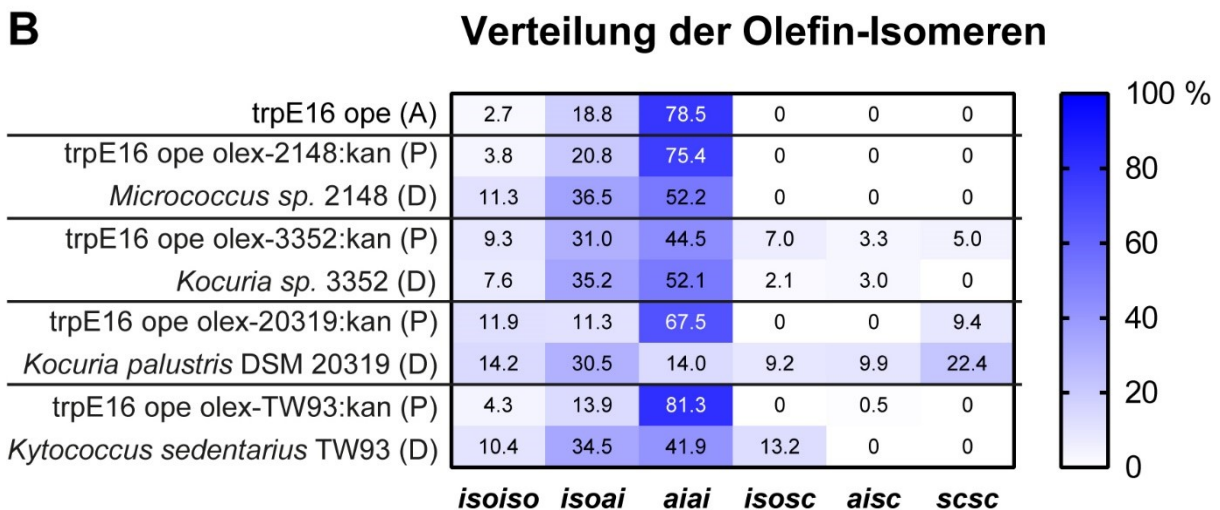
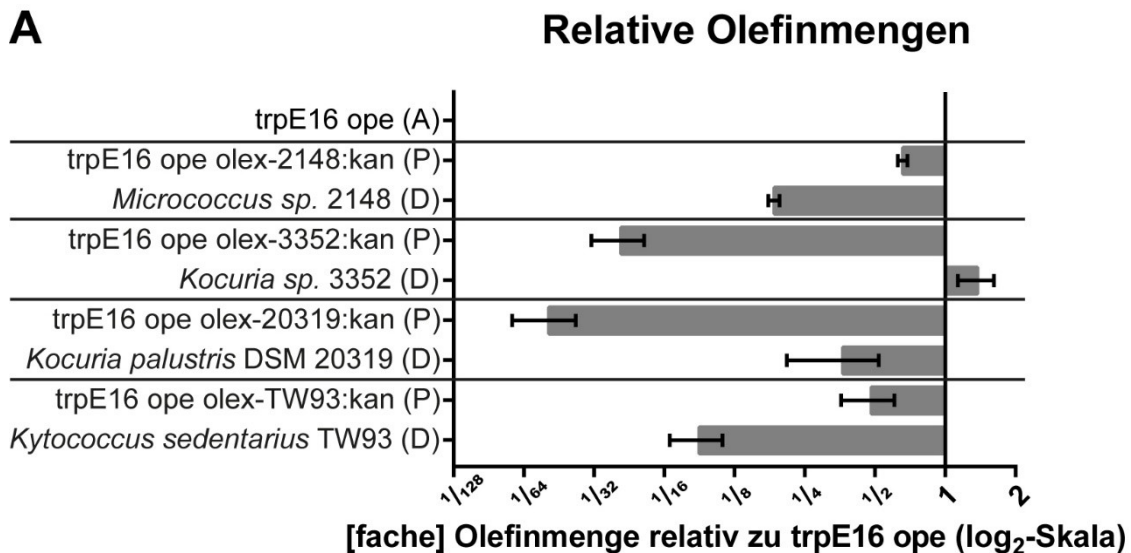


Abbildung 69: Olefinproduktion in relativen Mengen (A), Verteilung der Isomeren (B) und Verteilung der Kettenlängen (C) der *oleA*-Austausch-Stämme (olex-Stämme), des Akzeptor-Stammes trpE16 ope sowie der *Kocuria*-, *Kytococcus*- und *Micrococcus*-Donor-Stämme in der stationären Phase nach Wachstum in LB-Medium. Es sind Mittelwerte von mindestens zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Die Standardabweichung der Prozentwerte liegt bei unter 10 %. Die Pärchen aus Donor- und olex-Produktstamm sind durch Linien abgegrenzt. Abkürzungen: A, Akzeptor-Stamm; P, olex-Produkt-Stamm; D, Donor-Stamm.

Im Fall des Austausches gegen das *oleA*-Gen aus *Kytococcus sedentarius* TW93 blieb es im Vergleich zum Akzeptor-Stamm *trpE16 ope* mehrheitlich bei dem produzierten Kettenlängenbereich C27-C29 mit größeren Anteilen kürzerer Olefine und der Kettenlängenbereich von *Kytococcus* C24-C25 wurde nicht in *M. luteus* übertragen. Das Olefin-Isomeren-Spektrum von *M. luteus* blieb ebenfalls erhalten und wies gegenüber *Kytococcus isoiso-* zu *aiai*-Verschiebungen auf. Gegenüber *trpE16 ope* fiel die gesamte Olefinproduktion geringer aus, allerdings stieg sie im Vergleich zum *Kytococcus*-Donor-Stamm deutlich an (Abbildung 69).

5.3.5. Expression von OleA-Proteinen der *Micrococcales*

Eine vollständige Charakterisierung der Substratspezifität der OleA-Enzyme verlangt deren Kristallisation und Strukturanalyse von Substrat-Bindestellen im Hinblick auf Unterschiede in der räumlichen Einschränkung durch große oder kleine Aminosäurereste sowie der Stabilisierungsmöglichkeit der Alkyl-Ketten durch den Grad der Hydrophobizität.

Um dies zu ermöglichen wurde nach Optimierung aller Bedingungen die Expression verschiedener OleA-Proteine der *Micrococcales* angestrebt (Tabelle 41).

Tabelle 41: Liste von *Micrococcales*-Stämmen, deren OleA-Protein versucht wurde überzuproduzieren und aufzureinigen.

Stammbezeichnung
<i>M. luteus</i> trpE16
<i>Micrococcus</i> sp. 2228
<i>M. luteus</i> MAW843
<i>K. palustris</i> DSM 11925
<i>K. palustris</i> DSM 20319
<i>K. palustris</i> DSM 20320
<i>Kocuria</i> sp. 3352
<i>Kytococcus sedentarius</i> TW93

Die *oleA*-Gene wurden mit einer Sequenz für einen N-terminalen His-Tag in pET19b-Vektoren kloniert und die codierten Proteine in *E. coli* Rosetta 2-Zellen produziert. Die Expression erfolgte nach Wachstum in LB-Medium bei 37 °C und Induktion mit 0,1 mM IPTG bei 25 °C über Nacht. Das SDS-Acrylamid-Gel in Abbildung 70 zeigte die erfolgreiche Produktion und Aufreinigungsstadien von zwei *Kocuria*-OleA-Proteinen.

Insgesamt konnten alle *Kocuria*-Proteine sowie das *Kytococcus*-Protein erfolgreich produziert werden und pro Liter Expressionskultur konnten 6-10 mg Protein gewonnen werden. Dagegen war die Überproduktion aller getesteten *Micrococcus*-Proteine nicht möglich.

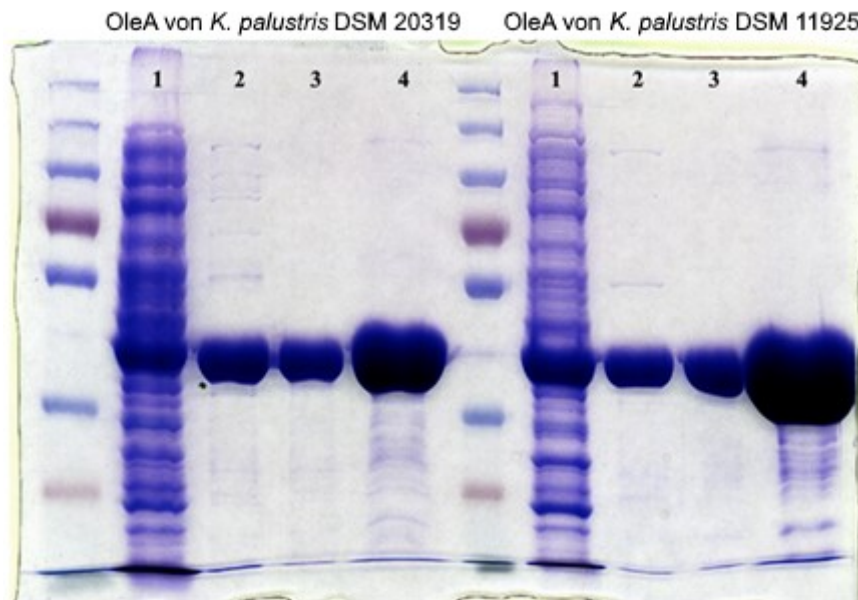


Abbildung 70: Repräsentatives SDS-Acrylamid-Gel zur Expression der ~40 kDa OleA-Proteine von *K. palustris* DSM 20319 und *K. palustris* DSM 11925. Neben dem Größenstandard ist in 1 jeweils die Rohextrakt-Probe, in 2 die Probe nach His-Tag-Aufreinigung, in 3 die Probe nach His-Tag-Aufreinigung und Größenausschluss-Chromatographie und in 4 die Probe nach Aufreinigungen und 10facher Aufkonzentrierung aufgetragen.

Die aufgereinigten *Kocuria*- und *Kytococcus*-Proteine wurden dem in den Methoden beschriebenen „OleA *in vitro* Aktivitätsassay/DTNB-Assay“ unterzogen. Dabei setzen durch Spaltung des Acyl-CoA-Substrats entstandene CoA-SH-Moleküle photometrisch messbares TNB aus DTNB frei. Lediglich das OleA-Protein aus *K. palustris* DSM 20319 zeigte innerhalb von 24h unter den angegebenen Bedingungen Aktivität mit den getesteten Acyl-CoA-Substraten. Bei Verwendung von 1,3 mM Dodecanoyl-CoA konnten 0,04 mM TNB, bei 10-Methyl-dodecanoyl-CoA konnten 0,008 mM TNB und bei 11-Methyl-dodecanoyl-CoA konnten 0,00006 mM TNB gemessen werden. Die verzweigten Acyl-CoA-Substrate wurden selbst aus den entsprechenden freien Fettsäuren (Larodan) hergestellt (Methoden: „Acyl-CoA-Synthese aus freien Fettsäuren“).

Die Kristallisation der aufgereinigten OleA-Proteine steht noch aus.

5.3.6. *In silico*-Analyse der OleA-Substratkanäle der *Micrococcales*

Der Aufbau der Alkyl-Kanäle der OleA-Proteine bestimmt welche Alkyl-Kettenlängen stabilisiert und in der Folge durch OleA umgesetzt werden können.

Das OleA-Protein des Gram-negativen Bakteriums *X. campestris* wurde bereits kristallisiert und seine Struktur aufgelöst [32], [33]. Der geringe Verwandtschaftsgrad zwischen den Aminosäuresequenzen (~40 % Sequenzidentität) erlaubt jedoch für die OleA-Proteine der *Micrococcales* nur die Vorhersage von Strukturmodellen mit geringer Qualität (SWISS-MODEL: QMEAN \leq -1,5; QMEAN = 0,0-1,0 stehen für akzeptable Modelle) [87].

Es wurde angenommen, dass die OleA-Proteine von *X. campestris* und der *Micrococcales* strukturell ähnlich sind. Ein Protein-Sequenzalignment (Praline [88]) zwischen einem Monomer des *Xanthomonas*-Proteins und der *Micrococcales*-Proteine wurde genutzt, um die Position der Aminosäurereste, die die Alkyl-Kanäle im *Xanthomonas*-Protein laut Goblirsch *et al.* (2016) bilden, auf die Aminosäuresequenzen der *Micrococcales*-Proteine zu übertragen (Alignment nicht gezeigt). In der Folge wurden aus einem Proteinsequenz-Alignment ausgewählter *Micrococcales*-Stämme (ohne die Aminosäuresequenz von *X. campestris*) die die Alkyl-Kanäle bestimmenden Aminosäurereste zusammengestellt und hinsichtlich Konservierung und Hydrophobizität ausgewertet (Abbildung 71 und 72). Die Sequenzidentität des gesamten Alignments beträgt 58 %, wobei es sich bei einem Großteil der unkonservierten Bereiche um die die Alkyl-Kanäle bildenden Aminosäurereste handelt. Die in den Abbildungen 71 und 72 eingezeichneten Sekundärstrukturen entstammen den Angaben von Goblirsch *et al.* (2016). Auch das verwendete Alignment-Programm (Praline) erlaubte die Vorhersage von Sekundärstrukturen und kann die Angaben für das *Micrococcales*-Alignment bezüglich α -Helices und β -Faltblättern größtenteils bestätigen (Ausnahme: Position 230 ± 3 des Alignments in Abbildung 72), was die Annahme gleicher struktureller Organisation von *Xanthomonas*- und *Micrococcales*-OleAs unterstützte.

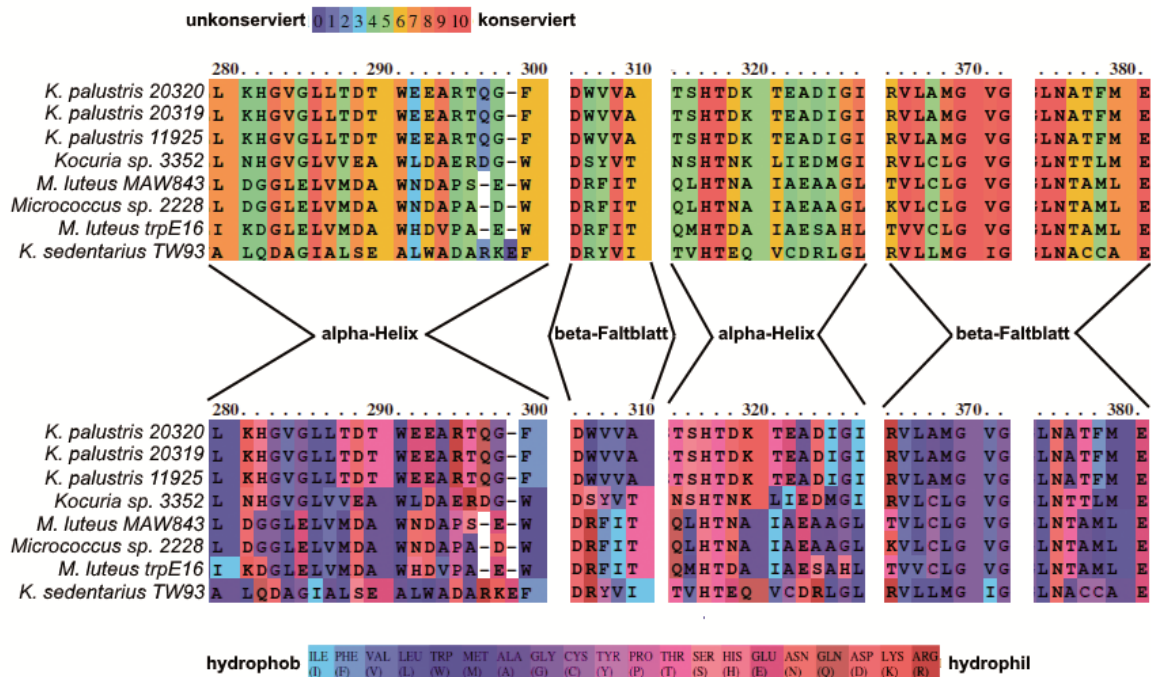


Abbildung 71: Zusammenstellung eines Aminosäuresequenz-Alignments der OleA-Sequenzen von *Micrococcales*-Stämmen bezüglich der den Alkyl-Kanal A bestimmenden Aminosäurereste [33] formatiert nach Konservierungsgrad (oben) sowie Grad der Hydrophobizität (unten) (hergestellt unter Benutzung des Alignment-Programms Praline [88]). Die Angaben zu Sekundärstrukturen (Mitte) entstammen ebenfalls Goblirsch *et al.* (2016).

Die Spezifität der OleA-Proteine für längere (*Micrococcus*) oder kürzere (*Kocuria*) Alkyl-Ketten wird bestimmt durch die Fähigkeit der Alkyl-Kanäle durch den Grad der Hydrophobizität und räumliche Ausbreitung von Aminosäureresten die Alkyl-Ketten zu stabilisieren bzw. durch polare Reste innerhalb des Kanals die Lage des Substrats zu steuern. In Kanal A (Abbildung 71) zeigt die α -Helix 280-300 (innen nach außen) um die Position 284 des Alignments, wo sich im *Xanthomonas*-Protein ein mit der Alkyl-Kette interagierendes Isoleucin befindet, für die *Micrococcales*-Proteine Valin- und Leucin-Reste, die dies übernehmen könnten. Die *Micrococcales*-Sequenzen sind hier nicht konserviert. Die *Micrococcus*-Sequenzen weisen in direkter Nachbarschaft tendenziell stabilisierende hydrophobe Bereiche auf, aber auch unterschiedliche Verteilung steuernder polarer Reste im Vergleich zu den *Kocuria*-Sequenzen. Die *Kytococcus*-Sequenz schließt sich keinem der beiden Sequenzmuster an. Innerhalb der gleichen α -Helix um Position 298 des Alignments gibt es zwischen den Gattungen wiederum geringe Konservierung. In Richtung Öffnung der Substrattasche im *Xanthomonas*-Protein sind im Fall der *Micrococcus*- und *Kytococcus*-Sequenzen weniger polare steuernde Reste weiter außen positioniert als bei den *Kocuria*-Sequenzen.

Im β -Faltblatt-Abschnitt 306-310 (außen nach innen) des Alignments sind bei den *Micrococcus*-Sequenzen im Vergleich zu den *Kocuria*-Stämmen hydrophobe und sperrige Reste weiter in die Tasche verschoben, während außen ein zusätzlicher steuernder stark polarer Arginin-Rest eingefügt ist. *Kytococcus* teilt die Sequenzeigenschaften von *Micrococcus*. In der nicht konservierten α -Helix 315-327 (außen nach innen) zeigen die *Kocuria*-Sequenzen ausgedehntere polare Bereiche, die bei den *Micrococci* von hydrophoben Resten unterbrochen sind. *Kytococcus* zeigt ebenfalls großflächigere polare Bereiche, aber mit den hydrophoben Unterbrechungen der *Micrococcus*-Sequenzen. Die β -Faltblatt-Abschnitte 365-372 (außen nach innen) und 375-381 (innen nach außen) mit der Position 371, an der sich im *Xanthomonas*-Protein laut Goblirsch *et al.* (2016) ein mit dem Substrat stark interagierendes Isoleucin wie bei *Kytococcus* befindet, sind zwischen den *Micrococcales*-Sequenzen hoch konserviert.

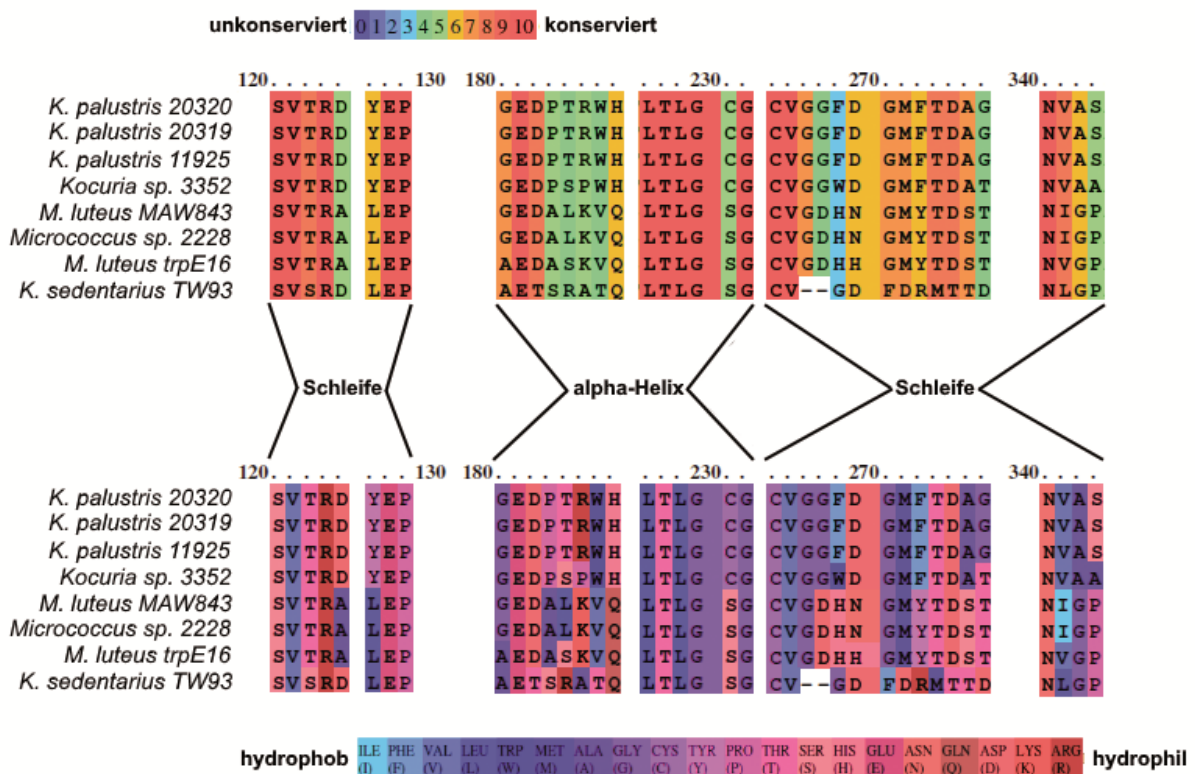


Abbildung 72: Zusammenstellung eines Aminosäuresequenz-Alignments der OleA-Sequenzen von *Micrococcales*-Stämmen bezüglich der den Alkyl-Kanal B bestimmenden Aminosäurereste [33] formatiert nach Konservierungsgrad (oben) sowie Grad der Hydrophobizität (unten) (hergestellt unter Benutzung des Alignment-Programms Praline [88]). Die Angaben zu Sekundärstrukturen (Mitte) entstammen ebenfalls Goblirsch *et al.* (2016).

Der Schleifen-Bereich 121-125 (innen nach außen) im Substrat-Kanal B (Abbildung 72) ist konserviert, allerdings werden die steuernden polaren Reste bei den *Micrococcus*-Sequenzen außen von einem hydrophoben Rest unterbrochen. Die *Kytococcus*-Sequenz teilt die Eigenschaften der *Kocuria*-Sequenzen. Der Schleifenbereich 127-129, der vom anderen OleA-Monomer in den Alkyl-Kanal B hineinragt und dessen Glutamat (128) im *Xanthomonas*-Protein als katalytische Base wirkt sowie nach Rückfaltung das Ende der Alkyl-Kette stabilisiert [32], [33], weist bei den *Micrococci* und *Kytococcus* einen im Gegensatz zu den *Kocuria*-Stämmen kleineren und stark hydrophoberen Leucin-Rest auf. Die nicht konservierte α -Helix 181-188 (innen nach außen) zeigt in den *Kocuria*-Sequenzen ausgedehnte polare steuernde Bereiche mit einem abschließenden großen hydrophoben Rest. Abgesehen von diesem hydrophoben Rest teilt *Kytococcus* dieses Aminosäuremuster. Bei den *Micrococcus*-Sequenzen fällt der abschließende hydrophobe Rest deutlich kleiner aus und die polaren Reste sind von weiteren hydrophoben Resten unterbrochen. Die anschließende stark konservierte α -Helix 226-232 (innen nach außen) zeigt bei *Micrococcus* und *Kytococcus* einen Serin statt eines Cystein-Rests wie bei den *Kocuria*-Sequenzen. Der Schleifen-Bereich 265-277, der dem Kanal B aufliegt, enthält ein Methionin 272, an dem nach Rückfaltung auch die Spitze der Alkyl-Kette positioniert wird. Hier weisen die *Micrococcus*- und *Kytococcus*-Sequenzen großflächigere polare Bereiche und den Wegfall teilweise großer hydrophober Reste gegenüber den *Kocuria*-Sequenzen auf. Der Schleifenbereich 295-298 weit innerhalb des Alkyl-Kanals zeigt den Wechsel von einem Prolin-Rest bei den *Micrococci* und *Kytococcus* zu einem Serin bei den *Kocuria*-Sequenzen.

6. Diskussion

6.1. Grundlegende Betrachtungen zur Olefinproduktion in *M. luteus*

6.1.1. Das Olefinprofil von *M. luteus*

In dieser Arbeit konnte durch Verwendung kommerzieller Fettsäure-Methylester-Standardlösungen (Abbildung 12) und Hydrierungsexperimente (Abbildung 13 und 14) für *M. luteus* trpE16 die Produktion von ausschließlich einfach ungesättigten Olefinen (Monoalkene) mit *cis*-Konfiguration gezeigt werden und die Annotation der im folgenden besprochenen Isomeren- und Kettenlängen-Profile bestätigt werden. Als Gram-positives Bakterium besitzt *M. luteus* eine vorwiegend zu verzweigten Fettsäuren führende Fettsäuresynthese, sodass in LB-Medium fast ausschließlich verzweigte Olefine gebildet werden (Abbildung 16). Das Verhältnis der Isomeren *isoiso*: *isoai*: *aiai* mit 3: 20: 77 weist *M. luteus* eine stark *aiai*-dominierte Olefinproduktion aus, die der *ai*-dominierten Fettsäureproduktion entspricht. Auch in Minimalmedium (Naylor-Medium) bilden die *aiai*-verzweigten Olefine die größte Fraktion (*isoiso*: *isoai*: *aiai*: *isosc*: *aisc*: *scsc* mit 2: 18: 57: 7: 15: 1), allerdings treten auch zusätzlich gebildete, teilweise oder vollständig unverzweigte Olefine auf. Die Fettsäuresynthese Gram-positiver Bakterien und ihr für die Verteilung der Fettsäure-Isomeren bestimmender Faktor FabH unterscheiden sich von der der Gram-negativen Bakterien darin, dass sie unspezifisch sowohl unverzweigte Primer-Moleküle (Acetyl-CoA, Propionyl-CoA) als auch verzweigte Primer (2-Methylbutanoyl-, Isobutanoyl- und Isovaleryl-CoA) aus dem Aminosäureabbau umsetzen [70], [89]. Unter Annahme einer Substratspezifität der Olefinsynthese in *M. luteus* für *ai*-verzweigte Acyl-CoAs ist der Rückgang der Anteile verzweigter Olefine zu Gunsten der unverzweigten Olefine in Naylor-Medium bei induzierter Fettsäure-Biosynthese (eigene RNA-Sequenzierungsdaten, u.a. induzierter *acc*-Gencluster) auf eine Limitierung verzweigter Fettsäure-Primer und damit verzweigter Acyl-CoAs für die Olefinsynthese zurückzuführen.

In LB- wie in Naylor-Medium ist C29 mit 83 % bzw. 84 % die dominierende Kettenlänge, allerdings verschiebt sich der insgesamt produzierte Kettenlängenbereich von C27-C29 in LB-Medium auf C28-C30 in Naylor-Medium, wobei es sich bei den C30-Olefinen wiederum vorwiegend um (teilweise) unverzweigte Olefine handelt. Somit ist auch diese Entwicklung in Naylor-Medium in einer Limitierung verzweigter Fettsäure-Primer bei gleichzeitigem Überschuss von Malonyl-ACP-Verlängerungseinheiten (induzierte Acc-Reaktion) begründet.

6.1.2. *M. luteus* als Vertreter der Olefinproduktion seiner phylogenetischen Ordnung

Shewanella oneidensis mit seiner Produktion eines einzelnen 9fach ungesättigten C31-Olefins wird generell als häufigstes Beispiel Gram-negativer Olefinproduktion angeführt, die auf der verbreiteten Fähigkeit Gram-negativer Bakterien zur Synthese ungesättigter Fettsäuren fußt. Gram-negative Olefinproduktion wird mit Vertretern der Phyla der *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* und *Proteobacteria* als phylogenetisch weitgefächert beschrieben. Dagegen fokussiert sich die Gram-positive Olefinproduktion in der Literatur auf das einzelne Phylum der *Actinobacteria* [16]. Diese Arbeit beschreibt die Gram-positive Olefinproduktion erstmals nicht nur anhand einzelner Stämme, sondern über das gesamte phylogenetische Spektrum der *Micrococcales* innerhalb des Phylums der *Actinobacteria* (siehe Abbildung 19). Diese Arbeit weist die Ordnung der *Micrococcales* mit 13 Gattungen, in denen Olefinproduktion beschrieben werden konnte, und 21 Gattungen, in denen *in silico* vollständige *oleABCD*-Gencluster nachgewiesen werden konnten, von insgesamt 160 Gattungen (8,1 % bzw. 13,1 %), als das zentrale Taxon der bisher bekannten Gram-positiven Olefinproduktion aus. Die Olefinproduktion der Gattungen *Microbacterium*, *Paenarthrobacter*, *Pseudarthrobacter*, *Dermacoccus*, *Rothia* und *Glutamicibacter* konnte in dieser Arbeit erstmals beschrieben werden. Innerhalb der Ordnung der *Micrococcales* stellt *Micrococcus luteus* mit seinem C29-Kettenlängen- und *aiai*-Isomer-dominierten Olefinprofil das Paradebeispiel Gram-positiver Olefinproduktion dar. Die meisten anderen Vertreter der *Micrococcales* bilden geringere Mengen Olefine und diese Produktion ist auf C29 *aiai*-Olefine beschränkt.

Die Gattungen der *Kocuria*-, *Kytococcus*- und *Rothia*-Stämme stellen trotz eines für *Micrococcales* allgemeinen Fettsäureprofils (Anhang 9.1. Abbildung 78 und 81) mit ihren deutlich kürzeren Olefin-Kettenlängen oder ihren breiteren bzw. limitierten Isomer-Profilen diesbezüglich innerhalb der *Micrococcales* Ausnahmen dar. Die Substratspezifität der Olefinsynthese der *Micrococcus*-, *Kocuria*- und *Kytococcus*-Stämme wurde deshalb innerhalb dieser Arbeit tiefergehend untersucht und verglichen.

6.1.3. Der zeitliche Verlauf der Olefinproduktion in *M. luteus*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in *M. luteus* trpE16 wie in *Kocuria rizophyllia* [27] die Anreicherung der bakteriellen Zelle mit Olefinen unabhängig vom Kulturmedium ab Mitte der exponentiellen Phase und beim Übergang in die stationäre Phase stattfindet (Abbildung 11). Die Olefin-Konzentration der Zellen erreicht in der stationären Phase ihr Maximum sowie das besprochene Olefinprofil seine finale Ausprägung. Deswegen wurden Olefinproben in dieser Arbeit grundsätzlich aus der stationären Phase genommen. Albro und Dittmer [25] weisen auch auf einen simultan stattfindenden Anstieg des pH-Werts hin. Dies konnte auch hier beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), allerdings ist diese Entwicklung im LB- und Naylor-Medium sehr wahrscheinlich auf die Verwertung von Aminosäuren als Kohlenstoffquelle und die dabei erfolgende Freisetzung von Ammonium zurückzuführen. Dass die aktive Olefin-Anreicherung erst in der zweiten Hälfte der Wachstumskurve beobachtet wird darf nicht überdecken, dass eine minimale Olefinsynthese mit Beginn des Wachstums stattfinden muss, um eine gewisse Olefin-Konzentration in den Zellen auch in der lag- und frühen exponentiellen Phase aufrechtzuerhalten (Abbildung 11). Außerdem wird die aktive Anreicherung ab Mitte der exponentiellen Phase mit Beginn des Wachstums von *M. luteus* vorbereitet. Dafür spricht die in Abbildung 22 festgehaltene Kohlenstoffaufnahme im Naylor-Medium. Die Mutante ohne Olefinproduktion (trpE16 Δ ole:kan) nimmt insgesamt 1,5 mg Kohlenstoff pro Gramm Zellen weniger auf als der Ausgangsstamm (trpE16). Erfahrungsgemäß können aus trpE16 nach Wachstum in die stationäre Phase 1-3 mg Olefine pro Gramm Zellen extrahiert werden. Aus der Mutante trpE16 ope können routinemäßig 3-5 mg Olefine pro Gramm Zellen extrahiert werden und diese nimmt auch 1,3 mg Kohlenstoff pro Gramm Zellen mehr Kohlenstoff auf als der Ausgangsstamm (trpE16).

Die Kohlenstoffaufnahme der Stämme scheint mit dem Kohlenstoffverbrauch für die anstehende Olefinproduktion zu korrelieren. Zur weiteren Klärung der zeitlichen Organisation der Olefinproduktion ist es notwendig die Expression der OleABCD-Enzyme sowie von Schlüsselreaktionen des Aminosäure- und Fettsäure-Stoffwechsels, die die Substrate der Olefinsynthese bereitstellen, mithilfe von qPCR oder RNA-Sequenzierung über mehrere Zeitpunkte der frühen Wachstumsphase zu verfolgen.

6.1.4. Die Olefine als Strukturelement der Zellmembran

Der Speicherort der Olefine in der Bakterienzelle ist auch im Hinblick auf ihre Funktion interessant. Allerdings ist die Annahme der Literatur [30], [35], dass die Olefine natürlich in die Zellmembran eingebaut werden, nicht unumstritten. Es ist fraglich, ob und wie sich die langen und rein hydrophoben Olefine innerhalb der amphiphilen Lipid-Doppelschicht arrangieren. In dieser Arbeit konnten durch Fraktionierung von Kulturproben in Kulturüberstand, ganze Zellen, Zellwand, Membran und Cytosol die Olefine tatsächlich innerhalb der Zellen und dort in der Membranfraktion lokalisiert werden (Abbildung 17). Es bleibt zu untersuchen in welcher Form sich die Olefine zwischen den Lipiden arrangieren. Des Weiteren wurde untersucht, ob durch eine Manipulation des Speicherorts der Olefine in *M. luteus* rückwirkend auf die Olefinsynthese Einfluss genommen werden kann. Wie in der Literatur bereits beschrieben [66], [67] sorgt die Expression des tierischen Caveolin-1 auch in Bakterien für eine Vergrößerung der Membranoberfläche. Zwar konnte eine Veränderung der Membranstruktur für *M. luteus* mikroskopisch nicht festgehalten werden, aber, wie Abbildung 18 zeigt, konnte ein Anstieg der extrahierbaren Olefine in den Zellen beobachtet werden. Zusätzlich war eine verstärkte Umsetzung von *ai*-verzweigten Acyl-CoAs auch mit kürzeren Kettenlängen auffällig. Möglicherweise ergibt sich ein durch die Expression von Caveolin-1 ausgelöster „Pull“-Effekt auf die OleABCD-Reaktion sowie auf die FabH-Reaktion und die Bereitstellung von *ai*-verzweigten Acyl-CoA-Primern aus dem Aminosäureabbau. Es bleibt zu untersuchen, ob eine durch die Expression des Caveolin-Proteins vergrößerte Membranoberfläche nur den vermehrten Einbau von Olefinen erlaubt oder ob weitere Effekte bezüglich der Aminosäure-, Fettsäure-, Lipid- und Olefinsynthese auftreten.

Eine weitere Möglichkeit zur Manipulation des Speicherorts, der Zellmembran, stellt sicherlich die Regulation der Lipidsynthese durch das Stickstoffangebot dar [42][69]. Durch eine Steigerung des Stickstoffangebots von 1 g/L auf 10 g/L Ammoniumchlorid im Naylor-Medium (Abbildung 24) und eine Limitierung der Lipidsynthese wurden für die Olefinsynthese zusätzliche Substrate verfügbar, was zu beachtlichen Anstiegen der extrahierten Olefinmengen auf das Dreifache führte. Bei 10 g/L Ammoniumchlorid wurden auch wenig präferierte Substrate umgesetzt und es kam zu Verschiebungen des Isomeren- und Kettenlängenspektrums. Die Möglichkeit zur weiteren Steigerung der Olefinproduktion bei noch höheren Stickstoff-Konzentrationen bleibt zu untersuchen. Zur Klärung welche transkriptionellen Regulationen durch das höhere Stickstoffangebot wirksam werden, ist eine vergleichende RNA-Sequenzierung sinnvoll. Um eine Veränderung des Olefinprofils bei nachfolgenden Experimenten zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Ammoniumchlorid-Konzentration von 5 g/L im Naylor-Medium weiterverwendet.

6.1.5. Die physiologische Rolle der Olefine für *M. luteus*

In dieser Arbeit konnten Daten generiert werden, die die Olefine als wesentlichen stabilisierenden Faktor für das Wachstum von *M. luteus* beschreiben, wozu auch die Feststellung der Lokalisation der Olefine in der Membran gehört. Sukovich *et al.* deutete für das 9fach ungesättigte C31-Olefin von *Shewanella sp.* bereits eine wachstumsstabilisierende Wirkung bei tiefen Temperaturen an [30]. Daher ist auch hier das beobachtete Wachstumsverhalten der *M. luteus*-Mutante trpE16 Δ ole:kan ohne Olefinproduktion im Vergleich zu *M. luteus* mit Olefinproduktion bei verschiedenen Temperaturen (Abbildung 20) von zentraler Bedeutung. Bei niedrigeren Temperaturen führte die fehlende Olefinproduktion zu geringeren Wachstumsraten, was durch fehlende Olefine als Membranbestandteil und die dadurch bedingte ungünstige Veränderung der Membranfluidität zu erklären ist. Denn es kommt im gleichen Temperaturbereich (Abbildung 21) nicht zu einer ausgleichenden Anpassung von Fettsäure- (Lipid-) mengen und -profil. Letztendlich führte das Fehlen der Olefine aber nur zu verzögertem Wachstum. Bei hohen Temperaturen führte die fehlende Olefinproduktion dagegen zum vorzeitigen Abfall der erreichten End-OD₆₀₀. Die Mutante zeigte im höheren Temperaturbereich auf Fettsäureebene in gewissem Umfang Kompensationsreaktionen (Abbildung 21).

Die Zellen der $\Delta ole:kan$ -Mutante zeigten eine deutlich höhere Fettsäurekonzentration mit verstärkter klassischer Anpassung des Fettsäureprofils der bakteriellen Membran [68], [90]–[92], also größeren Anteilen von längeren Fettsäuren. Diese Anpassungen der Lipidfettsäuren gleichen jedoch das Fehlen der Olefine nicht aus und können die Membranfluidität offenbar nicht regenerieren. Wird die Olefinproduktion bei verschiedenen Temperaturen betrachtet (Abbildung 25) so ist festzustellen, dass diese bei Inkubationstemperaturen von 30 °C und 37 °C doppelt so stark war wie bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen (20 °C), was andeutet, dass die stabilisierende Wirkung der Olefine vor allem bei hohen Temperaturen notwendig wird. Es ist fraglich, ob die beobachteten Verschiebungen von *aiai*- zu *isoiso*-Olefinen und von längeren zu kürzeren Olefinen bei 37 °C funktionsrelevant sind oder vielmehr eine Folgewirkung der Anpassung des Substratpools an die erhöhte Temperatur und des Abzugs von längeren Fettsäuren in die Lipide. Der stabilisierende Effekt der Olefine für die Membran ist vor allem in den vergleichsweise langen Kettenlängen und der *cis*-Konfiguration der Doppelbindung zu sehen, wobei Verschiebungen von C29- zu C27-Kettenlängen bei 37 °C keinen entscheidenden Einfluss haben sollten. Dass die stabilisierende Wirkung der Olefine nicht allein auf das Wachstum speziell bei hohen Temperaturen beschränkt ist, deutet der Vergleich der Olefinproduktion zwischen planktonisch und auf festen Nährboden gewachsenen Zellen an (Abbildung 23). Wenn die Unterschiede im Olefingehalt nicht auf unterschiedliche Wachstumsphasen zurückgehen, so kann angenommen werden, dass planktonische Zellen, die im Gegensatz zu auf einer Oberfläche wachsenden Zellen zusätzlichen mechanischen Kräften ausgesetzt sind, durch Olefine in der Membran weiter stabilisiert werden. Dies könnte eine Ursache für die deutlich gesteigerte Olefinproduktion sein und, wie bei der Caveolin-Expression, zur zusätzlichen Produktion von *aiai*-verzweigten C27-Olefinen geführt haben.

Eine weitere, allerdings momentan noch sehr spekulative mögliche Funktion der Olefine neben der als Stabilisierungselement könnte eine Steigerung der Hydrophobizität der Zellhülle darstellen. Dies könnte den Zellen zum einen aus dem planktonischen Wachstum heraus oder bei Verbreitung durch die Luft eine verbesserte Anhaftung an hydrophoben Oberflächen wie Tierhaut erlauben. Zum anderen wird auch die Interaktion der Zellen untereinander verstärkt und die wiederholt beobachtete Verklumpung von Zellen möglich, was eine Schutzstrategie zur Abschottung von toxischen Substanzen u.a. in den späteren Wachstumsphasen darstellen könnte.

6.2. Optimierung des Stoffwechsels von *M. luteus* zur Olefinproduktion

6.2.1. Ungezielte Optimierung der Olefinsynthese

In dieser Arbeit wurden 73 Transkriptions-Regulatoren, σ -Faktoren, Histidin-Kinasen und -Phosphatasen, die größtenteils in vorangegangenen Arbeiten systematisch unter Herstellung einzelner Mutanten ausgeschaltet worden waren, auf eine mögliche Beeinflussung der Fettsäure- und Olefinproduktion beim Wachstum in Naylor- und LB-Medium untersucht. Es konnten Regulatoren identifiziert werden, durch deren Aktivität die absolute Olefinproduktion in Naylor- oder LB-Medium deutlich verbessert wird. Andererseits war es möglich, Regulatoren auszumachen, die die Olefinproduktion im Naylor-Medium drastisch einschränken (4fache bis 8fache Steigerungen bei Ausschaltung). Das Ausschalten einzelner Regulatoren erlaubte Verschiebungen des Fettsäure- und/oder Olefinprofils im Naylor- und/oder im LB-Medium zwischen *iso*- und *ai*-Verzweigungen, zwischen verzweigten und unverzweigten Isomeren sowie zwischen kurzen und langen Kettenlängen (Abbildung 26-31). Zur weiteren Untersuchung, ob die Aktivität einzelner Regulatoren als Stellschraube für die Optimierung der Fettsäure- und Olefinsynthese genutzt werden kann, ist zum einen die Aufdeckung ihrer Zielgene und regulierten Stoffwechselwege durch RNA-Sequenzierung und zum anderen der Ausschluss von Wachstumsdefiziten erforderlich.

Die Sequenzierung von RNA-Proben der Deletions-Mutante von Mlut_07330 im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 wurde nach Wachstum auf LB-Medium bereits durchgeführt. Die Deletions-Mutante von Mlut_07330 wies vor allem nach Anzucht in Naylor-Medium vergleichsweise große Mengen extrahierter Fettsäuren und Olefine auf. Allerdings wurde in Naylor-Medium gleichzeitig eine starke Einschränkung des Wachstums (End-OD₆₀₀) und starke Zellaggregation beobachtet. Die RNA-Sequenzierung war daher nur mit LB-gewachsenen Zellen möglich (Abbildung 33) und ergab genomweite Änderungen der Transkription nahezu aller Stoffwechselkategorien (COG-Kategorien). Zusammenfassend liefern diese Beobachtungen das Bild, das auch durch die zugeordnete Regulatorfamilie LexA vermittelt wird. Regulatoren der LexA-Familie wirken typischerweise als Repressor auf eine SOS-Antwort in Folge von DNA-Schäden. Die Deletion des Regulators könnte also zu einer SOS-Antwort in *M. luteus* führen. Eine SOS-Antwort beinhaltet u.a. einen Zellzyklus-Arrest, was die Wachstumseinschränkung in Naylor-Medium erklären könnte. Die Steigerungen der Fettsäure- und Olefinmengen wären demnach nur Randerscheinungen und die Nutzung des Regulators zur Optimierung der Olefinproduktion schwierig. Außerdem wurde das eventuelle Vorliegen und die molekularen Mechanismen einer SOS-Antwort in der Mlut_07330 Deletions-Mutante von *M. luteus* noch nicht weiter untersucht.

Auch für die Deletions-Mutante von Mlut_02880 wurde eine Sequenzierung von RNA-Proben aus einer LB-Kultur durchgeführt (Abbildung 32). Dieses Regulatorgen war deshalb interessant, weil seine Ausschaltung zu starken Verschiebungen des Fettsäure- und Olefinprofils von *ai*- zu *iso*-Verzweigungen führte und sich der ORF im Genom benachbart zu einem putativen Gencluster für Isoleucin- und Valin-Abbau befindet. Der davon codierte Aminosäureabbau lieferte die Acyl-CoA-Primer der Fettsäuresynthese für geradzahlige *iso*-verzweigte und ungeradzahlige *ai*-verzweigte Fettsäuren. Die Deletions-Mutante hatte keine ersichtlichen Wachstumsdefizite in LB- und Naylor-Medium. Die RNA-Sequenzierung offenbarte die gezielte Induktion des umliegenden Aminosäureabbau-Genclusters Mlut_02820-02900 und zusätzlich des putativen β -Oxidations-Genclusters Mlut_19540-19570 (Abbildung 73).

Somit erlaubte die Inaktivierung dieses Regulators die Identifizierung der Aminosäureabbau- und β -Oxidations-Gencluster als zwei essentielle Bausteine der Olefinproduktion in *M. luteus*. Außerdem konnte die gezielte Induktion von β -Oxidation und Aminosäureabbau im Laufe dieser Arbeit als Werkzeug genutzt werden, um Genkandidaten der β -Oxidation und des Aminosäureabbaus, deren Transkription ansonsten reprimiert ist, identifizierende Phänotypen zu entlocken.

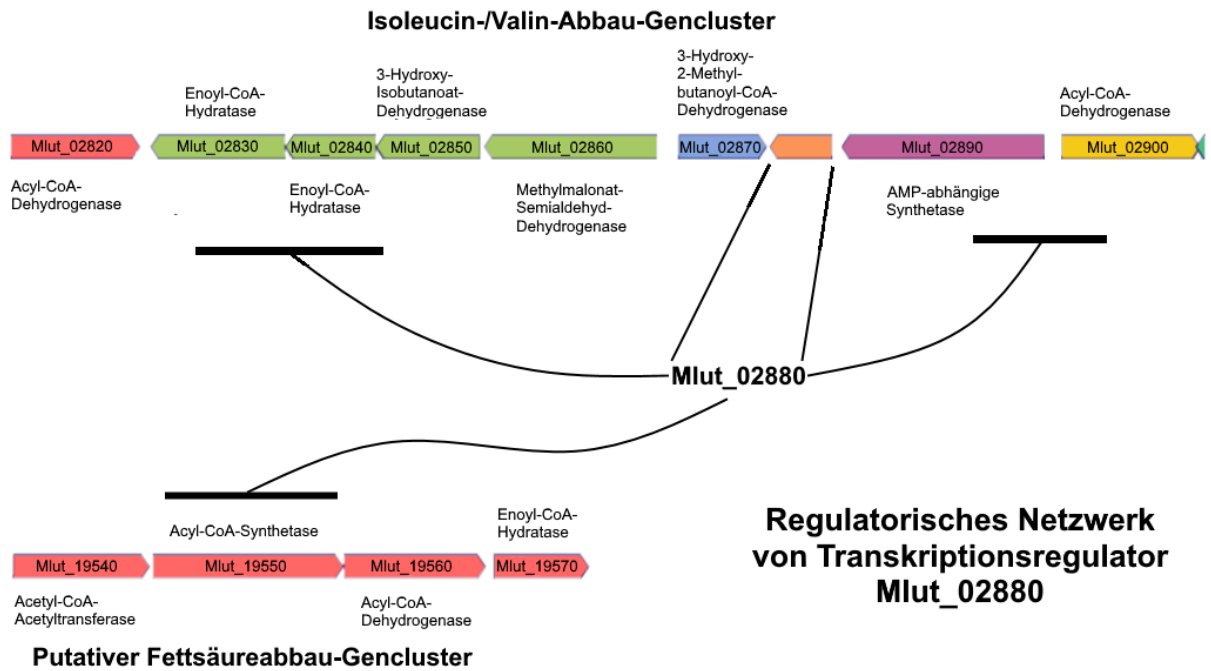


Abbildung 73: Übersicht der Zielgene des Transkriptionsregulators Mlut_02880.

6.2.2. Gezielte Optimierung der Olefinsynthese durch Überexpression der *OleABCD*-Enzyme

Der erste Gedanke bei der gezielten Optimierung der Olefinsynthese ist die gesteigerte Verfügbarkeit der katalysierenden Enzyme OleABCD. Der native Promotor wurde gegen den von Pereira *et al.* (2012) als stark befundenen Promotor der Succinat-Dehydrogenase (Mlut_04850) ersetzt. Daraus resultierte eine 11fach erhöhte Transkription im LB-Medium (Abbildung 34), aber nur eine Steigerung der Olefinproduktion auf das 3- bzw. 4-Fache im Naylor- bzw. im LB-Medium (Abbildung 35). Mit der Steigerung der absoluten Olefinmenge gingen in beiden Medien Verschiebungen von *ai*-verzweigten zu *iso*- oder unverzweigten Olefinen bzw. von C29-Kettenlängen i.d.R. zu kürzeren Kettenlängen (C30-Kettenlänge entspricht vor allem unverzweigten Olefinen) einher. Die Ursache hierfür ist vermutlich die Limitierung der bevorzugten C15 *ai*-Acyl-CoAs, was die Ole-Enzyme zwingt auch weniger präferierte Substrate umzusetzen. Durch eigene RNA-Sequenzierungsergebnisse in LB- und Naylor-Medium (Tabelle 42 im Anhang 9.3.) stehen auch deutlich stärkere testbare Promotoren zur Verfügung. Es ist jedoch fraglich, ob eine weitere Steigerung der Menge der *ole*-mRNA und damit einhergehend der Menge an synthetisierten Enzymen bei eindeutigen Anzeichen für Substratlimitierungen eine entscheidende Verbesserung der Olefinproduktion bringen kann.

6.2.3. Gezielte Optimierung der Olefinsynthese durch Manipulation der Substrat-Stoffwechsel

Abbildung 74 zeigt eine Übersicht über die Verknüpfung des Abbaus verzweigter Aminosäuren und des Fettsäure-Stoffwechsels zur Olefinsynthese. Des Weiteren sind darin die in dieser Arbeit erfolgreich als für eine Reaktion codierend identifizierten Gene, identifizierte Regulationsmechanismen, zusätzliche Reaktionswege und in Naylor- sowie LB-Medium zur Optimierung der Olefinsynthese angewandte Mutationskombinationen vermerkt. Dies soll die Diskussion der nachfolgend besprochenen Geno- und Phänotypen unterstützen.

Aminosäure- und Fettsäure-Stoffwechsel und deren Verknüpfung zur Olefinsynthese

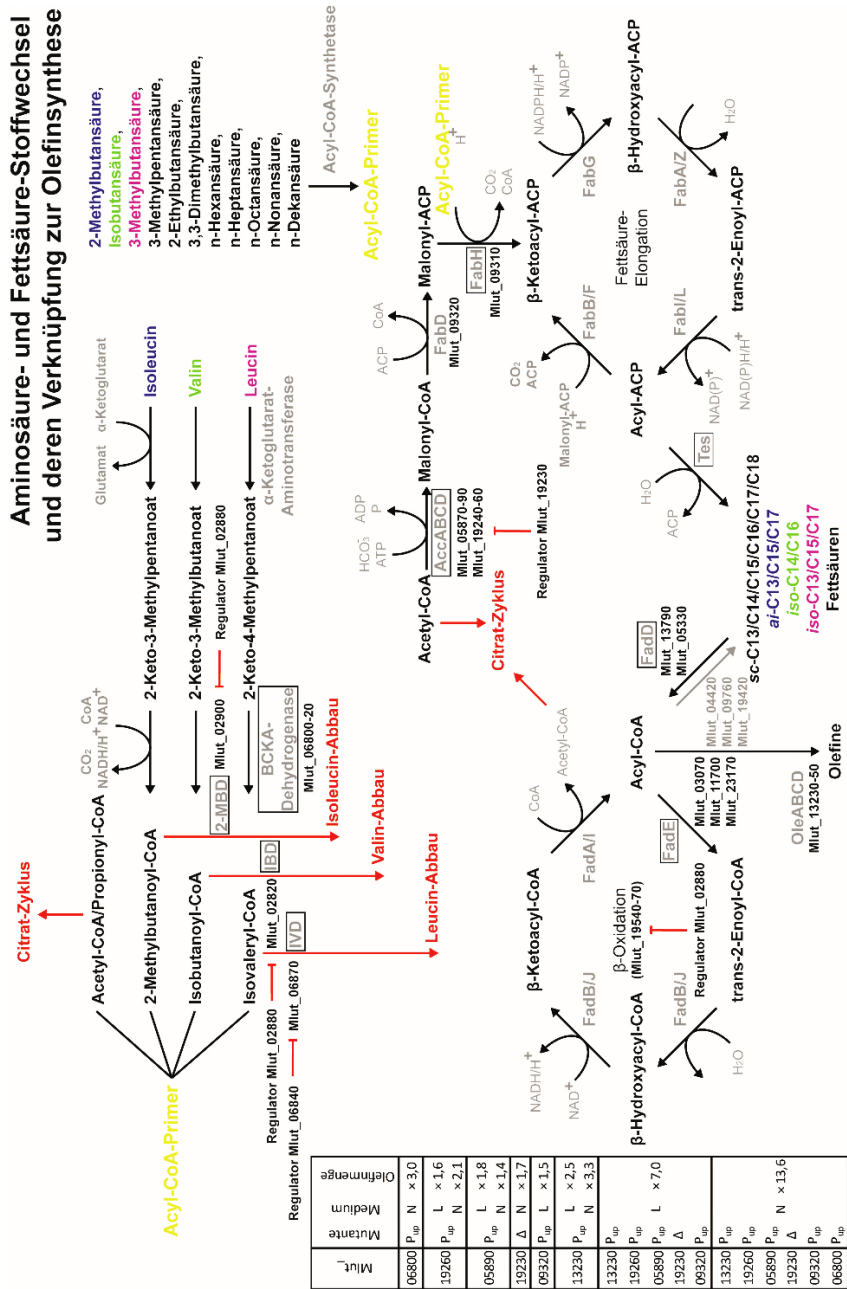


Abbildung 74: Erweiterte Übersicht der relevanten Stoffwechselwege für Substrate der Olefinsynthese. Diese besteht aus dem Anfang des Abbaus der verzweigten Aminosäuren (Isoleucin, Valin und Leucin) und dem Fettsäure-Stoffwechsel. Darin sind in Kästen alle im Folgenden untersuchten Schlüsselreaktionen für die Olefinsynthese hervorgehoben. Rot markiert sind mögliche Kohlenstoffverluste für die Olefinsynthese. Welche verzweigte Aminosäure Grundlage für welche Art von Fettsäuren ist, ist durch gleiche Einfärbung hervorgehoben. Die Erweiterung zur Übersicht im Ergebnisabschnitt beinhaltet den Vermerk von Genen und Genclustern, die erfolgreich als für eine bestimmte Reaktion des Aminosäureabbaus oder des Fettsäurestoffwechsels codierend identifiziert werden konnten sowie aufgedeckte Regulationsmechanismen und die direkte Aktivierung freier kurzketziger Fettsäuren zu Acyl-CoA-Primern. Abkürzungen: IVD, Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase; IBD, Isobutyryl-CoA-Dehydrogenase; 2-MBD, 2-Methylbutyryl-CoA-Dehydrogenase; Acc, Acetyl-CoA-Carboxylase; FabD, Malonyl-CoA-Acyl-Carrier-Protein Transacylase; FabH, β-Methylbutyryl-CoA-Dehydrogenase; Acc, Acetyl-CoA-Carboxylase; FabI/L, Enoyl-Reduktase; FabB/F, β-Ketoacyl-Synthase I/II; FadD, Acyl-CoA-Ketoacyl-Synthase III; FabG, β-Ketoacyl-Reduktase; FabA/Z, β-Hydroxyacyl-Dehydratase; FabI/L, Enoyl-Reduktase; FabB/F, β-Ketoacyl-Synthase I/II; FadD, Acyl-CoA-Synthetase; FadE, Acyl-CoA-Dehydrogenase; FadB/J, β-Hydroxyacyl-Dehydrogenase; FadA/I, β-Ketoacyl-Thiolase; Tes, Acyl-ACP-Thioesterase; FadR, Transkriptioneller Regulator des Fettsäurestoffwechsels; FabR, Transkriptioneller Regulator der ungesättigten Fettsäure-Biosynthese; Ole, Olefine synthetisierende Enzyme, Pup, Überexpressions-Mutante; Δ, Gendeletion; L, LB-Medium; N, Naylor-Medium.

6.2.3.1. Die Reaktion der Acetyl-CoA-Carboxylase (AccABCD)

Im Genom von *M. luteus* konnten zwei Gencluster Mlut_05870-90 und Mlut_19230-60 identifiziert werden, welche die einzigen Kandidaten für die Codierung der Acetyl-CoA-Carboxyltransferase (AccAD) bzw. der Acetyl-CoA/Biotin-Carboxylase (AccBC) darstellen. Das Gencluster Mlut_19230-60 enthält außerdem das Gen für einen Regulator, dessen Rolle für die Olefinproduktion nicht bereits im Abschnitt „5.2.1. Ungezielte Optimierung der Olefinsynthese“ besprochen wurde. Die Insertion des von Pereira *et al.* (2012) als stark befundenen Promotors von Mlut_04850 vor Gencluster Mlut_05870-90 führt in LB-Medium zu einer messbaren Steigerung der Transkription (Abbildung 37) und zu im Schnitt 84 % mehr (LB-Medium) bzw. 43 % mehr (Naylor-Medium) Olefinen (Abbildung 38). Im Fall des Genclusters Mlut_19230-60 führte die Promotorinsertion zu einer deutlich erhöhten Transkription im LB-Medium und in der Konsequenz zu Steigerungen der Olefinproduktion im LB-Medium um 56 %, im Naylor-Medium sogar um 116 %. Auch die Deletion des Regulators Mlut_19230 führte im Naylor-Medium zur Steigerung der Olefinproduktion um 68 %, dieser wirkt somit als Repressor auf das Gencluster Mlut_19240-60. Zusätzlich bleibt festzuhalten, dass die Manipulation der Aktivität des Genclusters Mlut_19230-60 im Naylor-Medium zu größeren Anteilen *ai*-verzweigter Fettsäuren und Olefine führt. Die Steigerung der Aktivität der *accABCD*-Gencluster, aber vor allem des *accBC*-Genclusters, hob im Naylor-Medium die beobachtete Substratlimitierung für die Olefinsynthese in Teilen auf. Dass allerdings die Steigerung der Olefinproduktion im LB-Medium geringer ausfiel und ein deutlicher Rückgang der extrahierten Fettsäuremenge beobachtet werden konnte, deutet an, dass die Fettsäurebiosynthese zumindest bei Wachstum in LB-Medium stark reguliert ist und die genetischen Eingriffe zu starken Gegensteuerungen führen.

Die alleinige Kombination aller hier vorgestellten genetischen Eingriffe bezüglich der Aktivität der *accABCD*-Gencluster führten im genetischen Hintergrund von *trpE16* ope auch unter Verwendung von laut eigenen RNA-Sequenzierungsergebnissen noch stärkeren Promotoren im LB- wie im Naylor-Medium nicht zu den entscheidenden Verbesserungen der Olefinproduktion (Abbildungen 57, 59 und 60). Somit konnte hier gezeigt werden, dass die Reaktion der Acetyl-CoA-Carboxylase zwar eine Stellschraube der Fettsäure- und Olefinsynthese in *M. luteus* darstellt, dass aber ihre alleinige Manipulation nur eine limitierte Wirkung auf die Olefinproduktion hat.

6.2.3.2. Die Reaktion der β -Ketoacyl-Synthase III (FabH)

Als einziger Genkandidat für die Reaktion der β -Ketoacyl-Synthase III konnte Mlut_09310 im Genom von *M. luteus* identifiziert werden, was auch in der Literatur bereits so beschrieben ist [29], [70]. Das Gen ist Teil eines Clusters mit Mlut_09320, einziger codierender Kandidat für die der FabH-Reaktion vorangeschaltete Reaktion der Malonyl-CoA:ACP-Transacylase (FabD). Der Austausch des nativen Promotors (RPKM-Wert LB = 73 /Naylor = 66) gegen den laut eigenen RNA-Sequenzierungsergebnissen starken Promotor von Mlut_16550 (RPKM-Wert LB = 2563 /Naylor = 1219) führte im LB-Medium zu einer 5,7fachen Steigerung der Transkription (Abbildung 39).

Im LB-Medium führt die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen der FabH-Reaktion, der Einführung neuer Acyl-CoA-Primer in die Fettsäure-Elongation, und der *AccABCD*-Reaktion, der Generierung neuer Malonyl-CoAs, die in der Folge zu Malonyl-ACP-Verlängerungseinheiten der Fettsäure-Elongation umgesetzt werden, zu mehr aber kürzeren Acyl-CoA-Substraten für die Olefinsynthese. Die gesteigerte Konzentration der *OleABCD*-Enzyme im *trpE16* ope-Hintergrund kann diese offenbar zu nochmal 50 % mehr Olefinen umsetzen, wobei es zu einer deutlichen Verschiebung des Kettenlängenprofils kommt (Abbildung 40). Eine derartige Verschiebung des Kettenlängenprofils konnte auch in *E. coli* bei Überexpression des *fabH*-Gens beobachtet werden [41]. Bei der kombinierten Induktion der *Acc*- und der FabH-Reaktion (Abbildung 57 und 60) wird die Limitierung der Malonyl-ACP-Verlängerungseinheiten aufgehoben und es kommt im LB-Medium nicht zu einer Verschiebung der produzierten Fettsäure-Kettenlängen.

Durch das Mehr an Acyl-CoA-Substraten bevorzugter Kettenlänge, kann die Olefinproduktion im Vergleich zu *trpE16 ope* nochmal um das 2,8-Fache gesteigert werden.

Im Naylor-Medium war zumindest das *accBC*-Gencluster laut eigenen RNA-Sequenzierungsergebnissen (Daten nicht gezeigt) stärker induziert, womit das Ungleichgewicht zwischen *Acc*- und *FabH*-Reaktion geringer ausfällt als im LB-Medium und keine Verschiebungen zu kürzeren Kettenlängen stattfand (Abbildung 40C). Allerdings führt die Induktion der *FabH*-Reaktion zu vermehrter Einbringung von unverzweigten Acyl-CoA-Primern in die Fettsäure-Elongation, da *FabH*-Enzyme Gram-positiver Bakterien verzweigte wie unverzweigte Acyl-CoA-Primer umsetzen [70] [89], und zu deren Verlängerung zu potenziellen Acyl-CoA-Substraten für die Olefinsynthese. Diese von den *OleABCD*-Enzymen nicht bevorzugten Substrate werden äußerst ineffizient umgesetzt und die Verfügbarkeit von geeigneten verzweigten Acyl-CoA-Substraten nimmt ab, da die Elongation zusätzlicher unverzweigter Acyl-CoA-Primer Malonyl-ACPs auf Kosten der Elongation verzweigter Acyl-CoA-Primer verbraucht. Dies sorgt für den Einbruch der Olefinproduktion sowie eine Verschiebung der Olefin-Isomeren zu unverzweigten Olefinen. Bei kombinierter Induktion von *Acc*- und *FabH*-Reaktion (siehe Abbildung 57 und 59) tritt dagegen offenbar kein Überschuss von unverzweigten Acyl-CoA-Substraten auf, da vermutlich ausreichend Malonyl-ACP-Verlängerungseinheiten auch für die Elongation verzweigter Acyl-CoA-Primer bereitstehen. Die Olefinproduktion bricht nicht ein und es werden wieder mehr *ai*-verzweigte Olefine gebildet.

Eine Mutante von *M. luteus* mit gesteigerter Aktivität der *FabH*-Reaktion (*trpE16 ope* *P_{up}09320:kan*) kann im Naylor-Medium zugesetzte kurzkettige verzweigte Carbonsäuren, die aufgenommen und zu verzweigten Acyl-CoA-Primern aktiviert werden, deutlich gewinnbringender in Steigerungen der Olefinmenge umsetzen als der entsprechende Ausgangsstamm (Abbildung 58). Somit stellt die *FabH*-Reaktion nicht nur für unverzweigte Acyl-CoA-Primer sondern, bei ausreichender Bereitstellung aus dem Abbau verzweigter Aminosäuren, auch für verzweigte Acyl-CoA-Primer eine entscheidende Limitierung dar.

6.2.3.3. Der Abbau der verzweigten Aminosäuren: Isoleucin, Leucin und Valin

Der Abbau der verzweigten Aminosäuren ist für die Olefinsynthese in *M. luteus* von zentraler Bedeutung, da er die verzweigten Acyl-CoA-Primer (2-Methylbutanoyl-CoA, Isobutanoyl-CoA und Isovaleryl-CoA) für die Synthese verzweigter Fettsäuren bereitstellt.

Eine der hier untersuchten Reaktionen ist die der BCKA-Dehydrogenase (Abbildung 41 und 74), die die α -Ketosäuren 2-Keto-3-Methylpentansäure, 2-Keto-4-Methylpentansäure und 2-Keto-3-Methylbutansäure zu verzweigten Acyl-CoA-Primern für die Fettsäuresynthese umsetzt. Durch Homologie-Suchen konnten in der *M. luteus* Genomsequenz zwei potentiell dafür codierende Kandidaten-Gencluster, Mlut_06800-06820 und Mlut_17790-17810, gefunden werden. Promotoraustausch-Mutanten zeigten gesteigerte Transkription für beide Gencluster (Abbildung 42A), was allerdings nur im Fall von Mlut_06800-06820 zur Steigerung der extrahierten Olefinmenge nach Wachstum in Naylor-Medium um etwa 200 % führte (Abbildung 42B und Abbildung 57). In LB-Medium konnte dagegen keine Steigerung der Olefinsynthese beobachtet werden (Abbildung 57). Somit bestätigt sich, dass der Mangel verzweigter Acyl-CoA-Primer für die Fettsäuresynthese eine Limitierung der Olefinsynthese darstellt, die durch gesteigerte Expression der die BCKA-Dehydrogenase codierenden Gene Mlut_06800-06820 aufgehoben werden kann. Dass der Gencluster Mlut_06800-06820 die BCKA-Dehydrogenase codiert, wurde auch durch andere Befunde bestätigt. In der Mlut_06800-06820 Deletions-Mutante war die Synthese verzweigter Fettsäuren sowie die Olefinsynthese, aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit verzweigter Acyl-CoA-Primer für die Fettsäuresynthese, stark eingeschränkt. Mit dem Rückgang der verzweigten Fettsäuresynthese (20 % verzweigte Fettsäuren, 80 % unverzweigte Fettsäuren) (Abbildung 43A) geht in Naylor-Medium eine Hemmung des Wachstums einher (Abbildung 43C). Die dramatischen Veränderungen in der Fettsäure-Zusammensetzung und der Überschuss von unverzweigten Fettsäuren erreichen im Naylor-Medium möglicherweise ein kritisches Level. Die Notwendigkeit einer minimalen Konzentration von verzweigten Fettsäuren in der Membran Gram-positiver Bakterien wurde für *B. subtilis* demonstriert [93].

Verzweigte Fettsäuren in Gram-positiven Bakterien sowie ungesättigte unverzweigte Fettsäuren in Gram-negativen Bakterien, die in die Membranlipide eingebaut werden, tragen aufgrund ihrer geringen Phasenübergangs-Temperatur zu einer erhöhten Membranfluidität bei [68]. Es scheint, dass im Fall der BCKA-Dehydrogenase-Deletions-Mutante im Minimal-Medium der Anteil der verzweigten Fettsäuren in den Membranlipiden soweit reduziert ist, dass die Zellteilung durch mangelnde Membranfluidität gehemmt ist.

In LB-Medium resultierte die Deletion der BCKA-Dehydrogenase in einer Reduktion verzweigter Fettsäuren auf lediglich 40% und einer verzögerten exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 43B und 43D). Die Supplementierung des Mediums mit einer von drei verzweigten Aminosäuren führte nur beim Ausgangsstamm zu entsprechenden Änderungen der Fettsäure-Isomeren-Verteilung, aber nicht bei der BCKA-Dehydrogenase-Mutante (Abbildung 44A). Eine in dieser Mutante beobachtete geringe Produktion verzweigter Fettsäuren stellt mutmaßlich das Ergebnis der unspezifischen Aktivität des Pyruvat-/2-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes dar. Die reduzierte Fettsäuresynthese und die gleichzeitige Verschiebung zu größeren Anteilen von unverzweigten Fettsäuren in Abwesenheit des BCKA-Dehydrogenase-Komplexes deutet an, dass unter diesen Umständen vor allem Acetyl-CoA und Propionyl-CoA als Acyl-CoA-Primer der Fettsäuresynthese dienen und dass die FabH-Reaktion bei Gram-positiven Bakterien sowohl verzweigte als auch unverzweigte Acyl-CoA-Primer in die Elongation einbringen kann [70], [89].

Es konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass in der BCKA-Dehydrogenase-Mutante eine alternative Route zur Synthese verzweigter Fettsäure-Primer-Moleküle in Form von Acyl-CoA-Synthetasen mit Spezifität für kurzkettige verzweigte Carbonsäuren aktiv ist. Kurzkettige verzweigte Carbonsäuren 2-Methylbutansäure, Isobutansäure und 3-Methylbutansäure, die dem Medium zugefügt werden, werden scheinbar direkt zu den entsprechenden Acyl-CoA-Primern 2-Methylbutanoyl-CoA, Isobutanoyl-CoA und Isovaleryl-CoA umgesetzt und erlauben so die Synthese korrespondierender verzweigter Fettsäuren und Olefine in der BCKA-Dehydrogenase-Mutante von *M. luteus* (Abbildung 44B). Dies wurde auch bereits für eine entsprechende Mutante in *Bacillus subtilis* gezeigt [93].

Acyl-CoA-Dehydrogenasen mit Spezifität für kurzkettige verzweigte Acyl-CoAs konkurrieren mit der Fettsäurebiosynthese um die durch den allgemeinen Abbauweg der verzweigten Aminosäuren bereitgestellten Substrate (Abbildung 41). Unter den im Genom von *M. luteus* codierten Acyl-CoA-Dehydrogenasen enthalten nur zwei, welche durch die ORFs Mlut_02820 und Mlut_06870 codiert werden, typische Domänen der Spezifität für kurzkettige Substrate, während in *Bacillus subtilis* scheinbar drei verschiedene Enzyme mit solchen typischen Domänen die Oxidation der von Isoleucin, Leucin und Valin abgeleiteten Acyl-CoAs katalysieren [71].

Bei Mlut_02820 und Mlut_02900 handelt es sich um ORFs innerhalb eines Genclusters Mlut_02820-02900, der fast alle Aktivitäten des Valin- und Isoleucin-Abbaus codiert. Die Mlut_02820 und Mlut_02900 Deletions-Mutanten waren, wie der Ausgangsstamm, zum Wachstum auf Leucin als einzige Stickstoffquelle fähig, was demonstriert, dass diese Enzyme keine entscheidende Rolle im Leucin-Abbau spielen (Daten nicht gezeigt). Die einzelne Deletion von Mlut_02820 oder Mlut_02900 hatte nur bei gleichzeitiger Supplementierung von Valin Einfluss auf das produzierte Fettsäure- bzw. Olefinprofil. Der Zusatz von Valin induzierte gleichzeitig den Valin- und Isoleucin-Abbau, der im selben Gencluster codiert ist, was im Ausgangsstamm zu weniger *aiai*- und mehr *isoiso*-Olefinen führte. Dies war in den Mlut_02820 und Mlut_02900 Deletions-Mutanten nicht der Fall, wo ein höherer Grad von *isoai* und *aiai*-Olefinsynthese stattfand. Dies weist beiden Dehydrogenasen Aktivität im Isoleucin-Abbau zu. In einem stillgelegten Zustand des Genclusters Mlut_02820-02900 haben die einzelnen Deletionen von Mlut_02820 und Mlut_02900 keinen weiteren Effekt auf die Fettsäuresynthese. Allerdings erlaubte die zusätzliche Deletion von Mlut_02820 oder Mlut_02900 in der Deletions-Mutante trpE16 ope Δ 02880:hyg mit induziertem Isoleucin- und Valin-Abbau die Wiederherstellung der von Isoleucin und Valin abgeleiteten Fettsäure- und Olefinproduktion (Abbildung 46 und 47). Aufgrund der hohen Aminosäuresequenz-Identität mit der gut charakterisierten humanen Isobutanoyl-CoA-Dehydrogenase [76] ist anzunehmen, dass die Spezifität der von Mlut_02820 codierten Dehydrogenase eher dem Valin-Abbau gilt (Abbildung 45). Die durch Mlut_02900 codierte Dehydrogenase kann nur aufgrund des Fehlens von Leucin- und Valin-spezifischen Domänen eher dem Isoleucin-Abbau zugeordnet werden.

Zusammenfassend lassen die beobachteten Phänotypen der Fettsäure- und Olefinproduktion für die durch Mlut_02820 und Mlut_02900 codierten Dehydrogenasen jedoch keine klare Trennung zwischen ihrer Aktivität im Valin- oder Isoleucin-Abbau zu. Aufgrund der Lage und Orientierung der Gene Mlut_02820 und Mlut_02900 zueinander können polare Effekte der co-linearen Insertion der Kanamycin-Kassette jeweils auf beide Dehydrogenase-Gene ausgeschlossen werden. Da die Möglichkeit besteht, dass die Acyl-CoA-Dehydrogenasen von *M. luteus* Kreuzreaktivität für mehr als ein Substrat besitzen, erfordert die genaue Funktionszuordnung der Genprodukte von Mlut_02820 und Mlut_02900 weitere Klärung durch Enzym-Aufreinigung und detaillierte biochemische Charakterisierung. Der dritte für eine Acyl-CoA-Dehydrogenase codierende Genkandidat Mlut_06870 ist Teil des Genclusters Mlut_06840-06890, der Gene für die meisten für den Leucin-Abbau notwendigen Aktivitäten enthält (Abbildung 41). Das Genprodukt zeigt höhere Aminosäure-Sequenzidentität mit einer Dehydrogenase von *S. avermitilis*, für die eine breite Spezifität für kurzkettige unterschiedlich verzweigte Acyl-CoA-Substrate nachgewiesen wurde [80], als mit der gut charakterisierten humanen Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase [79]. Im *in vitro* DCPIP-Assay zeigte der Rohextrakt der Mlut_06870 Deletions-Mutante Aktivitätsverlust gegenüber dem Isovaleryl-CoA-Substrat. Die Wachstumsstudien mit supplementierten Aminosäuren als einzige Stickstoffquelle zeigten einen Wachstumsdefekt der Mlut_06870 Deletions-Mutante auf Leucin im Vergleich zum Ausgangsstamm (Abbildung 49). Außerdem führte die Deletion von Mlut_06870 und die mutmaßlich resultierende erhöhte Konzentration von Isovaleryl-CoA zu größeren Anteilen der ungeradzahligen *iso*-verzweigten Fettsäuren, bei denen es sich um Leucin-Derivate handelt (Abbildung 46), und in Konsequenz zu höheren Anteilen von Olefinen mit *iso*-Verzweigung (Abbildung 47). Die Spezifität der durch Mlut_06870 codierten Dehydrogenase für Isovaleryl-CoA konnte auf Olefin-Ebene durch die Supplementierung mit Leucin weiter bestätigt werden. Dies führte zu größeren Anteilen von *isoiso*-Olefinen in der Deletions-Mutante als im Ausgangsstamm (Abbildung 47). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die von Mlut_06870 codierte Dehydrogenase im Leucin-Abbau aktiv ist und damit eine wichtige Komponente der *ai*-Isomer-dominierten Fettsäure- und Olefinproduktion in *M. luteus* darstellt.

Der Regulator Mlut_06840, der nicht bereits unter den Regulatoren im Abschnitt „5.2.1. Ungezielte Optimierung der Olefinsynthese“ besprochen wurde, ist ein Repressor des Leucin-Abbaucusters Mlut_06850-06890 und seine Deletion resultierte im Naylor-Medium nicht nur in einem Rückgang der von Leucin sondern auch von Isoleucin und Valin abgeleiteten Fettsäure- und Olefinproduktion (Abbildung 46 und 47). Dies impliziert, dass die Regulation durch das Genprodukt von Mlut_06840 nicht auf den Gencluster Mlut_06850-06890 limitiert ist. Im LB-Medium führte die Deletion von Mlut_06840 zur Induktion des Leucin-Abbaus und zu geringerer Produktion von *iso*-verzweigten Fettsäuren, was einen höheren Durchfluss von Isoleucin-Derivaten und einen Anstieg der *aiai*-Olefinproduktion erlaubte.

Zwar konnte hier ein größeres Verständnis um die Aktivität des Regulators Mlut_06840 generiert werden, jedoch kann dieser aufgrund unbekannter zusätzlicher Regulationsziele derzeit nicht als Regulationsschraube für die Manipulation der Verfügbarkeit verzweigter Fettsäure-Primer verwendet werden. Eine Sequenzierung von RNA-Proben der Regulator-Deletions-Mutante im Vergleich zum Ausgangsstamm bietet sich an, um alle Zielgene des Regulators zu identifizieren.

Insgesamt konnten mit den Genregionen Mlut_06800-06890 und Mlut_02820-02900, die die Gene für die BCKA-Dehydrogenase, den Leucin-Abbau und mutmaßlich den Isoleucin-/Valin-Abbau enthalten, Abschnitte des Genoms von *M. luteus* identifiziert und annotiert werden, die entscheidende Bedeutung für den Abbau verzweigter Aminosäuren besitzen. Zusätzlich konnte der Einfluss dieser Abbauewege auf die absolute Produktion und Isomeren-Zusammensetzung der Fettsäure- und Olefinsynthese herausgestellt werden.

6.2.3.4. Die Reaktion der Acyl-ACP-Thioesterase (Tes)

Zur *in silico*-Suche nach möglichen Genkandidaten für Acyl-ACP-Thioesterasen in *M. luteus* wurden zunächst die gut charakterisierten Thioesterasen TesA und TesB von *Escherichia coli* herangezogen [94], [95]. Beiden Enzymen werden Aktivität gegenüber Acyl-ACP- aber auch Acyl-CoA-Substraten bescheinigt, wobei TesA auf Aminosäuresequenzebene nur allgemeine Thioesterase-, Hydrolase- und Phospholipase-Domänen aufweist, TesB dagegen Acyl-CoA-Thioesterase-Domänen.

Die Homologie-Suche mit TesA lieferte in *M. luteus* keinen Treffer, aber mit TesB konnte Mlut_09760 als einziges Ortholog mit eindeutigen Acyl-CoA-Thioesterase-Domänen gefunden werden. Durch Homologie-Suche mit weiteren charakterisierten pflanzlichen und bakteriellen Acyl-ACP-Thioesterasen [40] konnten die Genprodukte von Mlut_07570, Mlut_19420 und Mlut_22730 mit allgemeinen Thioesterase- und Hydrolase-Domänen sowie von Mlut_04420 und Mlut_22190 mit eindeutigen Acyl-CoA-Thioesterase-Domänen gefunden werden (Tabelle 37). Eine Olefinextraktion der entsprechenden Deletions-Mutanten im genomischen Hintergrund von *M. luteus* trpE16 ergab nach Wachstum in LB-Medium für die Mutante von Mlut_04420 und Mlut_09760 nach Wachstum in Naylor-Medium für die Mutante von Mlut_09760 und Mlut_19420 erhöhte Olefinmengen (Abbildung 50A). Die Deletion einer Acyl-ACP-Thioesterase sollte zur Hemmung der Fettsäurebiosynthese durch die Anhäufung von Acyl-ACPs führen und damit auch zur nachhaltigen Hemmung der Olefinsynthese. Die eben erwähnte Steigerung der Olefinproduktion in bestimmten Thioesterase-Mutanten resultiert vermutlich aus der Vergrößerung des Acyl-CoA-Substratpools für die Olefinsynthese durch die Ausschaltung von Thioesterasen mit Aktivität gegenüber Acyl-CoAs. Die weitere Analyse der produzierten Fettsäure- und Olefin-Kettenlängen liefert für die Deletions-Mutante von Mlut_04420 zusätzliche leichte Verschiebungen von C15- zu C16-Fettsäuren und längeren Olefinen, was auf eine Spezifität der codierten Thioesterase für C15 bzw. C16-Kettenlängen von Acyl-CoAs oder -ACPs hinweist (Abbildung 50B und 50C). Die beobachteten Phänotypen im genomischen Hintergrund von trpE16 waren in trpE16 ope mit größerer Zahl an OleABCD-Enzymen nicht mehr zu beobachten (nicht gezeigt), da hier die Aktivität der Thioesterasen aufgrund des stärkeren Abzugs von Acyl-CoAs in die Olefinsynthese nicht mehr zum Tragen kommt. Zusammenfassend konnten drei Gene für Thioesterasen in *M. luteus* identifiziert werden, die im LB- und/oder im Naylor-Medium vor allem gegenüber Acyl-CoAs aktiv sind.

Da im Genom von *M. luteus* bislang keine eigenen Acyl-ACP-Thioesterasen identifiziert werden konnten, wurde die Wirkung heterologer bakterieller und pflanzlicher Acyl-ACP-Thioesterasen [40] nach Klonierung ins Genom von *M. luteus* unter Kontrolle eines starken Promotors untersucht. Es wurden Thioesterasen gewählt, deren Spezifität mehrheitlich deutlich kürzeren Acyl-ACPs gilt als das Fettsäure-Kettenlängenprofil, das in *M. luteus* beobachtet werden kann. Die Analyse der Olefinproduktion (Abbildung 51) zeigt für die pflanzliche Thioesterase von *Cuphea palustris* mit angegebener Spezifität für unverzweigte C4-Alkyl-Ketten eine deutliche Hemmung (etwa Halbierung) der Olefinsynthese im Naylor-Medium sowie Verschiebungen von unverzweigten zu vor allem *ai*-verzweigten und von kürzeren zu längeren Olefinen. Es scheint, dass diese Acyl-ACP-Thioesterase unverzweigte Acyl-ACPs in der Fettsäurebiosynthese vorzeitig spaltet und dass diese kurzkettigen Fettsäuren als Substrat für Olefinsynthese ausfallen. Gleichzeitig könnte diese Aktivität jedoch jegliche negative Regulation der Fettsäurebiosynthese durch Anhäufung von Acyl-ACPs aufheben [37] und bevorzugte *ai*-verzweigte C15-Fettsäuren könnten in höherem Durchsatz produziert und in Olefine eingebaut werden. Eine Erklärung durch Aktivität des Enzyms von *Cuphea palustris* als Acyl-CoA-Thioesterase, bei der vor allem die unverzweigten Acyl-CoAs sofort zu freien Fettsäuren hydrolysiert werden und so für die Olefinsynthese ausfallen, wäre auch denkbar, allerdings spricht die unpassende Kettenlängenspezifität sowie die zuvor beschriebene Rolle des genomischen Hintergrunds von *trpE16* ope dagegen. Auch für das Enzym von *Umbellularia californica* kann in *M. luteus* aus den Daten der Olefinextraktion dessen erfolgreiche Expression und Aktivität als Acyl-ACP-Thioesterase herausgelesen werden. Einziger Unterschied ist hier die Spezifität für längere Acyl-ACPs (C12-Acyl-ACPs [40]), was dafür sorgt, dass die unverzweigten Fettsäuren im Naylor-Medium für die Olefinsynthese nicht ausfallen, sondern dass zusätzliche unverzweigte Acyl-CoAs für die Olefinsynthese bereitstehen. Diese werden einerseits durch OleA vermeintlich ineffizient umgesetzt und blockieren das aktive Zentrum für u.a. *ai*-verzweigte Substrate. Andererseits kann das erhöhte Aufkommen von langkettigen Fettsäuren und in der Folge Acyl-CoAs negative Regulationen der (verzweigten) Fettsäure-Primer-Synthese und der Fettsäure-Elongation auslösen.

Es kommt zu Verschiebungen von *α*-verzweigten zu unverzweigten sowie von längeren zu kürzeren Olefinen. Für das Enzym von *Bacteroides thetaiotaomicron* kann aufgrund von merklichen Verschiebungen zwischen unverzweigten und verzweigten Olefinen eine Thioesterase-Aktivität aus den Daten der Olefinextraktion herausgelesen werden, jedoch erschwert die beschriebene relativ breite Spezifität für C4- und C14-Kettenlängen [40] sowie die mutmaßlich fehlende Spezifität für unverzweigte oder verzweigte Acyl-ACPs der Thioesterase des ebenfalls Gram-positiven Bakteriums eine genauere Aufschlüsselung der auftretenden Verschiebungen im Olefinprofil. Durch die Klonierung des Enzyms von *Clostridium thermocellum* mit Kettenlängenspezifität für C14-Acyl-ACPs erfolgen keine wesentlichen Änderungen des Olefinprofils, wobei aber die Expression eines aktiven Enzyms nicht gesichert ist.

Zusammenfassend konnte hier für drei von vier heterologe Acyl-ACP-Thioesterasen entsprechende Aktivität und die Fähigkeit zur Aufhebung von durch Acyl-ACPs erfolgende Hemmung der Fettsäurebiosynthese in *M. luteus* nachgewiesen werden. Damit dies jedoch gewinnbringend für die Olefinsynthese zu erhöhter Verfügbarkeit von verzweigten Acyl-CoA-Substraten führt, ist die Verfügbarkeit kurzkettiger verzweigter Acyl-CoA-Primer aus dem Aminosäureabbau möglicherweise in Kombination mit erhöhter Aktivität der Fettsäureelongation (AccABCD, FabH) zu steigern.

6.2.3.5. Die Reaktion der Acyl-CoA-Synthetase (FadD)

Zur *in silico*-Suche nach Genkandidaten für die Reaktion der Acyl-CoA-Synthetase FadD in *M. luteus* wurden die bereits gut untersuchten FadD-Enzyme von *Escherichia coli* [96] und *Bacillus subtilis* [97] verwendet. Sie weisen neben allgemeinen AMP-Bindedomänen charakteristische langkettige Acyl-CoA-Ligase-Domänen auf. Es konnten neun Genkandidaten im Genom von *M. luteus* ausgemacht werden. Die Genprodukte von Mlut_02430, Mlut_19550, Mlut_20370 und Mlut_17630 besitzen nur allgemeine AMP-Bindedomänen und Acyl-CoA-Ligase-Domänen. Die Enzyme, die durch Mlut_20330 und Mlut_13180 codiert werden, zeigen zusätzliche Domänen für die Bindung anderer Substrate wie Succinylsäure oder Phenylelessigsäure. Die Genprodukte von Mlut_05330, Mlut_13790 und Mlut_22810 dagegen zeigen eindeutige Bindedomänen für sehr langkettige oder langkettige Fettsäuren, also Substrate, die für FadD-Enzyme erwartet werden (Tabelle 38). Um Phänotypen zu generieren wurden Deletions-Mutanten aller Genkandidaten im genomischen Hintergrund von trpE16 und im genomischen Hintergrund von trpE16 ope Δ 02880:hyg mit induziertem β -Oxidationscluster Mlut_19540-70 erzeugt. Nur die Deletion der Gene Mlut_05330 und Mlut_13790 führten im Naylor-Medium zu einem Einbruch der Olefinproduktion jeweils um 50 % (Abbildung 52). In LB-Medium führte die Deletion von Mlut_13790 zusätzlich zu einer Reduktion der Olefinsynthese um 20 %. In Naylor-Medium kann also von einer additiven Wirkung zweier aktiver Acyl-CoA-Synthetasen ausgegangen werden. In LB-Medium ist jedoch von zusätzlich wirksamen noch unbekanntem Enzymen auszugehen, die trotz der oben genannten Deletionen weiterhin Acyl-CoA-Substrate für die Olefinsynthese bereitstellen. Die einzelnen Deletionen zeigten keine Beeinflussung des Olefinprofils in Kettenlängen oder Isomeren, daher ist eine ähnliche Kettenlängenspezifität und keine Bevorzugung verzweigter oder unverzweigter Substrate angezeigt. Zur Optimierung der Olefinsynthese bietet sich für künftige Studien die verstärkte Transkription beider Gene in Kombination mit der Ausschaltung der weiteren β -Oxidation (FadE-Reaktion) an.

6.2.3.6. Die Reaktion der Acyl-CoA-Dehydrogenase (FadE)

Zur *in silico*-Suche nach Genkandidaten für die Reaktion der Acyl-CoA-Dehydrogenase FadE in *M. luteus* wurden die bereits gut untersuchten FadE-Enzyme von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* [98], [99] verwendet. Neben den Acyl-CoA-Dehydrogenasen des Aminosäureabbaus für kurzkettige Acyl-CoAs wurden die Genprodukte von Mlut_03070, Mlut_19560 und Mlut_23170 mit den gleichen charakteristischen Domänen wie beim FadE-Enzym von *E. coli* oder *B. subtilis* gefunden. Die Domänen-Anordnung des Genprodukts von Mlut_11700 weist das Produkt dieses ORFs dagegen als Acyl-CoA-Oxidase aus, ein Enzym das die Oxidation von Acyl-CoAs unabhängig vom Cofaktor FAD direkt mit molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor katalysiert (Tabelle 39). Mlut_11700 wurde bereits als heterologe Oxidase zur Optimierung der FadE-Reaktion in *E. coli* verwendet [100]. Die Olefinproduktion der einzelnen und kombinierten Deletionen der Genkandidaten im genetischen Hintergrund von trpE16, trpE16 ope mit erhöhter Zahl aktiver OleABCD-Enzyme und trpE16 ope Δ 02880:hyg mit induziertem β -Oxidationscluster und Isoleucin-/Valin-Abbaucuster wurde im Naylor- und im LB-Medium untersucht. Nur die ganzheitliche Betrachtung aller beobachteten Phänotypen der Olefinproduktion erlaubt die Entschlüsselung der Rolle der FadE-Enzyme für die Olefinproduktion in *M. luteus* (Abbildung 53, 54, 55, 57, 59 und 60).

Die Deletion einzelner FadE-Enzyme (Dehydrogenasen + Oxidase) führt möglicherweise zur Induktion der β -Oxidation über die drei verbliebenen Enzyme, eine Anreicherung von Acyl-CoAs wird scheinbar von den aktiven Regulationsmechanismen des Fettsäure-Stoffwechsels in *M. luteus* nicht toleriert. Dies könnte den i.d.R. beobachteten Rückgang in der Olefinproduktion aufgrund von Substratmangel erklären. Dieser Rückgang fällt im genomischen Hintergrund von trpE16 ope im Naylor-Medium besonders stark aus, weil zum einen der β -Oxidationscluster Mlut_19540-19570 hier normalerweise stärker reprimiert ist (eigene RNA-Sequenzierungsdaten, Daten nicht gezeigt) und zum anderen der Unterschied in der Substrat-Umsatzrate zwischen trpE16 ope und trpE16 ope mit einzelner Deletion deutlich größer ausfällt als zwischen trpE16 und trpE16 mit einzelner Deletion (Abbildung 53B).

Im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* im LB-Medium führt die einzelne Deletion dagegen bereits zu leicht erhöhter Olefinproduktion im Vergleich zum *trpE16 ope* Ausgangsstamm, da bei stärkerem Abzug von Acyl-CoAs in die β -Oxidation als im Naylor-Medium und durch die höhere Konzentration von Ole-Enzymen das Aufstauen von Acyl-CoAs durch eine Deletion noch unter die Toleranzgrenze des Fettsäure-Stoffwechsels fällt (Abbildung 53D). Die möglichen Erklärungen zu den Phänotypen nach einzelnen Deletionen von *fadE*-Genen im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* sind in Abbildung 75 veranschaulicht.

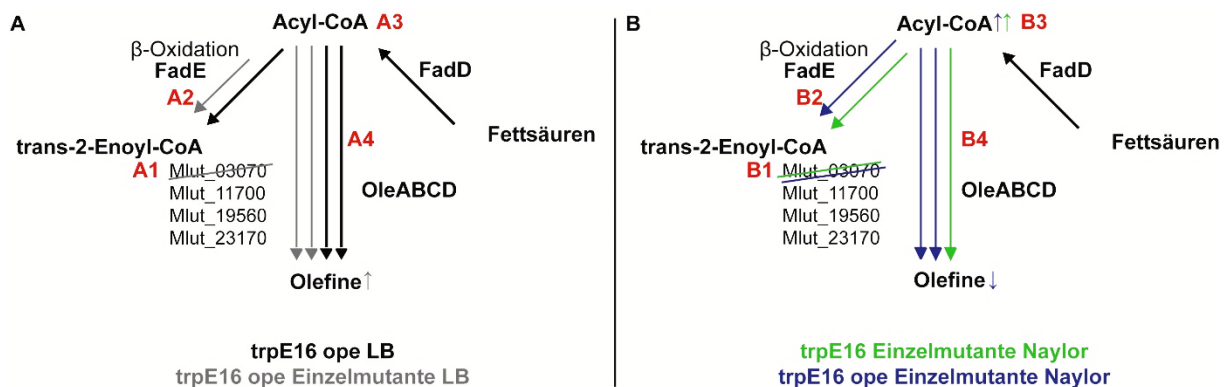


Abbildung 75: Erklärung der beobachteten Phänotypen für *fadE*-Einzelmutanten im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* im LB-Medium (A) und Naylor-Medium (B). In (A) wird eine *fadE*-Einzelmutante, z.B. die Deletion von Mlut_03070, (A1) mit dem *trpE16 ope* Ausgangsstamm verglichen. Im LB-Medium ist die FadE-Reaktion (β -Oxidation) grundsätzlich stärker und eine *fadE*-Einzelmutation reduziert den Fluss von Acyl-CoAs in die β -Oxidation (A2), was aber noch keine Anreicherung von Acyl-CoAs bewirkt (A3) und keine noch stärkere Induktion der β -Oxidation über die verbliebenen FadE-Enzyme. Bei gleichem Abzug von Acyl-CoAs in die Olefinsynthese zwischen *fadE*-Einzelmutante und Ausgangsstamm (A4) kann die Einzelmutante also mehr Acyl-CoAs der Olefinsynthese zuführen und die Olefinproduktion steigt. In (B) wird eine beliebige *fadE*-Einzelmutante, z.B. die Deletion von Mlut_03070, im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* mit der gleichen Einzelmutante im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* verglichen (B1). Im Naylor-Medium ist die FadE-Reaktion (β -Oxidation) für beide genomische Hintergründe gleichsam (gering) aktiv (B2) und die Einzelmutante bewirkt in beiden Fällen eine sofortige Anreicherung von Acyl-CoAs (B3) und damit eine Induktion der β -Oxidation über die verbliebenen FadE-Enzyme. Im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsstamm verliert die *fadE*-Einzelmutante im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* mehr Acyl-CoAs für die Olefinsynthese als die Einzelmutante im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* (B4). Die Olefinproduktion bricht für die *trpE16 ope fadE*-Einzelmutante stärker ein. Abkürzungen: FadD, Acyl-CoA-Synthetase; FadE, Acyl-CoA-Dehydrogenase; Ole, Olefine synthetisierende Enzyme.

Die kombinierte Deletion aller FadE-Enzym-codierenden Genkandidaten erlaubte auch keine Steigerung der Olefinproduktion. Die extrahierte Olefinmenge im LB- wie im Naylor-Medium blieb konstant (Abbildung 53B, 53D und 57). Zwar ist in diesem Fall keine Induktion der β -Oxidation mehr möglich, aber zum einen verschiebt sich die negative Regulation des Fettsäurestoffwechsels durch Anhäufung langkettiger Fettsäurederivate in die Fettsäure-Biosynthese, denn es zeigt sich eine Verschiebung in den produzierten Olefin-Kettenlängen (Abbildung 60), was auf eine Repression der Acetyl-CoA-Carboxylase hinweist und einen Mangel an Malonyl-ACP-Verlängerungseinheiten und zum anderen konzentrieren sich auch die von den Olefin-Enzymen wenig effizient umgesetzten unverzweigten Acyl-CoAs auf, was sich in Verschiebungen von verzweigten zu unverzweigten Olefinen zeigt (Abbildung 59). Die Kombination der Ausschaltung aller potentiellen FadE-Enzyme in einem *M. luteus*-Stamm mit stärkerer Expression der Acetyl-CoA-Carboxylase (Abbildung 57) wirkte sich im LB-Medium deutlich positiv auf die Olefinproduktion aus. Somit greift eine negative Regulation in Folge der Abschaltung der β -Oxidation wahrscheinlich über die Repression der Acc-Reaktion (siehe Abbildung 76). Die zusätzliche Überexpression von FabH sowie der BCKA-Dehydrogenase (Abbildung 57) hemmt die Olefinsynthese im LB-Medium wieder verstärkt. Deshalb ist davon auszugehen, dass eine zusätzliche negative Regulation beider Reaktionen durch Wegfall der β -Oxidation nicht stattfindet. Außerdem sollte die zusätzliche Bereitstellung von Acyl-CoA-Primern für die Fettsäure-Elongation das Problem der Verknappung von Malonyl-ACP-Verlängerungseinheiten wieder verstärken. Für *E. coli* ist bereits eine negative Regulation der Fettsäurebiosynthese durch Anhäufung von langkettigen Acyl-ACPs bzw. -CoAs über die Acc-, FabH- und weitere Reaktionen beschrieben [101-102]. Es bleibt zu testen, ob die Acc-Reaktion parallel zur Abschaltung der β -Oxidation auch in *M. luteus* auf Transkriptions- oder Proteinebene gehemmt ist und ob die Expression heterologer Acyl-ACP-Thioesterasen eine Hemmung der Olefinsynthese durch Reduktion von langkettigen Fettsäurederivaten vermeidet.

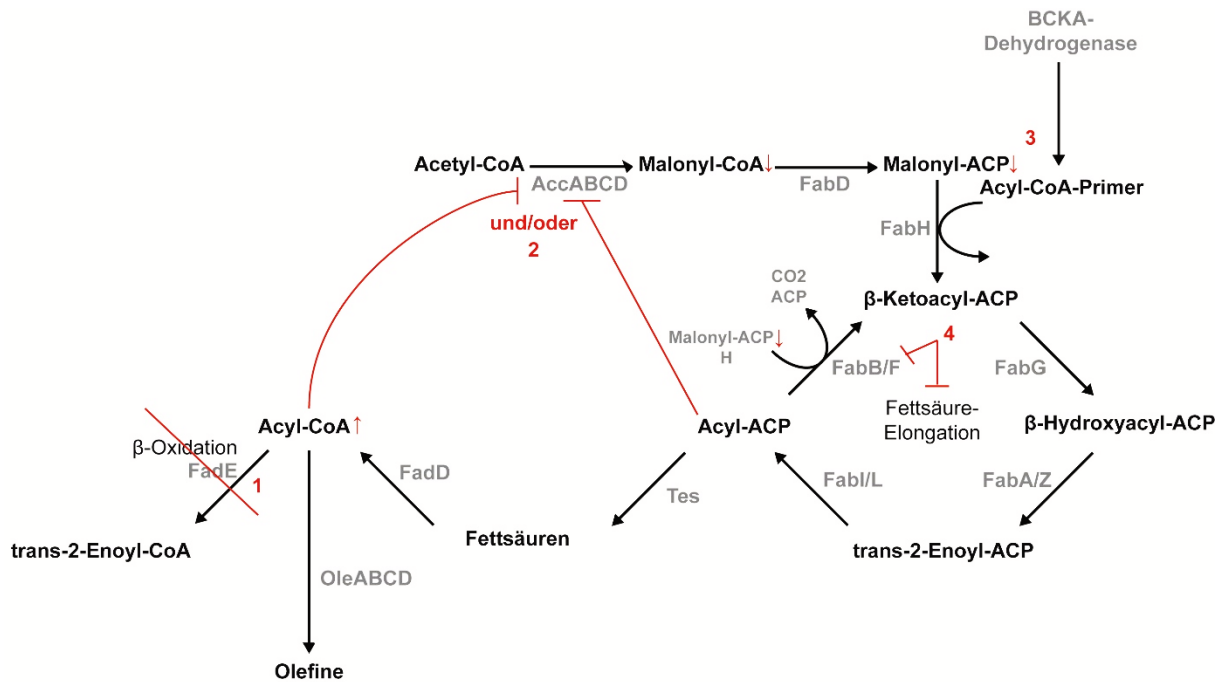


Abbildung 76: Übersicht des Fettsäurestoffwechsels aus Fettsäurebiosynthese und Teilen der β -Oxidation zur Veranschaulichung einer möglichen Erklärung des beobachteten Phänotyps für die kombinierte Deletion aller *fadE*-Genkandidation im genomischen Hintergrund von *trpE16* ope im LB-Medium und Naylor-Medium. Rote Zahlen zeigen die Wirkungskette auf die Abschaltung der β -Oxidation in Folge der Deletion aller *fadE*-Genkandidaten an. Abkürzungen: Acc, Acetyl-CoA-Carboxylase; BCKA, "Branched chain α -Ketoacid"; FabD, Malonyl-CoA-Acyl-Carrier-Protein Transacylase; FabH, β -Ketoacyl-Synthase III; FabG, β -Ketoacyl-Reduktase; FabA/Z, β -Hydroxyacyl-Dehydratase; FabI/L, Enoyl-Reduktase; FabB/F, β -Ketoacyl-Synthase I/II; FadD, Acyl-CoA-Synthetase; FadE, Acyl-CoA-Dehydrogenase; Tes, Acyl-ACP-Thioesterase; Ole, Olefine synthetisierende Enzyme.

Da, wie angesprochen, die *FadE*-Reaktion in *M. luteus* strikter Regulation unterliegt, war eine Bestätigung der Bedeutung eines einzelnen codierten Enzyms für die *FadE*-Reaktion durch Deletion eines einzelnen *fadE*-Gens nur generierbar bei bereits induzierter β -Oxidation im genomischen Hintergrund von *trpE16* ope $\Delta 02880$:hyg. Die zusätzliche Ausschaltung eines aktiven *FadE*-Enzyms im genomischen Hintergrund von *trpE16* ope $\Delta 02880$:hyg sollte die Induktion der β -Oxidation zumindest in Teilen aufheben und wieder mehr Substrate für die Olefinproduktion bereitstellen. Im Fall der zusätzlichen Deletion der Gene *Mlut_03070* und *Mlut_11700* sowie zum Teil im Fall des Gens *Mlut_23170* kann die Olefinproduktion von *trpE16* ope im Vergleich zu *trpE16* ope $\Delta 02880$:hyg wieder regeneriert werden (Abbildung 53). Die zusätzliche Deletion des Gens *Mlut_19560* zeigte dagegen keinen Effekt auf die extrahierte Olefinmenge. Eine entscheidende Rolle der durch *Mlut_19560* codierten Dehydrogenase für die β -Oxidation kann daher bezweifelt werden. Die zusätzliche Ausschaltung aller potentiellen *FadE*-Enzyme führt nicht zu einer weiteren Steigerung der Olefinproduktion im Vergleich zu *trpE16* ope.

Es greifen die gleichen negativen Effekte wie für die kombinierte Ausschaltung aller FadE-Enzyme im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* erweitert um die verbliebene Induktion des Isoleucin- und Valin-Abbaus (Abbildung 53D).

Bevor die Deletionen einzelner FadE-Enzyme in einer Mutante kombiniert werden konnten, war eine Abschaltung der β -Oxidation auch durch Deletion des Genclusters des Elektronen-transferierenden Flavoproteins (Etf) denkbar. Acyl-CoA-Dehydrogenasen können in der Folge Elektronen nicht mehr von den Acyl-CoAs abführen und werden stillgelegt [103]. Mlut_02780-02790 codiert die einzigen zu entsprechenden Etf- α - und β -Untereinheiten in *E. coli* oder *B. subtilis* homologen Aminosäure-Sequenzen in *M. luteus*. Wie die Deletion einzelner Acyl-CoA-Dehydrogenasen führt die Deletion einerseits zum Einbruch der Olefinsynthese durch Induktion der β -Oxidation über die verbliebene Acyl-CoA-Oxidase Mlut_11700 (Abbildung 54A) und unterstreicht abermals deren Bedeutung für die β -Oxidation. Andererseits sind aber auch die zusätzlichen Olefin- und Fettsäure-Phänotypen, nämlich die Verschiebung zu kürzeren und unverzweigten Spezies, erkennbar (Abbildung 54B und 54C sowie 55B und 55C), die wie oben beschrieben in Folge einer kompletten Abschaltung der β -Oxidation auftreten. Im genomischen Hintergrund von *trpE16 ope* nach Wachstum in LB-Medium zeigte sich bei ansonsten konstanter Fettsäureproduktion eine deutliche Steigerung extrahierter Fettsäuren und der geringste Einbruch der Olefinsynthese (Abbildung 54A und 55A), was wie für die Deletion einzelner *fadE*-Gene beschrieben auf eine verminderte Induktion der β -Oxidation hinweist. Die Olefinsynthese der Etf-Deletions-Mutante steht zwischen beiden negativen Kompensationsmechanismen für die Aufkonzentrierung langkettiger Fettsäurederivate. Eine Abschaltung der β -Oxidation auf diesem Wege ist aufgrund der verbliebenen aktiven Acyl-CoA-Oxidase nicht möglich.

6.2.3.7. Die Reaktion der NADH-Kinase

Die Fettsäurebiosynthese setzt eine große Menge des Reduktionsäquivalents NADPH zu NADP^+ um und bildet große Mengen NADH. Transhydrogenasen und NADH-Kinasen setzen NADH in NADPH um und könnten zur Optimierung der Redox-Balance der Fettsäure-Biosynthese beitragen [42]. Blastp-Suche mit Aminosäure-Sequenzen von *E. coli* und *Yarrowia lipolytica* lieferten Mlut_14220 als einzigen Genkandidaten für die Codierung einer NADH-Kinase in *M. luteus*. Im LB-Medium kann durch deren Überexpression die Olefinsynthese um 100 % gesteigert werden bedingt durch die vermeintliche Steigerung der Fettsäureproduktion (Abbildung 56). Somit erlaubt die Optimierung der Redox-Balance der Fettsäurebiosynthese eine Optimierung der Substratverfügbarkeit für die Olefinsynthese in *M. luteus*. Weitere Möglichkeiten für die Bereitstellung von NADPH für die Fettsäurebiosynthese sind zum einen die Expression NADP^+ -abhängiger Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenasen. Die heterologe Expression entsprechender Enzyme aus *Clostridium acetobutylicum* und *Kluyveromyces lactis* erlaubte in *Yarrowia lipolytica* eine Steigerung des Lipidgehaltes der Zellen um jeweils ca. 20%. Zum anderen kann durch Aktivierung eines Pyruvat/Oxaloacetat/Malat-Zyklus NADH in NADPH umgewandelt werden. Die zusätzliche Expression eines cytosolischen NADP^+ -abhängigen Malat-Enzyms aus *Mucor circinelloides* erlaubte in *Yarrowia lipolytica* die Aktivierung eines solchen Zyklus und eine Steigerung des Lipidgehaltes um 24% [42].

6.3. Die Substratspezifität der Olefinsynthese in *M. luteus*

6.3.1. Supplementierung mit Carbonsäuren verschiedener Kettenlänge

Um die Substratspezifität der Olefinsynthese bzw. von OleA in *M. luteus* zu untersuchen wurden unverzweigte Carbonsäuren verschiedener Kettenlängen in LB-Kulturen von *M. luteus* trpE16 ope supplementiert (Abbildung 61).

Es konnte beobachtet werden, dass alle supplementierten unverzweigten Carbonsäuren die absolute Olefinsynthese hemmen. Dies erfolgt eventuell durch einen Überschuss von unverzweigten Fettsäuren im Fall der längeren Kettenlängen C12-C18 oder durch Hemmung der Neusynthese von verzweigten Fettsäuren im Fall der kürzeren Kettenlängen C6-C10. Bei der Supplementierung der C9-Kettenlänge scheint die Unterdrückung der Neusynthese von *α*-verzweigten Fettsäuren bzw. bei der C12-Kettenlänge scheint der resultierende Überschuss an unverzweigten Fettsäuren und der anschließende Einbruch der Olefinsynthese besonders stark zu sein. Bei den gebildeten Olefinen handelt es sich i.d.R. um die Kombination eines supplementierten oder supplementierten und verkürzten Acyl-CoAs mit einem *M. luteus*-eigen-hergestellten verzweigten Acyl-CoA. Die C12- und C18-Kettenlängen werden weder in verkürzter noch verlängerter Form in Olefine eingebaut. Sie werden scheinbar von den der OleA-Reaktion vorgeschalteten Acyl-CoA-Synthetasen nicht akzeptiert. Die C15-Kettenlängen werden nach Aufnahme nicht verlängert, die Verkürzung in der β -Oxidation vor Olefinsynthese ist möglich. Dennoch werden maßgeblich C29-Olefine gebildet, was auf eine direkte Kombination von zwei C15-Acyl-CoAs und die Bevorzugung der C15-Acyl-CoAs gegenüber kürzeren Acyl-CoAs durch OleA schließen lässt. Auch nach Supplementierung von C16-Kettenlängen werden keine längeren Fettsäuren gebildet, aber es werden hauptsächlich C30-Olefine gebildet. Dies lässt wiederum auf die Bevorzugung einer direkten Kombination mit einem C15-Acyl-CoA schließen. Das zweithäufigste Produkt ist ein C28-Olefin durch die Kombination von verkürzten supplementierten C16-Fettsäuren mit C15-Fettsäuren.

Die Bildung von C31-Olefinen durch Kombination von zwei C16-Acyl-CoAs wurde nicht beobachtet. Auch nach Supplementierung von C17-Kettenlängen wurden keine C31-, C32- oder C33-Olefine beobachtet, d.h. das OleA-Enzym von *M. luteus* kann offenbar ein C17- bzw. C16-Acyl-CoA nicht mit einem C17-, C16- oder (verkürztem) C15-Acyl-CoA verbinden, was eine striktes oberes Substrat-Kettenlängen- oder Kettenlängen-Kombinationslimit für OleA definiert. Das Olefin-Hauptprodukt der C17-Kettenlängen-Supplementierung ist das C29-Olefin. Die bereits festgestellte Bevorzugung von C15-Acyl-CoAs legt daher die Kombination von zu C15-Acyl-CoAs verkürzten supplementierten C17-Fettsäuren wiederum mit C15-Acyl-CoAs nahe und wird durch die Tatsache, dass keine rein unverzweigten Olefine beobachtet werden unterstützt. Da hierbei größere Anteile von C29-Olefinen generiert werden können als durch die direkte Supplementierung von C15-Fettsäuren, bekommt der natürliche Pool von C17-Fettsäuren und die β -Oxidation in *M. luteus* für die Olefinsynthese eine größere Bedeutung. Nach Supplementierung von C14-Kettenlängen können die Fettsäuren nochmals in der Fettsäureelongation zu C16-Fettsäuren verlängert werden. Somit ist auch, wie nach Supplementierung von C16-Kettenlängen, die Kombination von C16-Acyl-CoAs mit C15-Acyl-CoAs zu C30-Olefinen möglich. Das Hauptprodukt der C14-Fettsäure-Supplementierung ist jedoch durch direkte Kombination mit C15-Acyl-CoAs das C28-Olefin. Es werden auch große Mengen C27 *scsc*-Olefine durch Kombination von zwei supplementierten C14 *sc*-Acyl-CoAs gebildet, was eine hohe Akzeptanz der C14-Kettenlänge durch das OleA-Enzym von *M. luteus* anzeigt. Da die C16-Acyl-CoAs der Restriktion durch das obere Kettenlängenlimit von OleA unterliegen, sind die C14-Acyl-CoAs nach den C15-Acyl-CoAs als zweitwichtigste Substrate des OleA von *M. luteus* zu bewerten. Ein unteres Kettenlängenlimit für OleA kann aufgrund fehlender, zur Kondensation durch OleA bereitstehender C13- oder kürzerer Kettenlängen in *M. luteus* in Folge aller Supplementationen nicht definiert werden. Kürzere supplementierte Carbonsäuren als C12-Kettenlängen werden in *M. luteus* mit aktiver Fettsäurebiosynthese für die Fettsäureelongation aktiviert und zu C14-, C15- und C16-Kettenlängen verlängert. Dies deutet die Kettenlängenspezifität der nativen Acyl-ACP-Thioesterasen in *M. luteus* an. In der Folge ergibt sich das Olefin-Kettenlängenprofil der Supplementierung von C14-, C15- und C16-Fettsäuren.

Bei Wiederholung des Experiments in einem *M. luteus*-Stamm ohne aktive Fettsäurebiosynthese könnte das OleA-Enzym auch Substraten mit kürzeren Kettenlängen ausgesetzt werden und ein unteres Kettenlängenlimit der OleA-Substrate bestimmt werden.

Zusammenfassend konnte durch die besprochenen Supplementierungen mit Carbonsäuren unterschiedlicher Kettenlängen für das OleA von *M. luteus* ein oberes Kettenlängenlimit bzw. Kettenlängen-Kombinationslimit definiert werden. Das Substratkettenlängen-Spektrum für das OleA von *M. luteus* konnte auf C14-C16-Kettenlängen festgelegt werden. Die C15-Kettenlänge wird nach Möglichkeit jeder anderen Kettenlänge vorgezogen und der C17-Fettsäurepool hat große Bedeutung für die C15-Kettenlängen-abhängige Olefinproduktion. Diese beschriebenen Kettenlängenspezifitäten von OleA sind auf die Fettsäureproduktion in *M. luteus* perfekt abgestimmt.

6.3.2. Supplementierung mit ungesättigten Carbonsäuren

Ungesättigte unverzweigte Carbonsäuren wurden in LB-Kulturen von *M. luteustrpE16* ope supplementiert (Abbildung 62). Im Fall der Supplementierung von Non-8-ensäure (C9:1 (Δ^8)) wird die Olefinsynthese durch Einschränkung der Neusynthese von verzweigten Fettsäuren nicht zusätzlich negativ beeinträchtigt, im Vergleich zur Supplementierung von gesättigten unverzweigten C9-Carbonsäuren. Auch die terminal-ungesättigten C9-Carbonsäuren werden in der Fettsäureelongation zu C15-Fettsäuren verlängert und in gleichem Maße wie verlängerte gesättigte C9-Fettsäuren in C29-Olefine eingebaut. Die terminale Doppelbindung der Acyl-CoAs unterliegt keiner zusätzlichen Diskriminierung durch das OleA-Enzym. Im Fall der Supplementierung von cis-Tetradec-9-ensäure (C14:1 (cis- Δ^9)) brach die Olefinproduktion im Vergleich zur Supplementierung von gesättigten C14-Fettsäuren stark ein, dies geschah möglicherweise wegen zusätzlicher Unterdrückung der Neusynthese von verzweigten Fettsäuren und dadurch, dass sie selbst nicht zur Olefinsynthese zur Verfügung stehen (die in Anwesenheit von cis-Tetradec-9-ensäure gebildeten Olefine waren ausschließlich an beiden Enden verzweigt (Abbildung 62)). Die ungesättigten C14-Fettsäuren werden zwar von *M. luteus* aufgenommen, aber weder durch die Elongation zu längeren noch durch die β -Oxidation zu kürzeren Fettsäuren umgesetzt.

Daher wird die cis-Tetradec-9-ensäure vermutlich bereits durch die der Olefinsynthese vorgeschalteten Acyl-CoA-Synthetasen, wie die C12- und C18-Kettenlängen im Abschnitt zuvor, nicht akzeptiert. Es bleibt zu klären, ob diese Diskriminierung aufgrund der Position der Doppelbindung oder der Krümmung der Alkyl-Kette durch die cis-Konfiguration auftritt.

6.3.3. Supplementierung mit kurzkettigen unterschiedlich verzweigten Carbonsäuren

In Abbildung 44 ist die absolute Fettsäure- und Olefinproduktion in Folge der Supplementierung der BCKA-Dehydrogenase-Deletions-Mutante *trpE16 Δ06800-06820:hyg* im Naylor-Medium mit Isobutansäure, 3-Methylbutansäure und 2-Methylbutansäure gezeigt. Diese Supplementierungen wurden offensichtlich zu natürlichen verzweigten Acyl-CoA-Primer-Molekülen für die Fettsäurebiosynthese aktiviert und führten in relativ gleichem Maße zur Bildung von geradzahligen *iso*-verzweigten, ungeradzahligen *iso*-verzweigten und ungeradzahligen *ai*-verzweigten Fettsäuren. Die zu Acyl-CoA-Primern für die Fettsäurebiosynthese aktivierenden Acyl-CoA-Synthetasen und die FabH-Reaktion bringen keine zusätzliche Substratspezifität ein. Trotz gleicher Mengen ungeradzahliger *iso*- und *ai*-verzweigter Fettsäuren liefern die *ai*-verzweigten Fettsäuren doppelt so viele Olefine wie die *iso*-verzweigten Fettsäuren (50 %ige Olefinproduktion von ungeradzahligen *ai*-verzweigten Fettsäuren). Da die gefundenen nativen FadD- und FadE-Enzyme in *M. luteus* bislang keine Isomeren-Spezifitäten gezeigt haben, kann hier die Diskriminierung der *iso*-Verzweigung gegenüber der *ai*-Verzweigung der Acyl-CoAs durch OleA abgelesen werden. Die geradzahligen (C14, C16) *iso*-verzweigten Fettsäuren können noch weniger effizient als die ungeradzahligen (C15, C17) *iso*-verzweigten Fettsäuren in Olefine umgesetzt werden (33 %ige Olefinproduktion von ungeradzahligen *ai*-verzweigten Fettsäuren), was die in den vorherigen Abschnitten beschriebene Kettenlängenspezifität von OleA widerspiegelt.

In den Abbildungen 66 und 67 wurden die Fettsäure- und Olefinproduktion der BCKA-Dehydrogenase-Mutante von *M. luteus* nach Supplementierung von LB-Kulturen mit 2-Methylbutansäure und 3-Methylpentansäure verglichen. Die Fettsäurebiosynthese lieferte unspezifisch sogar etwas weniger natürliche ungeradzahlige (C15, C17) aus 2-Methylbutansäure als unnatürliche geradzahlige (C14, C16) *ai*-verzweigte Fettsäuren aus 3-Methylpentansäure.

In der Folge können die 2-Methylbutansäure-Derivate jedoch zur doppelten Menge an Olefinen umgesetzt werden als die 3-Methylpentansäure-Derivate (50 %ige Olefinproduktion von ungeradzahligen *ai*-verzweigten Fettsäuren), was wiederum die Kettenlängenspezifität von OleA zeigt. Zusätzlich ist jedoch die mehrheitliche Produktion von C27 *ai*-Olefinen bei Supplementierung von 3-Methylpentansäure anstelle einer C29 *ai*-dominierten Olefinproduktion bei Supplementierung von 2-Methylbutansäure auffällig (Abbildung 67 rechts). Im Fall der Produktion von geradzahligen *ai*-verzweigten Fettsäuren wird die Kombination von zwei C14-Acyl-CoAs bevorzugt, im Fall der Produktion von ungeradzahligen *ai*-verzweigten Fettsäuren die Kombination von zwei C15-Acyl-CoAs. Ein zusätzlicher Aspekt der Substratspezifität von OleA in *M. luteus* ist somit die bevorzugte Kombination von gleichlangen Alkyl-Ketten.

In den Abbildungen 64 und 65 wurden die Fettsäure- und Olefinproduktion der BCKA-Dehydrogenase-Mutante von *M. luteus* nach Supplementierung von Naylor-Kulturen mit 3-Methylpentansäure und den Carbonsäuren 3,3-Dimethylbutansäure sowie 2-Ethylbutansäure verglichen. Im Naylor-Medium führt die Supplementierung von 3-Methylpentansäure nicht zur mehrheitlichen Produktion sondern nur zu großen Anteilen an C27 *ai*-Olefinen, da es bei Induktion der Fettsäuresynthese im Naylor-Medium zur bevorzugten Produktion der längeren geradzahligen *ai*-verzweigten Fettsäuresubstrate (*ai*-C16-Fettsäuren) kommt. Die Supplementierung von 2-Ethylbutansäure führte zu geringeren Mengen geradzahliger Fettsäuren als die Supplementierung von 3-Methylpentansäure, jedoch wurden gleichviel entsprechend verzweigte Olefine produziert (50 %ige Olefinproduktion von ungeradzahligen *ai*-verzweigten Fettsäuren). Eine Verlängerung der *ai*-Verzweigung wird also von OleA toleriert. Beide *ai*-Verzweigungen erlauben die Bildung von C31-Olefinen, wobei die Hauptkette der kombinierten Fettsäuren 15 bzw. 14 Kohlenstoffatome lang ist und somit dem oberen Kettenlängenlimit, das im Abschnitt 6.3.1. definiert wurde, nicht widerspricht. Bei Supplementierung von 2-Ethylbutansäure wird die Bildung von C31-Olefinen stark bevorzugt, weil es durch die Kombination gleichlanger C16-Acyl-CoAs zustande kommt. Obwohl die Supplementierung von 3,3-Dimethylbutansäure die gleiche absolute Fettsäuremenge wie die Supplementierung von 2-Ethylbutansäure lieferte, erreichte sie doch nur die 12,5 %ige Olefinproduktion von ungeradzahligen *ai*-verzweigten Fettsäuren (siehe Abbildungen 64 und 65).

Die gebildeten insgesamt geradzahligen doppelt-*iso*-verzweigten Fettsäuren werden durch OleA nochmal deutlich weniger effizient umgesetzt als geradzahlige einfach-*iso*-verzweigte Fettsäuren bei der Supplementierung von Isobutansäure (33 %ige Olefinproduktion von ungeradzahligen *ai*-verzweigten Fettsäuren). Doppelte *iso*-Verzweigung führt zu einer doppelt so ineffizienten Umsetzung durch OleA. 11,11-Dimethyldodecanoyl-CoAs können durch OleA scheinbar besser verarbeitet werden als 13,13-Dimethyltetradecanoyl-CoAs, was in mehrheitlicher Produktion von C27-Olefinen resultiert.

Zusammenfassend konnte als zweitwichtigstes Kriterium der Substratspezifität des OleA von *M. luteus* nach der Kettenlängenspezifität, die Spezifität von OleA für die Positionierung einer Verzweigung in der Alkyl-Kette herausgestellt werden. Moderate Änderungen der Verzweigungsgröße haben Einfluss auf die Umsetzung durch OleA, sind dem Kriterium der Verzweigungsposition jedoch untergeordnet. Diese Schlussfolgerungen bezüglich der biochemischen Eigenschaften des OleA-Enzyms in *M. luteus* basieren auf *in vivo*-Beobachtungen von Supplementierungs-Experimenten und sind durch *in vitro*-Reaktionen von aufgereinigtem OleA-Protein mit entsprechenden Acyl-CoAs zu bestätigen.

6.3.4. Die *oleA*-Austausch-Stämme (olex-Stämme)

Die *oleA*-Gene von verschiedenen *Micrococcales*-Gattungen wurden in den genomischen Hintergrund von *M. luteus* eingebracht und die resultierenden Enzymprodukte wurden dem für alle Austausch-Stämme gleichen Substratstoffwechsel-Hintergrund von *M. luteus* im LB-Medium ausgesetzt. Aus den Unterschieden in der Umsetzung des gleichen Substratpools können Rückschlüsse auf die Substratspezifität der unterschiedlichen OleA-Enzyme gezogen werden (Abbildung 69).

Zunächst wurde das *oleA*-Gen eines anderen *Micrococcus*-Stammes von *Micrococcus sp.* 2148 in den genomischen Hintergrund von *M. luteus* eingebracht. Die Olefinproduktion durch OleA von *Micrococcus sp.* 2148 steigt im Vergleich zum Donor-Stamm-Hintergrund deutlich an und das produzierte Olefinprofil entspricht bezüglich der Kettenlängen und Isomeren exakt dem Profil des *M. luteus*-Akzeptor-Stammes.

Das OleA-Enzym aus *Micrococcus sp.* 2148 ist möglicherweise weniger effizient oder nur schwächer exprimiert als das *M. luteus*-eigene Enzym, aber transportiert die identische Substratspezifität. Wenn der 21 % Aminosäuresequenzunterschied zwischen *M. luteus* und *Micrococcus sp.* 2148 (geringste Sequenzidentität unter den *Micrococcus*-OleAs zu *M. luteus*-OleA neben dem OleA von *M. luteus* MAW843) keine Änderung in der Substratspezifität unterstützt, so ist davon auszugehen, dass die OleAs aller bisher untersuchten *Micrococcus*-Stämme (i.d.R. mit 1-2 % Aminosäure-Sequenzunterschied) identische Substratspezifitäten für die Olefinsynthese aufweisen.

Das Einbringen des OleA-Enzyms von *Kocuria sp.* 3352 in *M. luteus* resultierte in einem deutlichen Einbruch der Olefinproduktion im Vergleich zum *Kocuria*-Donor- als auch zum *M. luteus*-Akzeptor-Stamm. Der Austausch-Stamm produziert nahezu das gleiche Olefin-Isomeren-Profil wie der *Kocuria*-Donor-Stamm mit deutlichen Verschiebungen zu *iso*-Verzweigungen gegenüber dem *M. luteus*-Akzeptor-Stamm. Der Intermediatstoffwechsel, der Substratmoleküle für die OleA-Reaktion bereitstellt, kann die Erfordernisse an *iso*-verzweigten Acyl-CoAs nicht erfüllen, was offenbar das neue OleA auch zur Umsetzung von unverzweigten Substraten zwingt. Auch kommt es im Austausch-Stamm zur Verschiebung der produzierten Kettenlängen von C27-C29-Kettenlängen im Akzeptor-Stamm zu Spuren von C23-C25-Kettenlängen, was der dominanten C25-Kettenlängenproduktion im *Kocuria*-Donor-Stamm nahekommt. Dies bedeutet, dass die Erfordernisse an kürzeren Substrat-Kettenlängen durch OleA von *Kocuria sp.* 3352 im Stoffwechselhintergrund von *M. luteus* ebenfalls nicht ausreichend bedient werden können und die Olefinproduktion im Austausch-Stamm zusätzlich reduzieren. Somit unterstützt das OleA von *Kocuria sp.* 3352 (49 % Aminosäure-Sequenzunterschied zu *M. luteus* OleA) eine höhere Spezifität für *iso*- und unverzweigte sowie deutlich kürzere Acyl-CoAs im Vergleich zum OleA eines *Micrococcus*-Stammes.

Das Einbringen des OleA-Enzyms von *K. palustris* DSM 20319 in den Stoffwechselhintergrund von *M. luteus* resultiert ebenfalls in einem deutlichen Einbruch der Olefinproduktion im Vergleich zum *Kocuria*-Donor- als auch zum *M. luteus*-Akzeptor-Stamm. Der *Kocuria*-Stamm prozessiert relativ unspezifisch *iso*-, *ai*- und unverzweigte Acyl-CoAs, wird jedoch dessen OleA-Enzym in den Stoffwechselhintergrund von *M. luteus* gesetzt, so ergeben sich im Vergleich zum *M. luteus*-Akzeptor-Stamm Verschiebungen des Olefin-Isomeren-Profiles zu *iso*- und unverzweigten Olefinen. Des Weiteren kommt es im *oleA*-Austausch-Stamm zur Verschiebung der produzierten Olefin-Kettenlängen von C27-29 im *M. luteus*-Akzeptor-Stamm zu C25-Olefinen, was einen Kompromiss zwischen der Substratspezifität des *Kocuria*-OleA für weit kürzere Acyl-CoAs und des Substratpools, der durch den Stoffwechselhintergrund von *M. luteus* bereitgestellt werden kann, darstellt. Somit transportiert das OleA von *K. palustris* (56 % Aminosäuresequenzunterschied zu *M. luteus* OleA) ebenfalls eine höhere Spezifität für *iso*- und unverzweigte sowie deutlich kürzere Acyl-CoAs im Vergleich zum OleA eines *Micrococcus*-Stammes. Die Spezifität für *iso*-verzweigte Acyl-CoAs fällt geringer aus als beim OleA von *Kocuria sp.* 3352.

Das Einbringen des OleAs von *Kytococcus sedentarius* TW93 in den Stoffwechsel von *M. luteus* führte zu einem deutlichen Anstieg der Olefinproduktion im Vergleich zum *Kytococcus*-Donor-Stamm. Das Olefin-Isomeren-Profil des *OleA*-Austausch-Stammes wies sogar höhere Anteile von *ai*-verzweigten Olefinen auf als im *M. luteus*-Akzeptor-Stamm. Die Olefinproduktion des *Kytococcus*-Stammes selbst wies dagegen ein breiteres Profil von *iso*- und *ai*-verzweigten Olefinen auf. Die produzierten Olefin-Kettenlängen verschoben sich radikal von C24-25-Olefinen zu C25-, C27- und C29-Olefinen und entsprechen damit auffällig ähnlich dem Kettenlängen-Profil des *M. luteus*-Akzeptor-Stammes. Somit entspricht die Substratspezifität des *Kytococcus*-OleAs, abgesehen von etwas größerer Bevorzugung kürzerer Acyl-CoAs und etwas mehr *ai*-Verzweigung, trotz nur 48 % Aminosäuresequenzidentität im Wesentlichen der Substratspezifität des OleAs von *M. luteus*. Die Unterschiede im Olefinprofil von *Kytococcus sedentarius* TW93 resultieren daher wohl in erster Linie aus einer von *M. luteus* abweichenden Bereitstellung von OleA-Substraten.

6.3.5. *In silico*-Analyse der OleA-Substratkanäle der *Micrococcales*

Micrococcus-OleA-Proteine konnten bislang nicht in *E. coli* exprimiert werden. *Kocuria*- und *Kytococcus*-OleA-Proteine dagegen konnten in diesem Wirt stark überexprimiert werden (Abbildung 70), aber deren Kristallisation steht noch aus. Eine direkte Strukturanalyse zur weiteren Beschreibung der Substratspezifität von OleA-Proteinen der *Micrococcales* ist daher nicht möglich. Der „OleA *in vitro* Aktivitätsassay/DTNB-Assay“ könnte zur weiteren *in vitro*-Analyse der Substratspezifität genutzt werden, verlangt jedoch die spezifische Optimierung der Assay-Bedingungen für alle soweit exprimierten *Kocuria*- und *Kytococcus*-Proteine und ist durch die Verfügbarkeit geeigneter Substrate limitiert.

Der geringe Verwandtschaftsgrad zwischen den Aminosäure-Sequenzen (~40 % Sequenzidentität) der OleA-Proteine der *Micrococcales* und *X. campestris*, für das bereits Kristallstrukturen existieren [32], [33], erlaubt das Aufstellen von Strukturmodellen mit der *Xanthomonas*-Struktur als Template nicht.

Daher soll die Analyse eines Proteinalignements ausgewählter *Micrococcales*-OleA-Proteine begrenzt auf die Aminosäurereste die laut Goblirsch *et al.* (2016) [33], unter der Annahme der gleichen strukturellen Organisation der OleA-Proteine, die Alkyl-Kanäle von OleA bilden (Abbildungen 71 und 72), genutzt werden. Die Anordnung von hydrophoben stabilisierenden und polaren lenkenden Aminosäureresten in diesen Bereichen bestimmt die Substratspezifität der OleA-Proteine. Es standen Aminosäuresequenzen von *Micrococcus*-, *Kocuria*- und *Kytococcus*-Stämmen zur Verfügung und es wurde versucht die Grundlage für die Unterschiede in der Substratspezifität zwischen OleA-Proteinen von *Micrococcus*- und *Kocuria*-Stämmen auf Ebene der Aminosäuresequenz herauszustellen.

Im Alignment von Alkyl-Kanal A (Abbildung 71) zeigen die Bereiche um Position 284, 298, die Bereiche 306-310 und 315-327 physikalisch-chemische Unterschiede zwischen den *Kocuria*- und *Micrococcus*-OleAs. Im Alignment von Alkyl-Kanal B (Abbildung 72) zeigen die Bereiche 121-125, 127-129, 181-188 und 265-277 Unterschiede in der Aminosäuresequenz, die die gattungsspezifische Substratspezifität bedingen könnten.

Zur weiteren Begrenzung der für die Substratspezifität verantwortlichen Alkyl-Kanalbereiche muss die Aminosäuresequenz des *Kytococcus*-OleAs berücksichtigt werden. Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt werden konnte, teilt das *Kytococcus*-OleA trotz geringer Sequenzidentität (48 %) die Substratspezifität der *Micrococcus*-OleAs, daher können physikalisch-chemisch unterschiedliche Bereiche in den Alkyl-Kanälen zwischen *Micrococcus*- und *Kytococcus*-OleAs möglicherweise die Aktivität der Proteine nicht aber die Substratspezifität beeinflussen. Damit reduziert sich die Auswahl möglicherweise entscheidender Abschnitte der Alkyl-Kanäle für die Substratspezifität auf die Alignment-Bereiche um Position 298 und 306-310 im Kanal A sowie 127-129 und 265-277 im Kanal B.

Im Alignment-Bereich um Position 298 einer α -Helix sind in den *Micrococcus*-Sequenzen weniger polare Reste weiter außerhalb des Kanals lokalisiert, was die Einpassung längerer Alkyl-Ketten unterstützen könnte. Daher würde sich hier das Einbringen weiterer polarer Reste weiter innerhalb der Helix durch Punktmutationen anbieten, um den Einfluss auf die Substratspezifität zu testen. Im Alignment-Bereich 306-310 im Kanal A ist außen ein zusätzlicher starker polarer Arginin-Rest in die *Micrococcus*- und *Kytococcus*-Sequenzen eingefügt und stabilisierende teilweise große Reste weiter nach innen versetzt, was wiederum die Umsetzung längerer Alkyl-Ketten fördern könnte. Der Austausch des Arginin-Rests gegen Alanin verspricht am ehesten einen möglichen Einfluss der Position auf die Substratspezifität zu zeigen. Im Alignment-Bereich 127-129 des Alkyl-Kanal B ist laut Goblirsch *et al.* (2013) und Goblirsch *et al.* (2016) der Glutamat-Rest entscheidend für die Deprotonierung und Stabilisierung der Alkyl-Kette. Ein benachbarter, kleinerer hydrophober Rest in den *Micrococcus*-Sequenzen könnte hier die Stabilisierung und Umsetzung längerer Alkyl-Reste fördern. Daher ist durch eine Punktmutation der Rest gegen einen größeren Tryptophan- oder Tyrosin-Rest wie bei den *Kocuria*-Sequenzen auszutauschen um die Wirkung auf die Substratspezifität zu testen. Im Alignment-Bereich 265-277 unterstützen in den *Micrococcus*-Sequenzen großflächigere polare Bereiche des Schleifenbereichs, der dem Kanal B aufliegt, die Rückfaltung der Alkyl-Kette und damit möglicherweise längere Alkyl-Ketten der Substrate. Der sukzessive Austausch von polaren Resten gegen Alanin oder teilweise größere hydrophobe Reste in den *Micrococcus*-Sequenzen könnte zu einem Verlust der Substratspezifität führen.

Zusammenfassend konnten durch die Übertragung der Koordinaten der Alkyl-Kanäle des OleAs von *X. campestris* auf die OleAs der *Micrococcales* und ein vergleichendes Aminosäuresequenz-Alignment zwischen *Micrococcus*-, *Kocuria*- und *Kytococcus*-Sequenzen vier für die Substratspezifität möglicherweise entscheidende Proteinabschnitte identifiziert werden. Punktmutationen in diesen Bereichen wären als nächster Schritt nötig, um die gemachten Prognosen zu ihrer Rolle zu bestätigen.

7. Im Rahmen der Dissertation entstandene Veröffentlichungen

7.1. Zeitschriftenartikel

M. J. Surger, A. Angelov, P. Stier, M. Übelacker and W. Liebl, "Impact of branched-chain amino acid catabolism on fatty acid and alkene biosynthesis in *Micrococcus luteus*," *Front. Microbiol.*, vol. 8, article 374, 2018.

7.2. Poster-Präsentationen auf internationalen Fachkonferenzen

M. J. Surger, A. Angelov, M. Übelacker and W. Liebl, "Chain length and isomer determinants in actinobacterial olefin biosynthesis," at the Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), March 13-16, 2016, Jena, Germany.

M. J. Surger, A. Angelov, M. Übelacker and W. Liebl, "Impact of branched chain amino acid catabolism on fatty acid and hydrocarbon composition of *Micrococcus luteus*," at the 5th Joint Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM) & the Association for General and Applied Microbiology (VAAM): Microbiology and Infection, March 5-8, 2017, Würzburg, Germany.

7.3. Vorträge auf internationalen Fachkonferenzen

A. Angelov, M. J. Surger, M. Übelacker and W. Liebl, "Manipulation of the hydrocarbon biosynthesis pathway in *Micrococcus luteus*," at the Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), April 15-18, 2018, Wolfsburg, Germany.

8. Literaturangaben

- [1] J. L. Fortman, S. Chhabra, A. Mukhopadhyay, H. Chou, T. S. Lee, E. Steen, and J. D. Keasling, "Biofuel alternatives to ethanol: pumping the microbial well," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 7, pp. 375–381, 2008.
- [2] E. Breitmaier and G. Jung, *Organische Chemie: Grundlagen, Verbindungsklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur, Naturstoffe, Synthesepaltung, Nachhaltigkeit*. Thieme Verlag, 2012.
- [3] W. Walter and W. Francke, *Lehrbuch der organischen Chemie*. S. Hirzel Verlag, 2005.
- [4] T. P. Howard, S. Middelhaufe, K. Moore, C. Edner, D. M. Kolak, G. N. Taylor, D. A. Parker, R. Lee, N. Smirnov, S. J. Aves, and J. Love, "Synthesis of customized petroleum-replica fuel molecules by targeted modification of free fatty acid pools in *Escherichia coli*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 19, pp. 7636–7641, 2013.
- [5] U. Deppenmeier, "Biochemistry of methanogens," *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, vol. 71, pp. 223–283, 2002.
- [6] J. Fargione, J. Hill, D. Tilman, S. Polasky, and P. Hawthorne, "Land clearing and the biofuel carbon debt," *Science*, vol. 319, no. 5867, pp. 1235–1238, 2008.
- [7] C. Tsao, J. E. Campbell, S. N. Spak, G. R. Carmichael, and Y. Chen, "Increased estimates of air-pollution emissions from Brazilian sugar-cane ethanol," *Nat. Clim. Chang.*, vol. 2, pp. 53–57, 2011.
- [8] M. A. Delucchi, "Impacts of biofuels on climate change, water use, and land use," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1195, pp. 28–45, 2010.
- [9] T. Torto-Alalibo, E. Purwantini, J. Lomax, J. C. Setubal, B. Mukhopadhyay, B. M. Tyler, "Genetic resources for advanced biofuel production described with the gene ontology," *Front. Microbiol.*, vol. 5, article 528, 2014.
- [10] H. J. Janßen and A. Steinbüchel, "Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 7, no. 7, pp. 1–26, 2014.
- [11] A. Schirmer, M. A. Rude, X. Li, E. Popova, and S. B. del Cardayre, "Microbial biosynthesis of alkanes," *Science*, vol. 329, no. 5991, pp. 559–62, 2010.
- [12] N. Li, H. Norgaard, D. M. Warui, S. J. Booker, C. Krebs, and J. M. Bollinger Jr., "Conversion of fatty aldehydes to alka(e)nes and formate by a cyanobacterial aldehyde decarbonylase: cryptic redox by an unusual di-metal oxygenase," *J Am Chem Soc.*, vol. 133, no. 16, pp. 6158–6161, 2012.
- [13] R. M. Lennen, D. J. Braden, R. M. West, J. A. Dumesic, and F. Brian, "A process for microbial hydrocarbon synthesis: overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* and catalytic conversion to alkanes," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 106, no. 2, pp. 193–202, 2010.

- [14] M. A. Rude, T. S. Baron, S. Brubaker, M. Alibhai, S. B. Del Cardayre, and A. Schirmer, "Terminal olefin (1-alkene) biosynthesis by a novel P450 fatty acid decarboxylase from *Jeotgalicoccus* species," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 5, pp. 1718–27, Mar. 2011.
- [15] D. Mendez-Perez, M. B. Begemann, and B. F. Pfeleger, "Modular synthase-encoding gene involved in α -olefin biosynthesis in *Synechococcus* sp. strain PCC 7002," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 12, pp. 4264–7, Jun. 2011.
- [16] D. J. Sukovich, J. L. Seffernick, J. E. Richman, J. A. Gralnick, and L. P. Wackett, "Widespread head-to-head hydrocarbon biosynthesis in bacteria and role of OleA," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 12, pp. 3850–3862, Jun. 2010.
- [17] D. Dugar and G. Stephanopoulos, "Relative potential of biosynthetic pathways for biofuels and bio-based products," *Nat. Biotechnol.*, vol. 29, no. 12, pp. 1074–1078, 2011.
- [18] B. Pfeleger, M. Gossing, and J. Nielsen, "Metabolic engineering strategies for microbial synthesis of oleochemicals," *Metab. Eng.*, vol. 29, pp. 1–11, 2015.
- [19] C. R. Fischer, D. Klein-Marcuschamer, and G. Stephanopoulos, "Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production," *Metab. Eng.*, vol. 10, pp. 295–304, 2008.
- [20] R. M. Lennen and B. F. Pfeleger, "Microbial production of fatty acid-derived fuels and chemicals," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 1–10, 2013.
- [21] H. Alper and G. Stephanopoulos, "Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential?," *Nat. Rev.*, vol. 7, pp. 715–723, 2009.
- [22] P. W. Albro and C. K. Huston, "Lipids of *Sarcina lutea* II. hydrocarbon content of the lipid extracts," *J. Bacteriol.*, vol. 88, no. 4, pp. 981–6, Oct. 1964.
- [23] T. G. Tornabene, E. O. Bennett, and J. Oró, "Fatty acid and aliphatic hydrocarbon composition of *Sarcina lutea* grown in three different media," *J. Bacteriol.*, vol. 94, no. 2, pp. 344–8, Aug. 1967.
- [24] P. W. Albro, "Confirmation of the identification of the major C-29 hydrocarbons of *Sarcina lutea*," *J. Bacteriol.*, vol. 108, no. 1, pp. 213–218, 1971.
- [25] P. W. Albro and J. C. Dittmer, "The biochemistry of long-chain, nonisoprenoid hydrocarbons. I. characterization of the hydrocarbons of *Sarcina lutea* and the isolation of possible intermediates of biosynthesis," *Biochemistry*, vol. 8, no. 1, pp. 394–405, 1969.
- [26] P. W. Albro and J. C. Dittmer, "The biochemistry of long-chain, nonisoprenoid hydrocarbons. II. the incorporation of acetate and the aliphatic chains of isoleucine and valine into fatty acids and hydrocarbons by *Sarcina lutea* *in vivo*," *Biochemistry*, vol. 8, no. 3, pp. 953–959, 1969.
- [27] P. W. Albro and J. C. Dittmer, "The biochemistry of long-chain, nonisoprenoid hydrocarbons. IV. characteristics of synthesis by a cell-free preparation of *Sarcina lutea*," *Biochemistry*, vol. 8, no. 8, pp. 3317–3324, 1969.

- [28] L. Friedeman and B. Da Costa, "Hydrocarbon-producing genes and methods of their use," WO2008147781 A3, 2009.
- [29] H. R. Beller, E.-B. Goh, and J. D. Keasling, "Genes involved in long-chain alkene biosynthesis in *Micrococcus luteus*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 4, pp. 1212–1223, Feb. 2010.
- [30] D. J. Sukovich, J. L. Seffernick, J. E. Richman, K. A. Hunt, J. A. Gralnick, and L. P. Wackett, "Structure, function, and insights into the biosynthesis of a head-to-head hydrocarbon in *Shewanella oneidensis* strain MR-1," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 12, pp. 3842–3849, Apr. 2010.
- [31] J. A. Frias, J. E. Richman, J. S. Erickson, and L. P. Wackett, "Purification and characterization of OleA from *Xanthomonas campestris* and demonstration of a non-decarboxylative claisen condensation reaction," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 13, pp. 10930–10938, 2011.
- [32] B. R. Goblirsch, J. A. Frias, L. P. Wackett, and C. M. Wilmot, "Crystal structures of *Xanthomonas campestris* OleA reveal features that promote head-to-head condensation of two long-chain fatty acids," *Biochemistry*, vol. 51, no. 20, pp. 4138–4146, 2013.
- [33] B. R. Goblirsch, M. R. Jensen, F. A. Mohamed, L. P. Wackett, and C. M. Wilmot, "Substrate trapping in crystals of the thiolase OleA identifies three channels that enable long-chain olefin biosynthesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, pp. 26698–26706, 2016.
- [34] J. K. Christenson, J. E. Richman, M. R. Jensen, J. Y. Neufeld, C. M. Wilmot, and L. P. Wackett, "β-lactone synthetase found in olefin biosynthesis pathway," *ACS Paragon Plus Environ.*, vol. 55, no. 51, pp. 7043–7150, 2016.
- [35] J. K. Christenson, M. R. Jensen, B. R. Goblirsch, F. Mohamed, W. Zhang, C. M. Wilmot, and L. P. Wackett, "Active multi-enzyme assemblies for long-chain olefinic hydrocarbon biosynthesis," *J. Bacteriol.*, vol. 199, no. 9, pp. 1–11, 2017.
- [36] J. K. Christenson, S. L. Robinson, A. Engel, J. E. Richman, A. N. Kim, and L. P. Wackett, "OleB from bacterial hydrocarbon biosynthesis is a β-lactone decarboxylase that shares key features with haloalkane dehalogenases," *Biochemistry*, vol. 56, pp. 5278–5287, 2017.
- [37] R. M. Lennen and B. F. Pfeleger, "Engineering *Escherichia coli* to synthesize free fatty acids," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 12, pp. 659–667, 2012.
- [38] M. Tai and G. Stephanopoulos, "Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production," *Metab. Eng.*, vol. 15, pp. 1–9, 2013.
- [39] H. J. Janßen and A. Steinbüchel, "Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 7, no. 7, pp. 1–26, Jan. 2014.

- [40] F. Jing, D. C. Cantu, J. Tvaruzkova, J. P. Chipman, B. J. Nikolau, M. D. Yandeau-Nelson, and P. J. Reilly, "Phylogenetic and experimental characterization of an acyl-ACP thioesterase family reveals significant diversity in enzymatic specificity and activity," *BMC Biochem.*, vol. 12, no. 44, pp. 1–16, Jan. 2011.
- [41] N. Smirnova and K. A. Reynolds, "Branched-chain fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*," *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 27, pp. 246–251, 2001.
- [42] K. Qiao, T. M. Wasylenko, K. Zhou, P. Xu, and G. Stephanopoulos, "Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism," *Nat. Biotechnol.*, vol. 35, pp. 173–177, 2017.
- [43] J. A. Frias, J. E. Richman, and L. P. Wackett, "C29 olefinic hydrocarbons biosynthesized by *Arthrobacter species*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 6, pp. 1774–1777, Mar. 2009.
- [44] S. J. Morrison, T. G. Tornabene, and W. E. Kloos, "Neutral lipids in the study of relationships of members of the family *Micrococcaceae*," *J. Bacteriol.*, vol. 108, no. 1, pp. 353–8, Oct. 1971.
- [45] T. G. Tornabene, E. Gelpi, and J. Oró, "Identification of fatty acids and aliphatic hydrocarbons in *Sarcina lutea* by gas chromatography and combined gas chromatography-mass spectrometry," *J. Bacteriol.*, vol. 94, no. 2, pp. 333–343, 1967.
- [46] S. K. Oh, K. H. Han, and B. Stephen, "Molecular cloning, expression, and functional analysis of a cis-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana* implications in rubber biosynthesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 24, pp. 18482–18488, 2000.
- [47] Y. Saito and K. Ogura, "Biosynthesis of menaquinones. enzymatic prenylation of 1,4-dihydroxy-2-naphthoate by *Micrococcus luteus* membrane fractions," *J. Biochem.*, vol. 89, no. 5, pp. 1445–1452, 1981.
- [48] B. D. Faison, C. A. Cancel, S. N. Lewis, and H. I. Adler, "Binding of dissolved strontium by *Micrococcus luteus*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 56, no. 12, pp. 3649–3656, 1990.
- [49] M. F. Wong, H. Chua, W. Lo, C. K. Leung, and P. H. F. Yu, "Removal and recovery of copper (II) ions by bacterial biosorption," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 91–93, no. 1–9, pp. 447–457, 2001.
- [50] T. R. Sandrin and R. M. Maier, "Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants," *Environ. Health Perspect.*, vol. 111, no. 8, pp. 1093–1101, 2003.
- [51] M. Young, V. Artsatbanov, H. R. Beller, G. Chandra, K. F. Chater, L. G. Dover, E.-B. Goh, T. Kahan, A. S. Kaprelyants, N. Kyrpides, A. Lapidus, S. R. Lowry, A. Lykidis, J. Mahillon, V. Markowitz, K. Mavromatis, G. V. Mukamolova, A. Oren, J. S. Rokem, M. C. M. Smith, D. I. Young, and C. L. Greenblatt, "Genome sequence of the Fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living *Actinobacterium*," *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 3, pp. 841–860, 2010.

- [52] A. Fleming, "On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions," *Proc. R. Soc. London, B*, vol. 93, no. 653, pp. 306–317, 1922.
- [53] M. Kocur, Z. Páková, and T. Martinec, "Taxonomic status of *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872, and designation of the neotype strain," *Int. J. Sys. Bac.*, vol. 22, no. 4, pp. 218–223, 1972.
- [54] J. S. Rokem, W. Vongsangnak, and J. Nielsen, "Comparative metabolic capabilities for *Micrococcus luteus* NCTC 2665, the 'Fleming' strain, and *Actinobacteria*," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 108, no. 11, pp. 2770–2775, Nov. 2011.
- [55] W. Liebl, W. E. Kloos, and W. Ludwig, "Plasmid-borne macrolide resistance in *Micrococcus luteus*," *Microbiology*, vol. 148, pp. 2479–87, Aug. 2002.
- [56] W. E. Kloos and N. E. Rose, "Transformation mapping of tryptophan loci in *Micrococcus luteus*," *Genetics*, vol. 66, no. 4, pp. 595–605, 1970.
- [57] Y. Zhang, U. Werling, and W. Edelmann, "SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 8, pp. 1–10, 2012.
- [58] D. Kostner, B. Peters, M. Mientus, W. Liebl, and A. Ehrenreich, "Importance of *codB* for new *codA*-based markerless gene deletion in *Gluconobacter strains*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 18, pp. 8341–8349, 2013.
- [59] A. Angelov, H. Li, A. Geissler, B. Leis and W. Liebl, "Toxicity of indoxyl derivative accumulation in bacteria and its use as a new counterselection principle," *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 36, pp. 585–592, 2013.
- [60] G. Bertani, "Studies on lysogenesis I. the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, vol. 62, no. 3, pp. 293–300, 1951.
- [61] H. L. Wolin and H. B. Naylor, "Basic nutritional requirements of *Micrococcus lysodeikticus*," *J. Bacteriol.*, vol. 74, no. 2, pp. 163–167, 1957.
- [62] D. G. Gibson, L. Young, R. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison III, and H. O. Smith, "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases," *Nat. Methods*, vol. 6, no. 5, pp. 343–347, 2009.
- [63] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method," *Methods a companion to Methods Enzymol.*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [64] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [65] A. T. Tran, V. A. Huynh, E. M. Friz, S. K. Whitney, and D. B. Cordes, "A general method for the rapid reduction of alkenes and alkynes using sodium borohydride, acetic acid, and palladium," *Tetrahedron Lett.*, vol. 50, no. 16, pp. 1817–1819, 2009.

- [66] J. Shin, Y. Jung, D. Cho, M. Park, J. Park, and D. Kweon, "Enzyme and microbial technology display of membrane proteins on the heterologous caveolae carved by Caveolin-1 in the *Escherichia coli* cytoplasm," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 79–80, pp. 55–62, 2015.
- [67] P. J. Walser, N. Ariotti, M. Howes, C. Ferguson, R. Webb, D. Schwudke, N. Leneva, K. Cho, L. Cooper, J. Rae, M. Floetenmeyer, V. M. J. Oorschot, U. Skoglund, K. Simons, J. F. Hancock, and R. G. Parton, "Constitutive formation of caveolae in a bacterium," *Cell*, vol. 150, no. 4, pp. 752–763, 2012.
- [68] T. Kaneda, "*Iso*- and *anteiso*-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance," *Microbiol. Rev.*, vol. 55, no. 2, pp. 288–302, 1991.
- [69] L. Xin, H. Hong-ying, G. Ke, and S. Ying-xue, "Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.*," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 14, pp. 5494–5500, 2010.
- [70] J. H. Pereira, E.-B. Goh, J. D. Keasling, H. R. Beller, and P. D. Adams, "Structure of FabH and factors affecting the distribution of branched fatty acids in *Micrococcus luteus*," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 68, pp. 1320–1328, Oct. 2012.
- [71] L. K. Massey, J. R. Sokatch, and R. S. Conrad, "Branched-chain amino acid catabolism in bacteria," *Bacteriol. Rev.*, vol. 40, no. 1, pp. 42–54, 1976.
- [72] J. E. Cronan and G. L. Waldrop, "Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases," *Prog. Lipid Res.*, vol. 41, pp. 407–435, 2002.
- [73] Y. Namba, K. Yoshizawa, A. Ejima, T. Hayashi, and T. Kaneda, "Coenzyme A- and nicotinamide adenine dinucleotide-dependent branched chain alpha-keto acid dehydrogenase," *J. Biol. Chem.*, vol. 244, no. 16, pp. 4437–4447, 1969.
- [74] G. Wang, T. Kuriki, K. L. Roy, and T. Kaneda, "The primary structure of branched-chain alpha-oxo acid dehydrogenase from *Bacillus subtilis* and its similarity to other alpha-oxo acid dehydrogenases," *Eur. J. Biochem.*, vol. 213, no. 3, pp. 1091–1099, 1993.
- [75] K. Förster-Fromme and D. Jendrossek, "Biochemical characterization of isovaleryl-CoA dehydrogenase (LiuA) of *Pseudomonas aeruginosa* and the importance of *liu* genes for a functional catabolic pathway of methyl-branched compounds," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 286, pp. 78–84, 2008.
- [76] K. P. Battaile, T. V. Nguyen, J. Vockley, and J. P. Kim, "Structures of isobutyryl-CoA dehydrogenase and enzyme-product complex," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 16, pp. 16526–16534, 2004.
- [77] K. P. Battaile, J. Molin-Case, R. Paschke, M. Wang, D. Bennett, J. Vockley, and J.-J. P. Kim, "Crystal structure of rat short chain acyl-CoA dehydrogenase complexed with acetoacetyl-CoA," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 14, pp. 12200–12207, 2002.

- [78] S. Djordjevic, C. P. Pace, M. T. Stankovich, and J.-J. P. Kim, "Three-dimensional structure of butyryl-CoA dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*," *Biochemistry*, vol. 34, pp. 2163–2171, 1995.
- [79] K. A. Tiffany, D. L. Roberts, M. Wang, R. Paschke, A. A. Mohsen, J. Vockley, and J. P. Kim, "Structure of human isovaleryl-CoA dehydrogenase at 2.6 Å resolution: structural basis for substrate specificity," *Biochemistry*, vol. 36, no. 28, pp. 8455–8464, 1997.
- [80] Y. Zhang, C. D. Denoya, D. D. Skinner, R. W. Fedechko, H. A. I. McArthur, M. R. Morgenstern, R. A. Davies, S. Lobo, K. A. Reynolds, and C. R. Hutchinson, "Genes encoding acyl-CoA dehydrogenase (AcdH) homologues from *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* provide insights into the metabolism of small branched-chain fatty acids and macrolide antibiotic production," *Microbiology*, vol. 145, pp. 2323–2334, 1999.
- [81] M. Goujon, H. McWilliam, W. Li, F. Valentin, S. Squizzato, J. Paern, and R. Lopez, "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, pp. 695–699, 2010.
- [82] M. Kearse, R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Meintjes, and A. Drummond, "Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 12, pp. 1647–1649, 2012.
- [83] A. R. Parker, "Binding of the Human 'Electron Transferring Flavoprotein' (ETF) to the medium chain acyl-coa dehydrogenase (MCAD) involves an arginine and histidine residue," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 18, no. 5, pp. 453–462, 2015.
- [84] S. Djordjevic, Y. Dong, R. Paschke, F. E. Frerman, I. A. W. Strauss, and J. P. Kim, "Identification of the catalytic base in long chain acyl-CoA dehydrogenase," *Biochemistry*, vol. 33, no. 14, pp. 4258–4264, 1994.
- [85] R. D. Finn, P. Coghill, R. Y. Eberhardt, S. R. Eddy, J. Mistry, A. L. Mitchell, S. C. Potter, M. Punta, M. Qureshi, A. Sangrador-Vegas, G. A. Salazar, J. Tate, and A. Bateman, "The Pfam protein families database: towards a more sustainable future," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, pp. 279–285, 2016.
- [86] A. Marchler-Bauer and S. H. Bryant, "CD-Search: protein domain annotations on the fly," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, pp. 327–331, 2004.
- [87] N. Guex and M. C. Peitsch, "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling," *Electrophoresis*, vol. 18, no. 25, pp. 2714–23, 1997.
- [88] V. A. Simossis and J. Heringa, "PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, pp. 289–294, 2005.
- [89] K. Choi and R. J. Heath, "Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis," *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 2, pp. 365–370, 2000.

- [90] M. Suutari and S. Laakso, "Microbial fatty acids and thermal adaptation," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 20, no. 4, pp. 285–328, 1994.
- [91] A. K. Singh, Y. Zhang, K. Zhu, C. Subramanian, Z. Li, K. Jayaswal, C. Gatto, C. O. Rock, and B. J. Wilkinson, "FabH selectivity for *anteiso* branched-chain fatty acid precursors in low temperature adaptation in *Listeria monocytogenes*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 301, no. 2, pp. 188–192, 2010.
- [92] M. Unell, N. Kabelitz, J. K. Jansson, and H. J. Heipieper, "Adaptation of the psychrotroph *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 to growth temperature and the presence of phenols by changes in the *anteiso/iso* ratio of branched fatty acids," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 266, pp. 138–143, 2007.
- [93] T. Kaneda, "Stereoselectivity in the 2-methylbutyrate incorporation into *anteiso* fatty acids in *Bacillus subtilis* mutants," *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.*, vol. 960, no. 1988, pp. 10–18, 1988.
- [94] H. Cho and J. E. Cronan, "Defective export of a periplasmic enzyme disrupts regulation of fatty acid synthesis," *The Journal of biological chemistry*, vol. 270, no. 9, pp. 4216–4219, 03-Mar-1995.
- [95] P. Jiang and J. E. Cronan, "Inhibition of fatty acid synthesis in *Escherichia coli* in the absence of phospholipid synthesis and release of inhibition by thioesterase action," *J. Bacteriol.*, vol. 176, no. 10, pp. 2814–21, May 1994.
- [96] P. N. Black, C. C. Dirusso, A. K. Metzger, and T. L. Heimert, "Cloning, sequencing, and expression of the *fadD* gene of *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 35, pp. 25513–25520, 1992.
- [97] H. Matsuoka, K. Hirooka, and Y. Fujita, "Organization and function of the YsiA Regulon of *Bacillus subtilis* involved in fatty acid degradation," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 8, pp. 5180–5194, 2007.
- [98] J. W. Campbell and J. E. Cronan Jr, "The Enigmatic *Escherichia coli fadE* gene is *yafH*," *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 13, pp. 3759–3764, 2002.
- [99] Y. Fujita, H. Matsuoka, and K. Hirooka, "Regulation of fatty acid metabolism in bacteria," *Mol. Microbiol.*, vol. 66, no. 4, pp. 829–39, Nov. 2007.
- [100] E.-B. Goh, E. E. K. Baidoo, J. D. Keasling, and H. R. Beller, "Engineering of bacterial methyl ketone synthesis for biofuels," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 1, pp. 70–80, Jan. 2012.
- [101] R. J. Heath and C. O. Rock, "Regulation of fatty acid elongation and initiation by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 4, pp. 1833–1837, 1996.
- [102] M. S. Davis and J. E. Cronan Jr., "Inhibition of *Escherichia coli* acetyl coenzyme a carboxylase by acyl-acyl carrier protein," *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 4, pp. 1499–1503, 2001.
- [103] F. E. Frerman, "Acyl-CoA dehydrogenases, electron transfer flavoprotein and electron transfer flavoprotein dehydrogenase," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 16, no. 3, pp. 416–418, 1988.

9. Anhang

9.1. Olefin- und Fettsäureprofile aller *Micrococcales*-Stämme

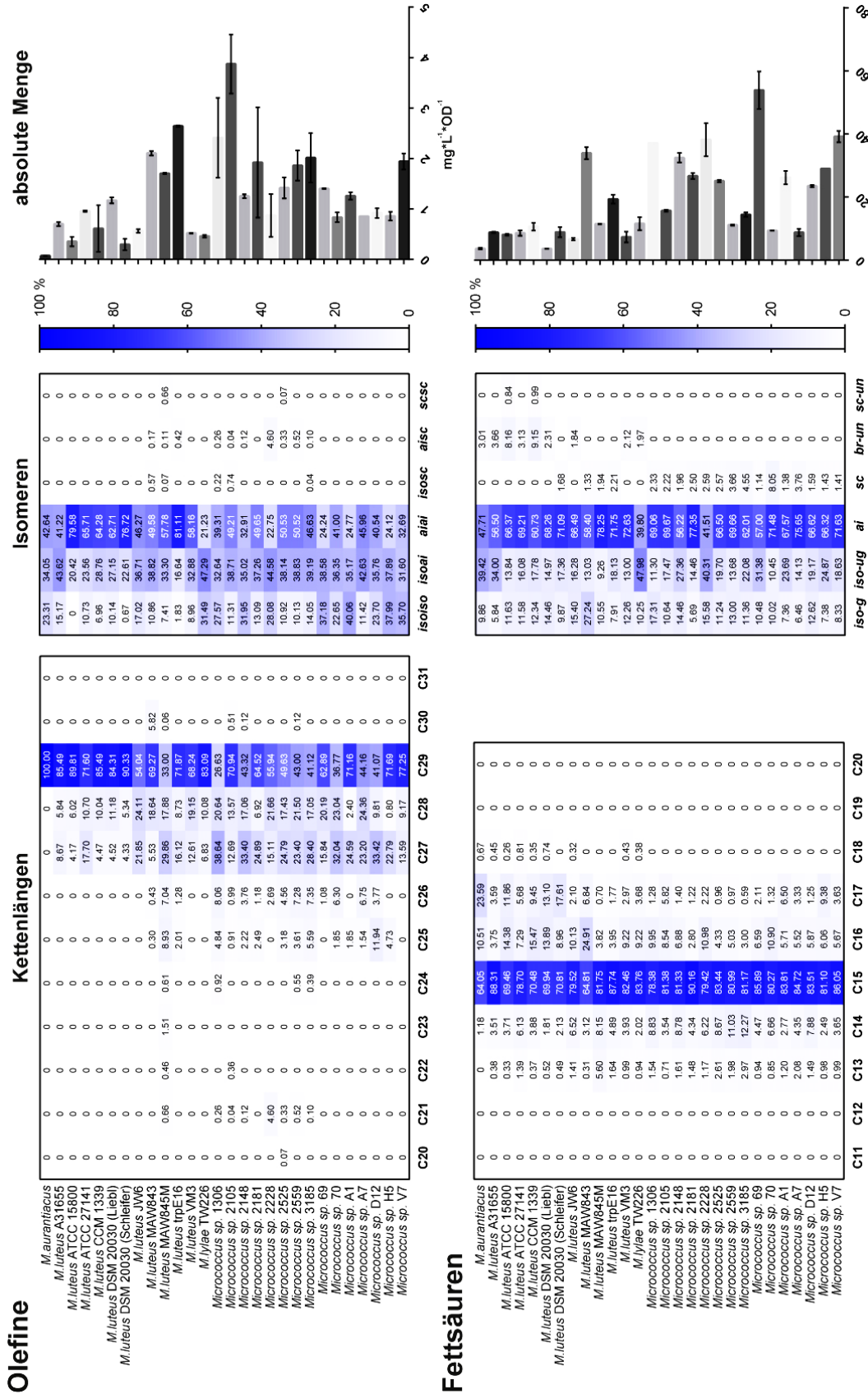


Abbildung 77: Zusammenstellung von Olefin- (oben) und Fettsäureprofilen (unten) aller untersuchter *Micrococcus*-Stämme. Die Profile setzen sich aus den gebildeten Kettenlängen (links), den Isomeren (Mitte) und den absoluten Mengen (rechts) zusammen. Gezeigt sind i.d.R. zwei biologische Replikate. Die Standardabweichungen der Prozentwerte liegen bei maximal 12 % (i.d.R. 5 %).

Olefine

Kettenlängen

<i>K. rosea</i> (Liebl)	0	0	0.81	6.86	19.65	66.35	4.92	1.42	0	0	0	0
<i>K. rosea</i> (Schleifer)	0	0	1.10	3.92	16.51	72.46	3.87	2.14	0	0	0	0
<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925	3.99	6.53	7.86	47.41	25.47	8.75	0	0	0	0	0	0
<i>Kocuria palustris</i> DSM 20319	0	5.01	6.61	46.84	29.95	8.99	1.34	0.20	0	0.99	0	0
<i>Kocuria palustris</i> DSM 20320	0	4.54	8.63	41.98	35.09	7.62	0.98	0	0	0.37	0	0
<i>Kocuria</i> sp. 3312	2.00	2.91	3.93	30.72	19.49	40.08	0.86	0	0	0	0	0
<i>Kocuria</i> sp. 3352	0	0.27	0.32	9.76	11.60	63.56	4.00	9.88	0.26	0.36	0	0
<i>Kocuria</i> sp. MAW846M	0	1.82	4.12	26.93	30.47	32.87	1.77	0.94	0.10	0.61	0	0
<i>Kocuria</i> sp. AT3343	0	0	0	3.10	10.21	82.44	0.58	3.10	0.57	0	0	0
	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31

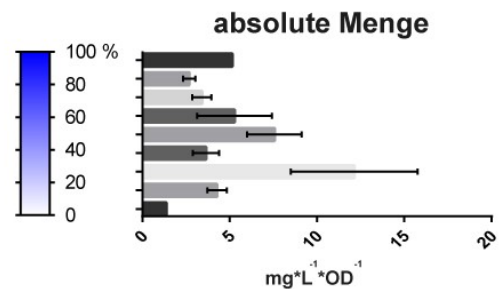
Fettsäuren

<i>K. rosea</i> (Liebl)	0	0	0	3.77	93.06	1.29	1.89	0	0	0
<i>K. rosea</i> (Schleifer)	0	0	0	4.11	88.59	4.93	2.36	0	0	0
<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925	0	0	1.74	7.89	78.34	4.04	7.99	0	0	0
<i>Kocuria palustris</i> DSM 20319	0	0	0	4.37	78.01	8.68	8.94	0	0	0
<i>Kocuria palustris</i> DSM 20320	0	0	0.41	3.71	84.70	6.68	4.50	0	0	0
<i>Kocuria</i> sp. 3312	0	0	1.59	8.76	72.48	10.79	6.37	0	0	0
<i>Kocuria</i> sp. 3352	0	0	3.86	4.58	64.96	9.38	17.21	0	0	0
<i>Kocuria</i> sp. MAW846M	0	0	1.56	7.21	70.52	12.12	8.59	0	0	0
<i>Kocuria</i> sp. AT3343	0	0	0.84	2.52	87.54	4.74	1.74	2.62	0	0
	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20

Olefine

Isomeren

<i>K. rosea</i> (Liebl)	19.77	34.94	24.21	7.33	11.83	1.12
<i>K. rosea</i> (Schleifer)	17.88	30.80	34.35	6.10	10.88	0
<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925	11.33	22.62	14.62	5.56	7.09	24.24
<i>Kocuria palustris</i> DSM 20319	20.52	11.20	6.16	38.16	1.98	21.91
<i>Kocuria palustris</i> DSM 20320	28.59	15.25	4.61	35.47	3.61	11.68
<i>Kocuria</i> sp. 3312	63.51	6.81	2.77	8.80	5.71	12.40
<i>Kocuria</i> sp. 3352	58.93	22.76	15.12	1.84	1.35	0
<i>Kocuria</i> sp. MAW846M	53.89	13.94	1.87	10.56	3.27	14.28
<i>Kocuria</i> sp. AT3343	23.97	39.56	27.24	4.17	5.06	0
	isoiso	isoai	ai	isosc	aisc	scsc



Fettsäuren

<i>K. rosea</i> (Liebl)	1.75	22.52	72.13	3.60	0	0
<i>K. rosea</i> (Schleifer)	3.62	19.66	71.16	5.55	1.43	2.86
<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925	9.65	8.22	79.86	2.28	0	0
<i>Kocuria palustris</i> DSM 20319	8.34	8.94	78.01	4.71	0	0
<i>Kocuria palustris</i> DSM 20320	6.08	4.85	84.76	4.31	0	0
<i>Kocuria</i> sp. 3312	10.42	17.76	61.62	10.21	0	0
<i>Kocuria</i> sp. 3352	11.69	29.13	56.31	2.87	0	0
<i>Kocuria</i> sp. MAW846M	10.65	10.62	69.05	18.20	0	0
<i>Kocuria</i> sp. AT3343	1.89	25.25	62.66	0	10.20	1.68
	iso-g	iso-ug	ai	sc	br-un	sc-un

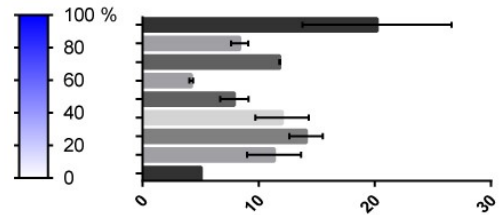


Abbildung 78: Zusammenstellung von Olefin- (1./3. Zeile) und Fettsäureprofilen (2./4. Zeile) aller untersuchter *Kocuria*-Stämme. Die Profile setzen sich aus den gebildeten Kettenlängen (1./2. Zeile), den Isomeren und den absoluten Mengen (3./4. Zeile) zusammen. Gezeigt sind i.d.R. zwei biologische Replikate. Die Standardabweichungen der Prozentwerte liegen bei maximal 6 % (i.d.R. 1-3 %).

Olefine

Kettenlängen

<i>Arthrobacter agilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	20.00	18.96	56.59	4.45	0
<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0
<i>Arthrobacter aurescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0
<i>Arthrobacter citreus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0
<i>Arthrobacter crystallopoites</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0
<i>Arthrobacter oxydans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0
<i>Arthrobacter sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	10.02		89.98	0	0
<i>Arthrobacter sulfureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0
<i>Arthrobacter uratoxydans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0

Fettsäuren

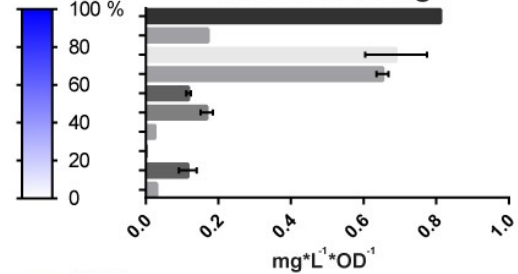
<i>Arthrobacter agilis</i>	0	0	0.02	1.81	64.66	19.65	13.41	0.44	0	0
<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	0	0	0.03	0.63	65.02	6.16	28.09	0.07	0	0
<i>Arthrobacter aurescens</i>	0	0	0	0.54	79.56	4.56	15.22	0.12	0	0
<i>Arthrobacter citreus</i>	0	0	0	0.91	88.45	3.39	6.29	0.96	0	0
<i>Arthrobacter crystallopoites</i>	0	0	0	0.64	67.89	7.34	24.01	0.12	0	0
<i>Arthrobacter oxydans</i>	0	0	0	0.79	77.21	5.16	16.76	0.07	0	0
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	0	0	0	1.62	58.98	15.39	23.84	0.17	0	0
<i>Arthrobacter sp.</i>	0	0.06	0	1.30	63.39	11.06	22.85	1.35	0	0
<i>Arthrobacter sulfureus</i>	0	0	0	1.04	85.09	5.59	8.12	0.16	0	0
<i>Arthrobacter uratoxydans</i>	0	0	0	0.83	67.41	6.34	25.22	0.19	0	0

Olefine

Isomeren

<i>Arthrobacter agilis</i>	35.14	46.37	13.87	3.01	1.60	0
<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	0	10.48	89.52	0	0	0
<i>Arthrobacter aurescens</i>	13.31	19.62	67.08	0	0	0
<i>Arthrobacter citreus</i>	0	15.00	85.00	0	0	0
<i>Arthrobacter crystallopoites</i>	12.40	17.43	70.17	0	0	0
<i>Arthrobacter oxydans</i>	0	35.04	64.96	0	0	0
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	10.98	21.39	67.63	0	0	0
<i>Arthrobacter sp.</i>	16.27	51.24	32.49	0	0	0
<i>Arthrobacter sulfureus</i>	6.94	24.61	68.45	0	0	0
<i>Arthrobacter uratoxydans</i>	27.17	48.53	24.31	0	0	0

absolute Menge



Fettsäuren

<i>Arthrobacter agilis</i>	17.38	13.23	64.87	4.52	0	0
<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	6.14	19.55	73.60	0.72	0	0
<i>Arthrobacter aurescens</i>	4.14	12.38	82.41	1.08	0	0
<i>Arthrobacter citreus</i>	2.51	18.17	76.47	2.85	0	0
<i>Arthrobacter crystallopoites</i>	7.17	3.80	88.09	0.93	0	0
<i>Arthrobacter oxydans</i>	5.18	4.51	89.46	0.85	0	0
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	9.05	13.93	68.89	8.12	7.36	4.25
<i>Arthrobacter sp.</i>	7.74	18.84	67.08	6.33	7.18	3.35
<i>Arthrobacter sulfureus</i>	5.60	23.11	70.09	1.19	0.16	0
<i>Arthrobacter uratoxydans</i>	5.96	35.43	57.07	1.54	0	0

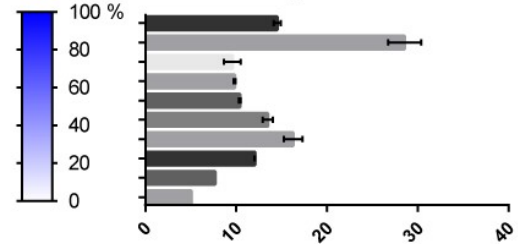


Abbildung 79: Zusammenstellung von Olefin- (1./3. Zeile) und Fettsäureprofilen (2./4. Zeile) aller untersuchter *Arthrobacter*-Stämme. Die Profile setzen sich aus den gebildeten Kettenlängen (1./2. Zeile), den Isomeren und den absoluten Mengen (3./4. Zeile) zusammen. Gezeigt sind i.d.R. zwei biologische Replikate. Die Standardabweichungen der Prozentwerte liegen bei maximal 15 % (i.d.R. 1-2 %).

Olefine

Kettenlängen

<i>Brevibacterium casei</i> (Schleifer, 491)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94.66	5.34	0
<i>Brevibacterium casei</i> (Schleifer, 492)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0
<i>Brevibacterium</i> sp. Ap13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0
<i>Curatobacterium albidum</i> *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	87.35	12.65	0
<i>Curatobacterium citreum</i> *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0
<i>Curatobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i> *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0
<i>Curatobacterium luteum</i> *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0
<i>Curatobacterium pusillum</i> *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00	0	0

C20 C21 C22 C23 C24 C25 C26 C27 C28 C29 C30 C31

Fettsäuren

<i>Brevibacterium casei</i> (Schleifer, 491)	0	0	0.04	0.12	49.64	3.70	46.44	0.08	0	0
<i>Brevibacterium casei</i> (Schleifer, 492)	0	0	0	0.10	46.27	3.12	50.30	0.21	0	0
<i>Brevibacterium</i> sp. Ap13	0	0	0.01	0.25	53.07	5.39	41.15	0.13	0	0
<i>Curatobacterium albidum</i> *	0	0	0	1.00	48.72	18.88	31.17	0.24	0	0
<i>Curatobacterium citreum</i> *	0	0	0	1.30	49.42	16.41	32.68	0.20	0	0
<i>Curatobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i> *	0	0	0.06	0.46	62.46	7.71	29.15	0.16	0	0
<i>Curatobacterium luteum</i> *	0	0	0.24	0.77	79.31	4.80	14.68	0.19	0	0
<i>Curatobacterium pusillum</i> *	0	0	0	0.35	39.36	5.20	54.46	0.64	0	0

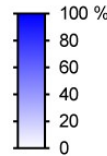
C11 C12 C13 C14 C15 C16 C17 C18 C19 C20

Olefine

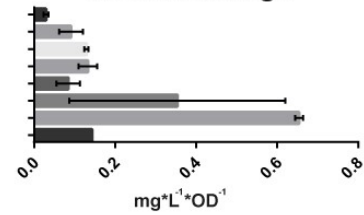
Isomeren

<i>Brevibacterium casei</i> (Schleifer, 491)	0	26.20	73.80	0	0	0
<i>Brevibacterium casei</i> (Schleifer, 492)	3.97	21.23	74.80	0	0	0
<i>Brevibacterium</i> sp. Ap13	13.68	37.69	48.63	0	0	0
<i>Curatobacterium albidum</i> *	0	20.04	79.96	0	0	0
<i>Curatobacterium citreum</i> *	0	0	100.00	0	0	0
<i>Curatobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i> *	0	0	100.00	0	0	0
<i>Curatobacterium luteum</i> *	18.44	20.42	61.14	0	0	0
<i>Curatobacterium pusillum</i> *	0	10.41	89.59	0	0	0

isoiso isoai ai ai isosc aisc scsc



absolute Menge



Fettsäuren

<i>Brevibacterium casei</i> (Schleifer, 491)	3.35	10.83	85.28	0.54	0	0	0
<i>Brevibacterium casei</i> (Schleifer, 492)	2.91	10.17	86.40	0.52	0	0	0
<i>Brevibacterium</i> sp. Ap13	19.71	1.96	77.93	0.40	0	0	0
<i>Curatobacterium albidum</i> *	17.38	1.90	80.20	0.52	0	0	0
<i>Curatobacterium citreum</i> *	7.97	1.57	90.10	0.35	0	0	0
<i>Curatobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i> *	4.20	9.33	84.90	1.56	0	0	0
<i>Curatobacterium luteum</i> *	4.54	5.40	64.64	1.87	23.56	0	0.37
<i>Curatobacterium pusillum</i> *	30.29	0.70	68.29	0.72	0	0	0

iso-g iso-ug ai sc cyclo br-un sc-un

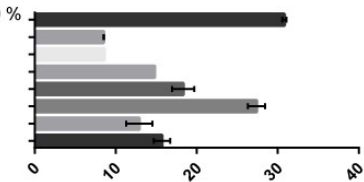
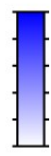
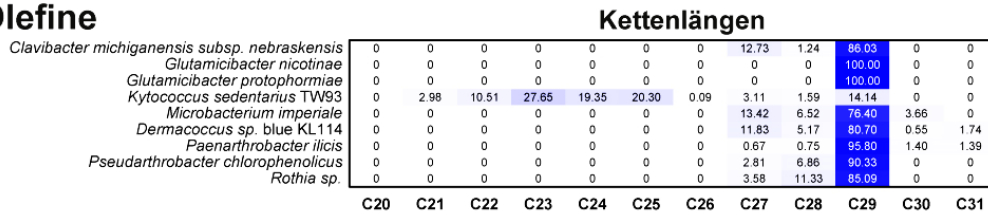
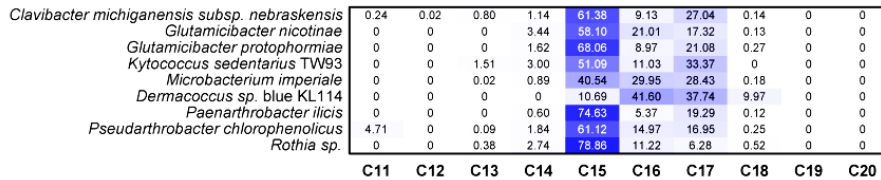


Abbildung 80: Zusammenstellung von Olefin- (1./3. Zeile) und Fettsäureprofilen (2./4. Zeile) aller untersuchter *Brevibacteria/Curatobacteria*-Stämme. Die Profile setzen sich aus den gebildeten Kettenlängen (1./2. Zeile), den Isomeren und den absoluten Mengen (3./4. Zeile) zusammen. Gezeigt sind i.d.R. zwei biologische Replikate. Die Standardabweichungen der Prozentwerte liegen bei maximal 6 % (i.d.R. 1-3 %). * homotypisches Synonym zum entsprechenden *Brevibacterium*-Stamm.

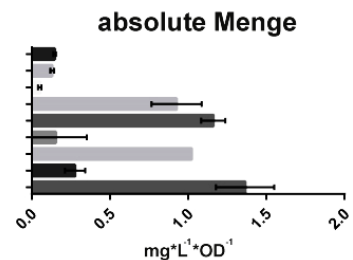
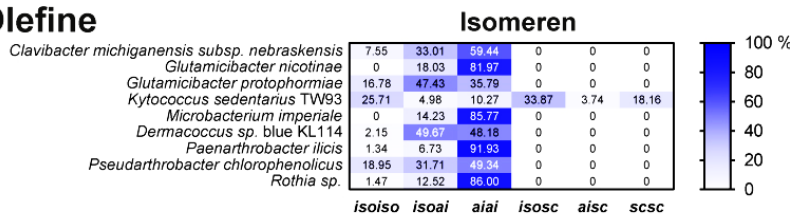
Olefine



Fettsäuren



Olefine



Fettsäuren

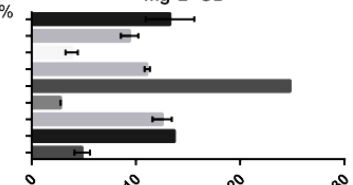
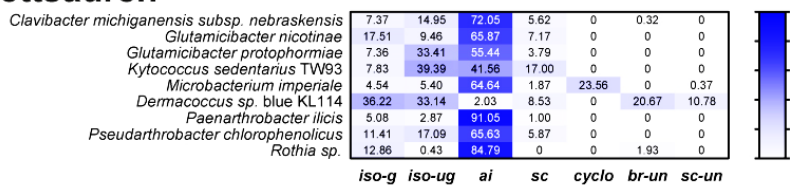
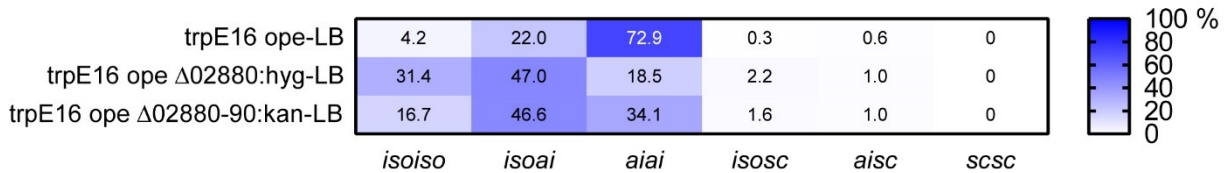


Abbildung 81: Zusammenstellung von Olefin- (1./3. Zeile) und Fettsäureprofilen (2./4. Zeile) aller untersuchter Einzel-Stämme. Die Profile setzen sich aus den gebildeten Kettenlängen (1./2. Zeile), den Isomeren und den absoluten Mengen (3./4. Zeile) zusammen. Gezeigt sind i.d.R. zwei biologische Replikate. Die Standardabweichungen der Prozentwerte liegen bei maximal i.d.R. 7 %.

9.2. Isomeren-Verteilung der Mutante trpE16 ope Δ02880-90:kan

A

Olefin-Isomeren-LB



B

Fettsäure-Isomeren-LB

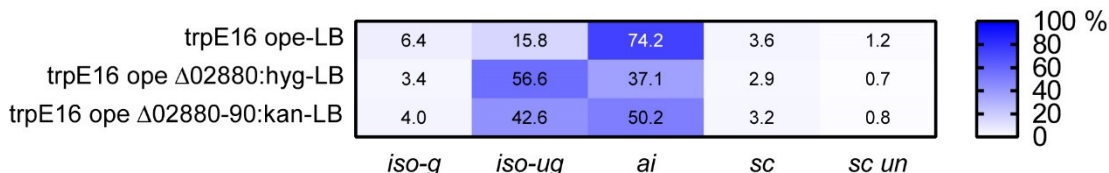


Abbildung 82: Verteilung der Olefin- (A) und Fettsäure-Isomeren (B) der Deletions-Mutante trpE16 Δ02880:hyg und der Doppel-Deletions-Mutante trpE16 ope Δ02880-90:kan im Vergleich zum Ausgangsstamm trpE16 ope in der stationären Phase nach Wachstum in LB-Medium. Es sind Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten aufgetragen. Die Standardabweichung der Prozentwerte beträgt maximal 2 %.

9.3. RNA-Sequenzierungsergebnis: Starke Promotoren

Tabelle 42: RNA-Sequenzierungsergebnis der RNA-Proben von *M. luteus* trpE16 in exponentieller Phase nach Wachstum in Naylor- und LB-Medium für die jeweils 30 am stärksten transkribierten ORFs. Die Daten entstammen jeweils zwei technischen Messungen eines biologischen Replikats.

Rang	ORF	RPKM in Nay	ORF	RPKM in LB
1	Mlut_19390	4435	Mlut_03880	88938
2	Mlut_10120	2017	Mlut_14270	88639
3	Mlut_17260	1847	Mlut_01550	22167
4	Mlut_09190	1675	Mlut_03590	5962
5	Mlut_04110	1452	Mlut_14550	5084
6	Mlut_08680	1402	Mlut_04090	4820
7	Mlut_11140	1386	Mlut_02490	4491
8	Mlut_17270	1384	Mlut_19160	3928
9	Mlut_04090	1362	Mlut_19520	3621
10	Mlut_09740	1263	Mlut_15570	3480
11	Mlut_16550	1219	Mlut_10450	3415
12	Mlut_03350	1128	Mlut_11340	3065
13	Mlut_17200	1083	Mlut_01460	3031
14	Mlut_01550	1041	Mlut_02690	2994
15	Mlut_03770	912	Mlut_03770	2919
16	Mlut_19180	880	Mlut_16340	2643
17	Mlut_08190	878	Mlut_07420	2610
18	Mlut_13690	853	Mlut_16550	2563
19	Mlut_07090	840	Mlut_15640	2541
20	Mlut_16980	824	Mlut_09300	2536
21	Mlut_23250	803	Mlut_00560	2355
22	Mlut_19160	801	Mlut_21430	2284
23	Mlut_17060	798	Mlut_00660	2251
24	Mlut_14650	787	Mlut_03320	2024
25	Mlut_23260	767	Mlut_00700	1967
26	Mlut_00660	758	Mlut_21320	1744
27	Mlut_10450	751	Mlut_01530	1732
28	Mlut_01870	706	Mlut_18730	1531
29	Mlut_12750	678	Mlut_17200	1438
30	Mlut_22090	673	Mlut_22130	1298

Tabelle 43: Liste von Genen mit den aktuellen Annotationen ihrer codierten Funktion, deren Promotoren laut eigenem RNA-Sequenzierungsergebnissen zu den stärksten 30 Promotoren im LB- und/oder Naylor-Medium zählen. Diese Liste dient als Ergänzung zu Tabelle 42.

ORF	Codierte Funktion
Mlut_00560	Molekulares Chaperon DnaK
Mlut_00660	Hypothetisches Protein
Mlut_00700	Hypothetisches Protein
Mlut_01460	Polyketid Cyclase
Mlut_01530	Hypothetisches Protein
Mlut_01550	Hypothetisches Protein
Mlut_01870	Phenylalanin-tRNA
Mlut_02490	Hypothetisches Protein
Mlut_02690	Serin-tRNA
Mlut_03320	Serin-tRNA
Mlut_03350	Response-Regulator
Mlut_03590	Hypothetisches Protein
Mlut_03770	Transkriptions-Regulator
Mlut_03880	5s ribosomale RNA
Mlut_04090	Molekulares Chaperon GroEL
Mlut_04110	TypVII Sekretionsziel
Mlut_07090	30s ribosomales Protein S15
Mlut_07420	Hypothetisches Protein
Mlut_08190	ATP Synthase ϵ -Kette
Mlut_08680	Glutamat-tRNA
Mlut_09190	50s ribosomales Protein L19
Mlut_09300	acyl-carrier-protein
Mlut_09740	ssDNA-Bindeprotein
Mlut_10120	50s ribosomales Protein L27
Mlut_10450	Hypothetisches Protein
Mlut_11140	30S ribosomal protein S1
Mlut_11340	Superoxid-Dismutase
Mlut_12750	30S ribosomal protein S4
Mlut_13690	Zellteilungsprotein, Transkriptions-Repressor
Mlut_14270	5s ribosomale RNA
Mlut_14550	Stress-Antwort, Membranprotein
Mlut_14650	Flagellen-Protein
Mlut_15570	ABC-Transporter, Substrat-Bindungsprotein
Mlut_15640	Ferritin
Mlut_16340	Glutamine Amidotransferase
Mlut_16550	Molekulares Chaperon GroES
Mlut_16980	50s ribosomales Protein L15
Mlut_17060	50s ribosomales Protein L14
Mlut_17200	Elongationsfaktor
Mlut_17260	50s ribosomales Protein L7/L12
Mlut_17270	50s ribosomales Protein L10
Mlut_18730	Hypothetisches Protein
Mlut_19160	Wirt-Integrationsfaktor
Mlut_19180	50s ribosomales Protein L33
Mlut_19390	Kälteschock-Protein
Mlut_19520	Hypothetisches Protein
Mlut_21320	Hypothetisches Protein
Mlut_21430	Zink-abhängige Alkohol-Dehydrogenase
Mlut_22090	Eisen ABC-Transporter Permease
Mlut_22130	NAD-abhängige Dehydratase
Mlut_23250	ssDNA-Bindeprotein
Mlut_23260	30s ribosomales Protein S6

9.4. Primer-Tabellen für Klonierungen

Tabelle 44: Liste mit Primern und zugehörigen Templates für die PCRs der Klonierungen zur Erstellung aller in dieser Arbeit verwendeten bzw. erzeugten Mutanten von *M. luteus* trpE16. Die Tabelle hält auch die Mutationsart einer Mutante fest und damit den Hinweis auf die verwendete Klonierungsstrategie aus Abschnitt „4.6.9.1. Klonierungsstrategien“.

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
ope-1	GTAAACGACGGCCAGTGCCACCATCTTGGTGGGCTGGAAGTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope - Markerloser Promotoraustausch*
ope-2	CGACTGCTAGGGTGGTGGTATC		
ope-3	TACCACCACCCTAGCAGTCGCACCGGGCCAGACTACGGAAC		
ope-4	GCGTTGCCGGACACGTTTCGTCACGTTGATACCTCCAGGG		
ope-5	ACGAACGTGTCCGGCAACGC		
ope-6	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCTGCTCCTCAGCTCACCATTCG		
accAD-1	TAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCAGCGCAGCGCATCCAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope AFB1
accAD-2	GCCCGGGCCCGGGAGGCGAGCCCCAGCCGGGCGATCGC		<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ 02900 Δ fadE4 AFB1
accAD-3	TCGCTCCCCGGGCCCGGGC		- Markerlose Gendeletion
accAD-4	GCTCGGTACCCGGGGATCCTTGCCGGTCCGCTTCGCGGCC		
accAD-5	TAAAACGACGGCCAGTGCCAACGACGAGCGCTCCTGGACC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope AFB12
accAD-6	ACGGCCGCGCAGCGGGCGGAAGTGGAGTCTCTCGGATCG		<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ 02900 Δ fadE4 AFB12
accAD-7	CGTCCAGAAAGGACCTGCACGTGTCTCAGCGCCGAGAT		-
accAD-8	GCTCGGTACCCGGGGATCCTAGGGTGTGACCCGCGGTGC		- Markerloser Promotoraustausch
P04090-1	TCCGCCCGTCGCGCGGCCGT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope AFB123
P04090-2	GTGCAGGTCTTTCTGGAC		
accBC-1	TAAAACGACGGCCAGTGCCACGCGAGTGGCCACGTCCCC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ 02900 Δ fadE4 AFB123
accBC-2	GAGGCGTGGGGCGCGGTGTGACGTCCTCCTTGTGGTGGTC		-
accBC-3	ACGAAGAAGGAGTGTGACGCGTACCGATCCCGATCTGAC		- Markerloser Promotoraustausch
accBC-4	GCTCGGTACCCGGGGATCCTGTTGCGCAGCAGCCACG		
P16550-1	CACACCGCGCCCCACGCCTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope AFB1234
P16550-2	GCTGCACACTCCTTCTTCGT		
fabH-1	TAAAACGACGGCCAGTGCCACGCGATCTGCCGGGATGGC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ 02900 Δ fadE4 AFB1234
fabH-2	CACCAGGAGGACTTGGTCACGGTGCCTCTCTCTGCCGGGC		-
fabH-3	ACGTCCCATAGGGAGGACCCATGACCGTACCCTGAAGCA		- Markerloser Promotoraustausch
fabH-4	GCTCGGTACCCGGGGATCCTTCTGACGGCCAGACCGCCG		
P19160-1	GTGACCAAGTCTCCTGGTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope AFB12345
P19160-2	GGGTCCTCCCTATGGGACGT		
BCKD-1	TAAAACGACGGCCAGTGCCACGGCGCCGCTCCTCGGCGTGA	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ 02900 Δ fadE4 AFB12345
BCKD-2	CCACCTCGCCGAGGTGCGCTGGACTGCCTTCCGATCGAC		-
BCKD-3	ACTGAAAGGGGCACAACAACGTGACCCTCGTGGACCACAC		- Markerloser Promotoraustausch
BCKD-4	GCTCGGTACCCGGGGATCCTTGCAGCTCGTCCGCTCG		
P03770-1	GCGCACCTGCGGCGAGGTGG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope AFB12345
P03770-2	GTTGTTGTGCCCTTTCAGT		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
olex-1	ATCTTGGTGGGCTGGAAGTG	<i>M. luteus</i> trpE16 ope gDNA	
olex-sdh-2	GGTTGATACCTCCAGGGGGG		
olex-6	GAGTTCTTCTGAGCGGGACTCGCGATGCTCGAGATCGAATG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope olex-sdh-2148:kan
olex-7	ATGTCCACCAGCGCCGTGACTC		
olex-2148-1	CCCCCTGGAGGTATCAACCGTGTCCGGCAACGCCAGTTA	<i>Micrococcus</i> sp. 2148 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope olex-sdh-3352:kan
olex-2148-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTTCACCATTGATCTCGAGCA		
olex-3352-1	CCCCCTGGAGGTATCAACCTCAGGGAACCTCCATCATCAG	<i>Kocuria</i> sp. 3352 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope olex-sdh-20319:kan
olex-3352-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTTCACCAGTCGATCTCCATGA		
olex-20319-1	CCCCCTGGAGGTATCAACCTTGCCAGGGAACCTCCATCAT	<i>Kocuria palustris</i> DSM 20319 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope olex-sdh-TW93:kan - Genaustausch
olex-20319-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTTCACCAGTCGATCTCCATGA		
olex-TW93-1	CCCCCTGGAGGTATCAACCATGCCGGCAACGCCACCTT	<i>Kytococcus</i> <i>sedentarius</i> TW93 gDNA	
olex-TW93-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTTCACCACTCGACCTCGGCGC		
14220-1	GGCGATTACCCAGGTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope P _{up} 14220:kan - Promotoraustausch
14220-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGTTCCTTCCGCGAGCCG		
14220-3	GAAGAAGGAGTGTGACGATGCCCTACACCCCGGACGTC		
14220-4	AACTTGCGCACCAGCCGTTC		
Psp-14-1	AGTTCTTCTGAGCGGGACTCCACACCGCGCCCCACGCCCTC	pWLTK6	
Psp-14-2	GCTGCACACTCCTTCTTCGT		
Kan-F2	AGGTTGGGAAGCCCTGCAAAG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 P _{up} 09320:kan <i>M. luteus</i> trpE16 ope P _{up} 09320:kan - Promotoraustausch
Kan-R3	GAGTCCCGCTCAGAAGAACT		
P14-fabH-1	GCGAGCACATCCTCCACTAC		
P14-fabH-2	GAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGTTTGGAGGGTTTCTAC		
P14-fabH-3	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCACACCGCGCCCCACGCCTC		
P14-fabH-4	GGGCACACGATGGCAAGCATGCTGCACACTCCTTCTTCGT		
P14-fabH-5	ATGCTTGCCATCGTGTGCC	pWLTK6	
P14-fabH-6	TCGTGCTGCTTCAGGGTGAC		
Kan-F2	(siehe oben)	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02440:kan <i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ02440:kan - Gendeletion
Kan-R3	(siehe oben)		
244-1	GTAAACGACGGCCAGTGCCAACGTGCTCGATCGCGTTGTC		
244-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTAGGTGGTCATGGCCCTACTC		
244-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAAAGGTGTGACCCGCATCTTC	pWLTK6	
244-4	GCTCGGTACCCGGGATCCTGAGCATCCTGGACACCCGTTTC		
Kan-F2	(siehe oben)	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02780-90:kan <i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02780-90:kan - Gendeletion
Kan-R2	TTTCATAGAAGCGGCGGTGG		
02780-90-1	GCGCTCAGAGGATGTTGTC		
02780-90-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTAGGATCTTACGGCCTCTC		
02780-90-3	ACCGCCGCTTCTATGAAATGAACCGGTGCGGGCGCGGTC	pWLTK6	
02780-90-4	TCCTTCGTCGGAGTGAAGTTG		
Kan-F2	(siehe oben)	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02820:kan <i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02820:kan <i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ02820:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		
282-1	GTAAACGACGGCCAGTGCCATGACCTGCACCTGGACCATC		
282-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTACCAGGGCCTTCTGGTCATC		
282-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAAGTGTGACCCGGATCCTTGAG	pWLTK6	
282-4	GCTCGGTACCCGGGATCCTGCGACGAGTACGCGATGAAC		
Kan-F2	(siehe oben)	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	
Kan-R2	(siehe oben)		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
02880H-1	CGCGTGGTCCAACCTCTTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg - Gendeletion
02880H-2	AGATCGCTGAGATAGGTGCCGCTTCTCATGGCGCTCCAG		
02880H-3	GACGCCCGGGCCGCCCGCACCTCCTCTGACGCGCTCCC		
02880H-4	TCATCGCCGGGAAGTTGAAGGG		
hygB-F1	GGCACCTATCTCAGCGATCTGTC	pSMT3-M	
hygB-R1	CGGGCGGCCCGGGCGTCAGG		
2430-1	CCACCTTCACCGAGTGGAAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02430:kan <i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ02430:kan - Gendeletion
2430-2	AGTTCTTCTGAGCGGGACTCACCTGAGCGGCCGCGGCAC		
2430-3	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTCGTCATGGGCGGGCTCCTC		
2430-4	ATCTCGGCACCATCAGCTC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R3	(siehe oben)		
290-1	GTA AACGACGGCCAGTGCCACCAGTCGAAGCCGAAGTTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02900:kan <i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02900:kan
290-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTATGATCCGAGGCCCATCTTCC		
290-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAATGGAGGCCATCTACTCCTAC		
290-4	GCTCGGTACCCGGGGATCCTGGAGCGATCCACCCATATAC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ02900:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		
307-1	GTA AACGACGGCCAGTGCCACGAAGTTGGCTTCCAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ03070:kan <i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ03070:kan
307-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTAGCGCCAGGTAGAAGTC		
307-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAAGCGTTCGTGTGAGATGAC		
307-4	GCTCGGTACCCGGGGATCCTACGTGAGCCAGACGATTC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ03070:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		
687-1	GTA AACGACGGCCAGTGCCAAGATCACCGGCTTCTACG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ06870:kan <i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ06870:kan
687-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCATGGTCTCTCCTGTTCTC		
687-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAATCACCTCGCTCATACCGTCAC		
687-4	GCTCGGTACCCGGGGATCCTGGACAGCGACAGCATCGAGTTG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ06870:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		
1170-1	GTA AACGACGGCCAGTGCCAGTGGCCTTGAGCATCTCCTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ11700:kan <i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ11700:kan
1170-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTTGGCGAGTTGCGGGATTTC		
1170-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAACGGATGAGACCACGAAGACTG		
1170-4	GCTCGGTACCCGGGGATCCTTGACATCCTGGCCTGCTAC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ11700:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		
13180-1	TTGAACCCGGACTTGAGC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ13180:kan <i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ13180:kan - Gendeletion
13180-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTCTCACCCATAGGATCACCTTAG		
13180-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAACTGACCGGGCTGCCACAGC		
13180-4	CGGTGCCAGGCTCGTGAGG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
17630-1	ACTACCACCTGGCGCAGTTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ17630:kan
17630-2	TTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGCTGACGGCGGCCGTACC		
17630-3	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTTCGGTCATCGGGCGCTCCTC		
17630-4	CGAGGGTCGATCAGGTACAG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	- Gendeletion
Kan-R3	(siehe oben)		
19550-1	AGGTCATCCTCGGCTGCATC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19550:kan
19550-2	TTGCAGGGCTTCCCAACCTGATCTGGTCTGGCATGGGAAC		
19550-3	AGTTCCTTCTGAGCGGGACTCGCCCGGTGACGCGCAGGCAG		
19550-4	GTGCAGGCGTACTTCAGCAG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	- Gendeletion
Kan-R3	(siehe oben)		
1956-1	GTA AACGACGCCAGTGCCACGATCATCGCGCTGGACTTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19560:kan
1956-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTACGTCGTACGTCGGCTTCTG		
1956-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAAAGTCCGTGCAGGCGTTGATCCTC		
1956-4	GCTCGGTACCCGGGATCCTTGGGCGACGTCCTGAAGATG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ19560:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		
20330-1	AGTCTGTCCCTCGAGATG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ20330:kan
20330-2	CGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCCGCGGCCAGGCCTGATCC		
20330-3	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTTCGAGCATGGCGTTCTCCTG		
20330-4	TACACCGGGATCACCTCGTC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	- Gendeletion
Kan-R3	(siehe oben)		
20370-1	CGCCTTCGCTTCTTCTTGTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ20370:kan
20370-2	TTCTTCTGAGCGGGACTCGAGCGCGTGGCCGGGTAG		
20370-3	ACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTATCTCGGTCTCCTCATCC		
20370-4	GTCGGCGATGAAGTACTC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ20370:kan - Gendeletion
Kan-R3	(siehe oben)		
2317-1	GTA AACGACGCCAGTGCCACGAGTCCGTGAACCGCAACAAG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ23170:kan
2317-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTCTCCTCGGCGGAGAACAG		
2317-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAACACGGAACAACCTCGAGTC		
2317-4	GCTCGGTACCCGGGATCCTGGTTCGTGGAGGAGTCCAAG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02880:hyg Δ23170:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		
02880-90-1	GGCCAACTCGTCCATGTTCTCG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02880-90:kan
02880-90-2	AGTTCCTTCTGAGCGGGACTCCCTCCTCCTGACGCGCTCCC		
02880-90-3	TTGCAGGGCTTCCCAACCTTGGACGGTCATGGGTCCC		
02880-90-4	ATCTGGGCTGGATGAGCTG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	- Gendeletion
Kan-R3	(siehe oben)		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
290-1	(siehe oben)	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ 02900 Δ fadE2
290-2-new	GTAGGAGTAGATGGCCTCCATGCCGAGGTTGAGCTCGTTGTG		
290-3-new	CACAACGAGCTCAACCTCGGCATGGAGGCCATCTACTCCTAC		
290-4	(siehe oben)		
1170-1	(siehe oben)		
1170-2-new	CAGTCTTCGTGGTCTCATCCGTTGGCGAGTTCGCGGGATTG		
1170-3-new	GAATCCCGCGAACTCGCCAACGGATGAGACCACGAAGACTG		
1170-4	(siehe oben)		
1956-1	(siehe oben)		
1956-2-new	CGAAGTGCCGCATCACCCGGACCAGGTCCAACGGGTA		
1956-3-new	GAGTACCCGTTGGACCTGGTCCGGGTGATGCGGCACTTCG		
1956-4	(siehe oben)		
307-1	(siehe oben)		
03070-2n	GTCATCTCACACGAACGCGCCTGCGAGCGCCAGGTAGAAG		
03070-3n	CTTCTACCTGGCGCTCGCAGGCGCGTTCGTGTGAGATGAC		
307-4	(siehe oben)		
2317-1	(siehe oben)		
23170-2n	GACTCGAGGTTGTTGCGGTGGGATGTGCTCGTCCACGAAG		
23170-3n	CTTCGTGGACGAGCACATCCCACGCGAACAACCTCGAGTC		
2317-4	(siehe oben)		
4420-1	TCATGGCGTTCACGGGCTAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ 04420:kan
4420-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTGCACCACGGCGATGTTGTTG		
4420-3	ACCGCCGCCTTCTATGAAAACGTCCGTCATGGTGTTG		
4420-4	ATCGCCGGTTCATCAAG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ 04420:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		
684-1	CGAACAGGATGCCGTTGTTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ 06840:kan
684-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGGCATGGGATCCACTGTAG		
684-3	CCACCGCCGCCTTCTATGAAAACGTTGCCCGGCGAGGACTG		
684-4	CGATCGTGCAGCAGAACTTCG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ 06840:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		
7570-1	TCCACACGCGCAACGTGATG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ 07570:kan
7570-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTACCGATGCCGTGGAGGAAGC		
7570-3	CACCGCCGCCTTCTATGAAAACGTCGGCCTGGGCCACTG		
7570-4	ACGGGTTCAACACGTAGG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ 07570:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		
9760-1	CGATGTATCCGAGGACGAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ 09760:kan
9760-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTACGAACGGCTCTCCTTCGAC		
9760-3	ACCGCCGCCTTCTATGAAAACGCTCTACGTCCAGGACTC		
9760-4	GGGCAACTACTCCACCTACC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ 09760:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
TE-1	GTAGGGTGGTCCTCAGAATC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	
TE-2	CATGATGGTGTCTTTTCGAT		
TE-3	GAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTCTTCGCCTGACGCACGGCTTCC		
TE-4	TCACGCAGGCCATCTCCAAC		
bacTE-F	ATCGAAAGGACACCATCATGAGTGAAGAAAATAAAATAGGGACTTATC	<i>B. thetaiotaomicron</i> gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ19390::bacTE:kan
bacTE-R	GCAGGGCTTCCCAACCTTCATTATTCAAATATCACTTTGGAACGG		
cav1mlut-F	ATCGAAAGGACACCATCATGTGGGCGGCAAGTACGTGACTC	<i>In vitro</i> synthetisiertes <i>caveolin-1</i> -Gen von <i>Canis lupus familiaris</i>	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ19390::cav1:kan
cav1mlut-R	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTTCACGTCTCCTTCTGCATGTTGAT		
closTE-F	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTTTATGACTGAATCTTTGCCAGATTGT	<i>C. thermocellum</i> gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ19390::closTE:kan
closTE-R	ATCGAAAGGACACCATCATGCAGAAGAAAAGATTTCAAAGAAGTAT		
TE-5	CATCGAAAGGACACCATCATGGTCGCGCGGAGAAGCGGTG	<i>In vitro</i> synthetisiertes Thioesterase-Gen von <i>Cuphea palustris</i>	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ19390::ucTE:kan - Genaustausch
TE-7	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTCACGTCTTCCCGTCGAGATCGC		
TE-6	CATCGAAAGGACACCATCATGCTGGAGTGGAAGCCCAAGCC		
TE-8	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTCACACCCTGGGCTCGGCGGGGAT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	
Kan-R3	(siehe oben)		
19420-1	CACCTACCGAGTACTTC		
19420-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTCAGATGCATGGGATGTTT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19420:kan
19420-3	ACCGCCGCTTCTATGAAAACAGTGCGGCGAGGATGAAC		
19420-4	CTCACGGAGCTGCTCGATGAAC		
Kan-F2	(siehe oben)		
Kan-R2	(siehe oben)	pWLTk6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ19420:kan - Gendeletion
22190-1	TGGACATGACCGCATGGAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22190:kan
22190-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTTGTTGACGTGGCCGTAGC		
22190-3	ACCGCCGCTTCTATGAAATCTTCGAGCGCGTGTGATC		
22190-4	TGAGCGCAAGCCACACGAAC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ22190:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		
22730-1	TACTTCGGCGAGGTCTTCGG		
22730-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTGCGGCAGCAGCAGCCGGTGGTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22730:kan
22730-3	CACCGCCGCTTCTATGAAACGGGCGACGACGACGCGCTGAG		
22730-4	TGAGGTCGTGCGTCATGGAG		
Kan-F2	(siehe oben)		
Kan-R2	(siehe oben)	pWLTk6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ22730:kan - Gendeletion
ope-1	(siehe oben)	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 ope:kan - Promotoraustausch
ope-2	(siehe oben)		
ope-3-nooh	CACCGGGCCAGACTACGGAAC		
ope-4	(siehe oben)		
ope-5	(siehe oben)		
ope-6	(siehe oben)		
Kann-F2-opeoh	GATACCACCACCTAGCAGTCGAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAG	pWLTk6	
Kann-R2-opeoh	GTTCCGTAGTCTGGCCCGGTGTTTCATAGAAGCGGCGGTGG		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart		
05890-1	ACTGACCTCGGTCTCGATTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 P _{up} 05890:kan <i>M. luteus</i> trpE16 P _{up} 19260:kan - Promotoraustausch		
05890-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTACGTCCTCCTTGTTGGTGGTC				
05890-3	GTGACCGATCCCGATCTGAC				
05890-4	GGGTGATGATCGGGATGTTG				
19260-1	CACGCGGGACACGAACTACATC				
19260-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTAGTGGAGTCCTCTCGGATCG				
19260-3	GTGTCTCACGCGCCGAGATCG				
19260-4	GAGGCGCAGTACATGAAC				
sdh-1	AGTTCCTCTGAGCGGGACTCCGGGCCAGACTACGGAACCG				
sdh-2-05890	GTCAGATCGGGATCGGTACCGTTGATACCTCCAGGGGGG				
sdh-2-19260	ATCTGCGGCGCGTGAGACACGGTTGATACCTCCAGGGGGG				
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6			
Kan-R3	(siehe oben)				
06800-01	CGACACGTTCCGGCTACATC				
06800-02	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTTGACTGCCTCCGATCGAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 P _{up} 06800:kan <i>M. luteus</i> trpE16 P _{up} 13320:kan - Promotoraustausch		
06800-03	ACGACCCCAAGGAGCGAGCCGTGACCCTCGTGACCACAC				
06800-04	CGCGTAGATCTCGTGAAGAGC				
13320-1	TCTGGCGTCAGTCAACCAC				
13320-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGTGTGCTCCTTGTTGCTG				
13320-3	GACCCCAAGGAGCGAGCCGTGGCCGACAAGGCAACCGCTC				
13320-4	ATCTCCTCGGCCACGAAGATGC				
Psp-05-1	TTCTTCTGAGCGGGACTCCCACGCCCCGTGGCCCAACTG				
Psp-05-2	GGCTCGCTCCTTGGGGTCTGTGTC				
Kan-F2	(siehe oben)			pWLTk6	
Kan-R3	(siehe oben)				
17790-1	TTCCTGGCGATCAGCCTCAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 P _{up} 17790-810:kan - Promotoraustausch		
17790-2	TTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGCGGGTCTCTCGATCTGT				
17790-3	ATGAGTGACCCACCC				
17790-4	CGGAGTAGACGTGGTGAACAG				
sdh-1	(siehe oben)				
sdh-2	GGGGTGGGGTCACTCATGTTGATACCTCCAGGGGGG				
Kan-F2	(siehe oben)			pWLTk6	
Kan-R3	(siehe oben)				
mi-00270-1	GTGTGCTGTCGAGATGAC				
mi-00270-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTAACGACAGCCAGAACG			<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ00270:kan - Gendeletion
mi-00270-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAAATACCACCGAACACGTCGAT				
mi-00270-4	GTGTCATCGGTGATCTGGAA				
Kan-F2	(siehe oben)				
Kan-R2	(siehe oben)	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ00320:kan - Gendeletion		
mi-00320-1	GTGCTGTGGTTCAGGATCAG				
mi-00320-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGCACGAAGATCAGTTTCACG				
mi-00320-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAACATCACCCCCACCCGATAC				
mi-00320-4	CCTACTCGGGACTTGACC				
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6			
Kan-R2	(siehe oben)				

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
mi-00350-1	CATGGCAGCAAAGAGAGTGA	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ00350:kan - Gendeletion
mi-00350-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTATGTGCTCCGCACTGACCT		
mi-00350-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAATTCAAGACGCCCTTATCGAC		
mi-00350-4	CGGTTCCACCAATCTTCTTT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	
Kan-R2	(siehe oben)		
mi-01070-1	CGACGACGTCCATCACCTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ01070:kan - Gendeletion
mi-01070-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTCCCGCGTCGTGGTCTCC		
mi-01070-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAATCTACTACTGGGGGCTGTGC		
mi-01070-4	AGCAGTCCATGCGGATCTT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	
Kan-R2	(siehe oben)		
mi-01360-1	CTTGTCACCCAGACCTTCGT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ01360:kan - Gendeletion
mi-01360-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTGACCAGCCCTTCCATCT		
mi-01360-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACTAGCCCTGCACCAGTCTCT		
mi-01360-4	GTCCGCTCCTCTACCTGTT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	
Kan-R2	(siehe oben)		
mi-01480-1	CTACCTGGCCCAGTACATGC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ01480:kan - Gendeletion
mi-01480-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCAGGACCAGACGCGAGAAC		
mi-01480-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACGGACATCCGGACGCTGAC		
mi-01480-4	ATCGAGGAGCTCGAGTGGAT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	
Kan-R2	(siehe oben)		
mi-02250-1	GTCCGTGACGATGTCGATCT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02250:kan - Gendeletion
mi-02250-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGCCTCGGTCAGGCTCAGTC		
mi-02250-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGAAAGCCCAAGGCGAGTTC		
mi-02250-4	AGCACAAAGTGGACCACTG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	
Kan-R2	(siehe oben)		
mi-02880-1	CTACGGGTCACGAGCTTCT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02880:kan <i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02900 ΔfadE2 Δ02880:kan
mi-02880-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTATCCGTGACGCTCCCAGTT		
mi-02880-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACGGAGCACACCTCCTCTCTG		
mi-02880-4	CGGTCTTCTCGGACATGGA		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	<i>M. luteus</i> trpE16 ope Δ02900 ΔfadE4 Δ02880:kan - Gendeletion
Kan-R2	(siehe oben)		
2890-1	TCGGCACCGTGTGATGATG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02890:kan - Gendeletion
2890-2	AGTTCTTCTGAGCGGGACTCAGCGCTGACCGCCGTTCCC		
2890-3	ACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTACGGTCATGGTCCCTCC		
2890-4	ATCTGGGCTGGATGAGCTG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTk6	
Kan-R3	(siehe oben)		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
mi-02970-1	TCGAGATGATCGTGAGGTTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ02970:kan - Gendeletion
mi-02970-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTATGCGCAGCTCTTCGGACA		
mi-02970-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGATCATGGCCAAGCTGGAG		
mi-02970-4	AGGAAGTCCGCATGACTCAC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
mi-03060-1	GGTGAGCTGGGAGAGCATC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ03060:kan - Gendeletion
mi-03060-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTATCAGGGCGGTGAGAGTGT		
mi-03060-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGTGCGCCGACTCCTGGACTG		
mi-03060-4	GGCAACCTGTCTTCGAGTG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
mi-03350-1	AGGAGGTGCGGATCGAGAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ03350:kan - Gendeletion
mi-03350-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTTGCGGACGGAGATGTGC		
mi-03350-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACAGGGCTACCGCTTCTACC		
mi-03350-4	GTCCCGTCCACTCCGATAC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
Mlut_03360-1	CGAACGTTACTTGCCAGTCC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ03360:kan - Gendeletion
Mlut_03360-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTAGGACGATCAGGGTCTTCG		
Mlut_03360-3	GAGTTCTTCTGAGCGGGACTCCTGACGCACCTTCGTGGTTC		
Mlut_03360-4	GATCCACTTGGTCTCGTTGC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
mi-03520-1	GTGTAGGCGACCACCTCGT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ03520:kan - Gendeletion
mi-03520-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTGTAGGGCTCAGCTTCA		
mi-03520-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACTGACGGTCCGTGACCTCGT		
mi-03520-4	CAGCGAGCTCAGGATGGAG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
mi-04190-1	CGTCCAGCATGACGAGTGT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ04190:kan - Gendeletion
mi-04190-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGATCGTGCGCAGGTACATCT		
mi-04190-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACGCGCACGTGTGGTTCGAG		
mi-04190-4	CACTTGGTGAACACGGACAG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
mi-04340-1	CGAGGGTGTAGACCACGAAG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ04340:kan - Gendeletion
mi-04340-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCCAGCTGGGCCACGGTGAG		
mi-04340-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGGGGACACCGTCACCTTC		
mi-04340-4	TCGATGTCCACCGAGATGTA		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
05330-1	CATCGGGCTGCTGGACATCTTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ05330:kan - Gendeletion
05330-2	TGCAGGGCTTCCCAACCTTTCTGCACGGTCCGAGCGTATC		
05330-3	AGTTCTTCTGAGCGGGACTCGCTGACCCCGCCCCCGGAC		
05330-4	GGCGGAGGACTTCGAATCCG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R3	(siehe oben)		
ml-06140-1	GGTCGGAGACGACCACCTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ06140:kan - Gendeletion
ml-06140-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGCCCTGCTCCTCGTAGAAC		
ml-06140-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAACACCATCACCGAGCTCAGAC		
ml-06140-4	CCTTGGCCTCCGGGTAGTG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
06800-20-1	GAGATCGGCTACGAGACCAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ06800-20:hyg - Gendeletion
06800-20-2	AGATCGCTGAGATAGGTGCCGGTAGGACGGGAAGACGAAG		
06800-20-3	CTGACGCCCCGGGCCGCCCGGATGGTGCCGAACGTCAAGG		
06800-20-4	CTCACAGGACCTGCTCAAC		
hygB-F1	(siehe oben)	pSMT3-M	
hygB-R1	(siehe oben)		
684-1	CGAACAGGATGCCGTTGTTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ06840:kan - Gendeletion
684-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGGCATGGGATCCACTGTAG		
684-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAACCGTTGCCCGCGAGGACTG		
684-4	CGATCGTGCAGCAGA AACTTCG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-07330-1	ATCTGCTGCAGGATCTCGTT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ07330:kan - Gendeletion
ml-07330-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCTGATCGTCGGTGGTGCTC		
ml-07330-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAACCGTCTGCGTTCACTCT		
ml-07330-4	CCAAGGACTCGAAGCTCTCC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-07430-1	CAAGGAGTTCGACGCTCTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ07430:kan - Gendeletion
ml-07430-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCTGGGTGGCCTCGAAGTAG		
ml-07430-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAAAGTCCCTCACCCGGATCTT		
ml-07430-4	GTGGGCGAGACCGTCTACA		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-07800-1	GCGCGTCGAGGAGCAGACCG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ07800:kan - Gendeletion
ml-07800-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGTGTCTCAGACTCCTTCTG		
ml-07800-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAAGACCACACGGTGGAGATCA		
ml-07800-4	CGATCCTGCTGTTCTTCGTC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
ml-08730-1	TCGATGGACATGTTGCAGAT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ08730:kan - Gendeletion
ml-08730-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCCACCGACTTGCCACCAC		
ml-08730-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACGGCTCACCGAGCTCATCC		
ml-08730-4	CGCAGGTTGATGTCGTCCA		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-10310-1	CCACACCGTTCTTCTCGTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ10310:kan - Gendeletion
ml-10310-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGTTCAGGGGTCTCGTCCA		
ml-10310-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACTTCGAGGAGGGACTGGAC		
ml-10310-4	ACCTCACGCTCACGATCAC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-10370-1	ATGAACAGGACGTCGTTGG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ10370:kan - Gendeletion
ml-10370-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGCAGACTGCACGAGATCCAG		
ml-10370-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACTTCGTCGGGACCGCTAT		
ml-10370-4	CACCACCCAGTTGTTGAAGG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-11030-1	ACTGGGCGGACTTGGTGAAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ11030:kan - Gendeletion
ml-11030-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGATGAGGGTCTCGTCCTC		
ml-11030-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAATGGATCCAGAAGACCTCCAT		
ml-11030-4	ACGAGATCATGGACGAGGAG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-11480-1	AGGCGTCGCCGAAGTCCAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ11480:kan - Gendeletion
ml-11480-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTCCACGAGTCAGGACCAG		
ml-11480-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACCTGCTCGAGGTGGACGTG		
ml-11480-4	GCGTTCTTCTTACCACGAT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-11710-1	TTCTCCATGTCCACGAACTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ11710:kan - Gendeletion
ml-11710-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTGGACGTGACGGGGTTCA		
ml-11710-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAACGAACAGGAGCATCGTCAT		
ml-11710-4	TAGTCCAGCAGCACCTCCTC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-12370-1	GTACGTGGTGACGTGGGAGA	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ12370:kan - Gendeletion
ml-12370-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTAGCGCCACGTAGTCTCCAG		
ml-12370-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAATATCTCTCCGCATCCTGAC		
ml-12370-4	GTCCAGACTGACGGACTGCT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		

Primer- Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
13790-1	CCGGTGAAGTACTCGTGCTTGG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ13790:kan - Gendeletion
13790-2	TGCAGGGCTTCCCAACCTGCTGATCTCGTGCATGGGACTC		
13790-3	CGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCACTGAACGCCCCCTCGAC		
13790-4	CGGGATGATCTGGACTACAC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R3	(siehe oben)		
ml-13840-1	CCGAAGGCCTCAAGTACTCC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ13840:kan - Gendeletion
ml-13840-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTCACGAGGATGACGGCTCAG		
ml-13840-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAACTGGAGCAGTGGGATGACTG		
ml-13840-4	CACCTTGAGGACGAGGATGT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-13920-1	GCGATCTCGGCTTCTACTCT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ13920:kan - Gendeletion
ml-13920-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTGACCTGACACGAATCCAA		
ml-13920-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAAAGGGGCGGATGGTGTACTA		
ml-13920-4	TACCAGCTCAGTTCGTGACA		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-14110-1	AGATCGCCGAGCAGTTCCT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ14110:kan - Gendeletion
ml-14110-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTCAGCTGCTCGTCCCTCGAC		
ml-14110-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAAAGGCCGAGCAGGAGTACCG		
ml-14110-4	GTCATGTACGAGGGCAAGC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
Mlut_14630-1	CTCACCGGAGGGAGACGAAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ14630:kan - Gendeletion
Mlut_14630-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTCCCTCGTCCCGATGTCC		
Mlut_14630-3	GAGTTCTTCTGAGCGGGACTCGTGCTGCGACTACCCCTGAC		
Mlut_14630-4	CACACTGAAGAGCTGGATCG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-15250-1	CTCGTCCGCCTTTCGAGTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ15250:kan - Gendeletion
ml-15250-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGGCTCGTCCGGCGCGGTGG		
ml-15250-3	CCACCGCCGCTTCTATGAAAACGGTGGACGCGCTCATCT		
ml-15250-4	GCAGGAACGTCCACATGAAT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
Mlut_16240-1	GACGTGTTCTCTCCCTGAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ16240:kan - Gendeletion
Mlut_16240-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCACAGGTGCAGCGGCAGAA		
Mlut_16240-3	GAGTTCTTCTGAGCGGGACTCCGCCGAGGGCAGGATGGAC		
Mlut_16240-4	ACCATCGACAAGTCCGACAC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
ml-16250-1	CGTGGTCTTCATCCTCGTCT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ16250:kan - Gendeletion
ml-16250-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGAGTCGGCTGCCTCTCTCA		
ml-16250-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGCGATCGAGGGTGGCTGTA		
ml-16250-4	CAGATACGGGAAGACCATGC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-17340-1	CCTGTACGTGTGGCTCTGG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ17340:kan - Gendeletion
ml-17340-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGAAGATCGCGTGGTTGTCC		
ml-17340-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGTCGAGACCCACGTGTCCT		
ml-17340-4	CCCCCTACTGGACCACCTAC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-17360-1	GAGTCCAGGGCGAGGAACT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ17360:kan - Gendeletion
ml-17360-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGAACGGGTCGTGTGTGCTC		
ml-17360-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAATCTGCTCAGCGGCCGTCGT		
ml-17360-4	CCCGTCATCTCCTCGATCT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
Mlut_17820-1	GGAGATGGCGAACTTGTGT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ17820:kan - Gendeletion
Mlut_17820-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCTCCCGTCCCGCGTCAGTT		
Mlut_17820-3	GAGTTCTTCTGAGCGGGACTCCACGCAGACGTACATGGTCT		
Mlut_17820-4	GACCTTCTGGGCCGTTTC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-18240-1	CTTCTCCAACCTCGGGCTTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ18240:kan - Gendeletion
ml-18240-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGGCCCTCATCGTCTCACC		
ml-18240-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACTGTCTCGACACCCTGCTC		
ml-18240-4	GGACGAGTACGACCTCTCCA		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-18280-1	CTCTGCACCTGGTTGCACT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ18280:kan - Gendeletion
ml-18280-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTGAGGATGGCGAACACCT		
ml-18280-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACGTGGTCATCTGGACCTG		
ml-18280-4	GAGATCACCGTCCGTGTCC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-18360-1	CGACGACCAGCAGTGCTTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ18360:kan - Gendeletion
ml-18360-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTCCCAGTGTGAGTCCCAGT		
ml-18360-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAACGTGCACATCAAGAACCTG		
ml-18360-4	GGTAGAAGCGTTGGAAGACG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
ml-18530-1	CTTCTTCGTCGCTCCTGCAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ18530:kan - Gendeletion
ml-18530-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGTCGTCACCAGCATCAC		
ml-18530-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAACCTGGTGACATCTTCCA		
ml-18530-4	GTCCAGGAAGTCTCGATCA		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-18780-1	CGAATCGGACGTGAAGAAG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ18780:kan - Gendeletion
ml-18780-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCACGGAGATCACGAAGACG		
ml-18780-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGTGGCAGCCCGAGCAGGACT		
ml-18780-4	CTTGTGTTGACCTGGCGTA		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-19230-1	CACGGTCGAGTACCTCGTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19230:kan - Gendeletion
ml-19230-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGAGGTCCTCCCGGTGACA		
ml-19230-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACATGTTCCGGCGGTACCTG		
ml-19230-4	GCTCGTGCCGTGTTTCATC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-19490-1	GGTGTCCTGGGCGAGTTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19490:kan - Gendeletion
ml-19490-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTAGGTGCCCCATGCCGAAGT		
ml-19490-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAACCGCACGGACCCGCTCTG		
ml-19490-4	ACGTGAGGCTGTGGGTCAC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-19880-1	CTTCCAGATGCTCTCCGATG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19880:kan - Gendeletion
ml-19880-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCAGCCAGTCCAGGATGACC		
ml-19880-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAAGCACATCCGCTGGTTCTC		
ml-19880-4	AGGATCGGGTGAAGCATCT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-19990-1	GTCGTCGACTCGGAGCACT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ19990:kan - Gendeletion
ml-19990-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCTCGAGGATGGCTGGTAG		
ml-19990-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAACGCCTACCTGGAGCACAG		
ml-19990-4	AGAACACGCCGAAGATGGT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-20320-1	AGCTGATCACCGACTTCCAG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ20320:kan - Gendeletion
ml-20320-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGAAGAGCTCGACGCACTCG		
ml-20320-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAAGGGACCGGGTCAGATGAT		
ml-20320-4	GTCACAGCGCACGTAGAGTC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
ml-20650-1	AGGAGACCCCTTCTCTCGT	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ20650:kan - Gendeletion
ml-20650-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCATCAACACGAGAGGGCGATA		
ml-20650-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGATGAGAGTGCTCCGTGCAT		
ml-20650-4	GTGTCGTCTGTCCCTGTACG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-20720-1	GGGTGAACTGTGTACGATG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ20720:kan - Gendeletion
ml-20720-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTCGGCAACTGCATACTCAAC		
ml-20720-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACCAGAAGGAGAGCATCAACC		
ml-20720-4	GTAGGCCTTAACCGTGTTTCG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-20750-1	GAACCTCCTCGGCATCAGTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ20750:kan - Gendeletion
ml-20750-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCCTGCAGCTGATCCAGGTT		
ml-20750-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAACTGGCAGGCGGCCACAC		
ml-20750-4	GCTCGGAGACGAGTACAACC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-21070-1	GTGGGTGGTGCTGTACCTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ21070:kan - Gendeletion
ml-21070-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCGGTAGAGGGAGAAGCACAG		
ml-21070-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAAGGAGCTCAAGGCCTTCTCT		
ml-21070-4	CTCGTGACGACCTCGTGTG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-21850-1	AGCCGTTCCGACCTGAGAC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ21850:kan - Gendeletion
ml-21850-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCATGAGTTGCTGGTCTGCTG		
ml-21850-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGGCAAGATCATGGACAAGTG		
ml-21850-4	GATCGAGAGGGCCTCGTAGT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-21900-1	GCTGCTGGTGATGGTGTTTC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ21900:kan - Gendeletion
ml-21900-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGATCAGCGCCTGGTCTGTC		
ml-21900-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGCGGGCCTCGTGCAGTTCT		
ml-21900-4	GATCCTGCAGGCCTTCCTC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-21920-1	GACCATGATGACGGTCTGG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ21920:kan - Gendeletion
ml-21920-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCACCCACGCAGGGACATC		
ml-21920-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAACCTGGCTGCTGGGCACGTA		
ml-21920-4	ACCTTCGACCTGGACGAGTA		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Mutante - Mutationsart
ml-22060-1	CATGACATGGGGTCAGGAG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22060:kan - Gendeletion
ml-22060-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGGCAGGACCTTCTTCAGCTC		
ml-22060-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGATCCGATGATCCACACCAT		
ml-22060-4	GGAGAGCTCCTCCGTCATC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-22310-1	GGACGAGGAAGATGAACAGC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22310:kan - Gendeletion
ml-22310-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTAGCCCTCCCGTCCGAACAC		
ml-22310-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGTACACGCTGTGCGTCGAG		
ml-22310-4	GAGCTGTGCTGGGCCATAC		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-22460-1	GAACGGGTACAGGTGGTACG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22460:kan - Gendeletion
ml-22460-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTATGCGGGCGACGTCTTGAT		
ml-22460-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAACCGGATCACCACCACCT		
ml-22460-4	GTCGCTGATCACCAGGTTCT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-22860-1	CAGGTCGAAGAGGGGAGTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22860:kan - Gendeletion
ml-22860-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTGTCGTAGTGGCGGAGCATC		
ml-22860-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAATCTCGTGACGGAGGTGTG		
ml-22860-4	GGTAGCTGCCGACCGTCAT		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
ml-22960-1	CGATCTTTCGCCTATCTGC	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δ22960:kan - Gendeletion
ml-22960-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTATAAGGGGTCGGAGAGTGGA		
ml-22960-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAAGGCAGGTGAACCCCGATG		
ml-22960-4	GTGGGAGCTCACGCCGATG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		
dole-1	GTA AACGACGGCCAGTGCCACATCTTGGTGGGCTGGAAGTG	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>M. luteus</i> trpE16 Δole:kan - Gendeletion
dole-2	CTTTGCAGGGCTTCCCAACCTCGTTCGTCACCAGGACCAATC		
dole-3	CCACCGCCGCCCTTCTATGAAAACCGCGTCGCGGCTACTACC		
dole-4	GCTCGGTACCCGGGATCCTAAGGTCGTCGCCGAGATGAAG		
Kan-F2	(siehe oben)	pWLTK6	
Kan-R2	(siehe oben)		

Tabelle 45: Liste mit Primern und zugehörigen Templates für die PCRs der Klonierungen zur Erstellung der pET19b- und pBAD/Myc-His A-Plasmidkonstrukte zur Expression in *E. coli* Rosetta 2 bzw. Top10. Die Klonierungsstrategie ist dem Abschnitt „4.8.3. Expression von OleA-Proteinen in *E. coli*“ zu entnehmen.

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Template	Transformand
11925.pET19b-1	TCGACGACGACGACAAGCATTTCAGGGAAGTCCATCAT	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 gDNA	<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b::oleA.11925
11925.pET19b-2	TCGGGCTTTGTTAGCAGCCGTCACCAGTCGATCTCCATGA		
20319.pET19b-1	TCGACGACGACGACAAGCATCCAGGGAAGTCCATCAT	<i>Kocuria palustris</i> DSM 20319 gDNA	<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b::oleA.20319
20319.pET19b-2	TTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGTCACCAGTCGATCTCCAT		
20320.pET19b-1	CGACGACGACGACAAGCATCCAGGGAAGTCCATCATC	<i>Kocuria palustris</i> DSM 20320 gDNA	<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b::oleA.20320
20320.pET19b-2	TTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGTCACCAGTCGATCTCCATG		
2148.pET19b-1	ATCGACGACGACGACAAGCATTCCGGCAACGCCAGTTACGAG	<i>Micrococcus sp.</i> 2148 gDNA	<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b::oleA.2148
2148.pET19b-2	TCGGGCTTTGTTAGCAGCCGTCACCAGTCGATCTCGAGCATGG		
2228.pET19b-1	TCGACGACGACGACAAGCATTCCGGCAACGCCAGTTCGA	<i>Micrococcus sp.</i> 2228 gDNA	<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b::oleA.2228
2228.pET19b-2	CGATCTCGAGCATGGCGTTTTACCATTGATCTCGAGCA		
3352.pET19b-1	ATCGACGACGACGACAAGCATTTCAGGGAAGTCCATCATCAG	<i>Kocuria sp.</i> 3352 gDNA	<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b::oleA.3352
3352.pET19b-2	TCGGGCTTTGTTAGCAGCCGTCACCAGTCGATCTCCATGA		
MAW843.pET19b-1	TCGACGACGACGACAAGCATTCCGGCAACGCCGCTTCGA	<i>M. luteus</i> MAW843 gDNA	<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b::oleA.MAW843
MAW843.pET19b-2	CGATCTCGAGCATGGCGTTTTACCAGTGGATCTCGAGCA		
M.L.pET19b-1	TCGACGACGACGACAAGCATACGAACGTGTCCGGCAA	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b::oleA.ML
M.L.pET19b-2	TCGGGCTTTGTTAGCAGCCGTCACCATTGATCTCGAGCA		
TW93.pET19b-1	ATCGACGACGACGACAAGCATCCCGGCAACGCCACCTCCGC	<i>Kytococcus sedentarius</i> TW93 gDNA	<i>E. coli</i> Rosetta 2 pET19b::oleA.TW93
TW93.pET19b-2	TCGGGCTTTGTTAGCAGCCACCGCGGGAGGGCCACCTG		
11925.pBAD-1	GCTAACAGGAGGAATTAACCATGTCAGGGAAGTCCATC	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 gDNA	<i>E. coli</i> Top10 pBAD::oleA.11925
11925.pBAD-2	TGTTCCGGGCCAAGCTTCGCCAGTCGATCTCCATGAAGG		
20319.pBAD-1	GCTAACAGGAGGAATTAACCATGCCAGGGAAGTCCATCATC	<i>Kocuria palustris</i> DSM 20319 gDNA	<i>E. coli</i> Top10 pBAD::oleA.20319
20319.pBAD-2	TTGTTCCGGGCCAAGCTTCGCCAGTCGATCTCCATGAAG		
20320.pBAD-1	GCTAACAGGAGGAATTAACCATGCCAGGGAAGTCCATCATC	<i>Kocuria palustris</i> DSM 20320 gDNA	<i>E. coli</i> Top10 pBAD::oleA.20320
20320.pBAD-2	TTGTTCCGGGCCAAGCTTCGCCAGTCGATCTCCATG		
M.L.pBAD-1	GCTAACAGGAGGAATTAACCATGACGAACGTGTCCGGCAA	<i>M. luteus</i> trpE16 gDNA	<i>E. coli</i> Top10 pBAD::oleA.ML
M.L.pBAD-2	TGTTCCGGGCCAAGCTTCGCCATTGATCTCGAGCA		

Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich bei Professor Wolfgang Liebl für die Zuteilung des Themas meiner Dissertation, seine stets offene Tür, sein Vertrauen, seine Begeisterungsfähigkeit für mein Thema und nicht zuletzt für die gründliche Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Mein größter Dank gilt Dr. Angel Angelov, der mir über das gesamte Studium und die Doktorarbeit hinweg der wichtigste Mentor und Lehrer war. Die gemeinsame Arbeit erlaubte außerdem die Entwicklung einer über die professionelle Beziehung hinausgehenden Freundschaft, die ich mein Leben lang hochhalten werde.

Unermesslich dankbar bin ich Maria Übelacker, die mich über meine Doktorarbeit hinweg tatkräftig und moralisch unterstützt hat.

Insgesamt danke ich mit Maria, Matthias Mörch, Antoni Lichev, Enzo Torasso, und Trang Pham allen festen Mitgliedern von Labor 002 für die kameradschaftliche Zusammenarbeit, die Möglichkeit zur Reflexion von Problemstellungen und wertvolle Ratschläge zu meiner Arbeit. Unsere gemeinsamen Mittagessen haben mir viel bedeutet und ich bleibe euch in inniger Freundschaft verbunden.

Ein besonderer Dank gilt auch Kornelia Garus für ein stets offenes Ohr und ihre erfrischende Art mit der Sie meinen Laboralltag erfüllt hat.

Ich danke den Kollegen aller Arbeitsgruppen des Lehrstuhls für Mikrobiologie für die konstruktive Arbeitsatmosphäre und das freundliche Miteinander.

Ich möchte mich auch bei meinen Praktikanten, Bacheloranden und Masteranden Sara Großbruchhaus, Simon Kessler, Philipp Stier, Marion Gallus, Daniella Kalla, Tanja Krauss, Nadine Renner und Max Theuer für ihre fleißige Arbeit bedanken.

Meine Eltern Ingrid und Stefan Surger haben durch Ihre fortlaufende Motivation, Inspiration und Unterstützung diese Dissertation erst möglich gemacht. Ich liebe euch und widme euch diese Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Nachname	Maximilian Josef Surger
Geburtsdatum	06.03.1988
Geburtsort	Heidelberg, Deutschland
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Bildungsweg

1994-1998	Friedrich Ebert Grundschule, Heidelberg
-----------	---

1998-2007	Kurfürst Friedrich Gymnasium, Heidelberg
-----------	--

2008-2011	Technische Universität München Bachelorstudium der Molekularen Biotechnologie Thema der Bachelorarbeit: Klonierung und Expression von Terpene-Glycosyl- Transferasen aus der Traube (<i>Vitis Vinifera</i>) Abschluss: Bachelor of Science; Note: 1,8
-----------	--

2011	F+U Academy of Languages, Heidelberg TOEFL Test
------	---

2012-2014	Technische Universität München Masterstudium der Molekularen Biotechnologie Thema der Masterarbeit: Genetische Modifizierung der Biosynthese von Kohlenwasserstoffen in <i>M. luteus</i> Abschluss: Master of Science; Note: 1,3
-----------	--

SEIT 2014	Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie Vorliegende Doktorarbeit: Experimentelle Arbeiten und Schreiben Thema: Charakterisierung und Modifizierung der Kohlenwasserstoffproduktion in Mikrokokken
-----------	--

Berufserfahrungen

08.2007-04.2008

Zivildienst/Studentische Hilfskraft

05.2008-07.2008

08.2009-09.2009

Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen (NCT
Gewebebank) am pathologischen Institut, Heidelberg

Assistenz bei Entnahme von Tumorproben aus frischem
Gewebe, Präparation von Mikroskopie-Proben und
Archivierung

10.2011-03.2012

Studentische Hilfskraft

Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie,
Universität Heidelberg

Extraktion, Aufreinigung und Quantifizierung von Alkaloiden
aus Lupinen-Samen
