INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG 10

2 SUMMARY 11

3 EINLEITUNG 12

3.1 Biokatalyse 12
3.1.1 Oxidoreduktasen in der Biokatalyse 13
3.1.1.1 Möglichkeiten zur Regenerierung von Pyridinnukleotid-Cofaktoren 14
3.1.2 NADH-Oxidasen 15
3.1.2.1 Die NADH-Oxidase NOx aus *Lactobacillus brevis* 18
3.1.3 Transferasen in der Biokatalyse 18
3.1.4 Prenyltransferasen 19
3.1.4.1 Die Prenyltransferase FgaPT2 aus *Aspergillus fumigatus* 20
3.1.5 Ganzzellbiokatalysatoren 21
3.1.5.1 Autodisplay von Enzymen zur Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren 22
3.1.6 Ziele der Arbeit 24

4 MATERIALIEN 26

4.1 Materialien 26
4.1.1 Geräte 26
4.1.2 Chemikalien und Materialien 27
4.1.3 Reagenziensätze („kits“) 28
4.1.4 Antikörper 29
4.1.5 Enzyme 29
4.1.6 Oligonukleotide 29
4.1.7 Bakterienstämme 29
4.1.8 Plasmide 30

4.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen 30
4.2.1 Nährmedien 30
4.2.2 Puffer und Lösungen 31

5 METHODEN 35

5.1 Arbeiten mit Bakterien 35
5.1.1 Kultivierung 35
5.1.2 Stammhaltung 35
5.1.3 Bestimmung der optischen Dichte 36
5.1.4 Induktion der Proteinexpression 36
5.1.5 Herstellung elektrokompetenter Stämme 36
5.1.6 Transformation durch Elektroporation 37
5.1.7 Lyophilisieren von Zellproben 37

5.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren 38
5.2.1 Plasmidisolierung 38
5.2.2 Polymerasekettenreaktion 38
5.2.3 Ligation 39

5.2.4 Entsalzen von DNA-Lösungen mittels Dialyse ... 39
5.2.5 Enzymatische Spaltung von DNA-Fragmenten ... 40
5.2.6 Agarosegelelektrophorese ... 40
5.2.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel ... 40
5.2.8 DNA-Sequenzanalyse ... 41

5.3 Arbeiten mit Proteinen ... 41
5.3.1 Isolierung von Proteinen der äußeren Bakterienmembran ... 41
5.3.2 Proteasezugänglichkeit oberflächenexprimierter Proteine ... 42
5.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 42
5.3.4 Western Blotting ... 43
5.3.5 Immunfärbung ... 44

5.4 Arbeiten mit Ganzzellbiokatalysatoren ... 44
5.4.1 Vorbereitung von Zellen für NADH-Oxidase-Aktivitätsbestimmungen ... 44
5.4.2 Photometrische NADH-Oxidase-Aktivitätsbestimmung ... 44
5.4.3 Photometrischer NADH-Oxidase-Aktivitätstest im Mikrotiterplattenmaßstab ... 45
5.4.4 Berechnung der Aktivität nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ... 45
5.4.5 Lagerungsfähigkeit von NOx-Ganzzellbiokatalysatoren ... 46
5.4.6 Wiederverwendbarkeit von NOx-Ganzzellbiokatalysatoren ... 47
5.4.7 Einsatz von NOx-Ganzzellbiokatalysatoren zur Cofaktorregenerierung ... 47
5.4.8 Vorbereitung von Zellen für FgaPT2-Aktivitätsbestimmungen ... 48
5.4.9 HPLC-gestützter FgaPT2-Aktivitätstest ... 49
5.4.10 Untersuchung von Reaktionsprodukten mittels LC-MS ... 49
5.4.11 Lagerungsfähigkeit von FgaPT2-Ganzzellbiokatalysatoren ... 49
5.4.12 Wiederverwendbarkeit von FgaPT2-Ganzzellbiokatalysatoren ... 50

6 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE ... 51

6.1 Autodisplay der NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* ... 51
6.1.1 Genkonstruktion ... 51
6.1.2 Expression und Oberflächenständigkeit der NOx ... 52
6.1.3 Aktivitätsbestimmung des NOx-Ganzzellbiokatalysators ... 54
6.1.3.1 Optischer Test nach Otto Warburg ... 54
6.1.3.2 NADH-Oxidase-Aktivität NOx-präsentierender, lyophilisierter Zellen ... 56
6.1.3.3 NADH-Oxidase-Aktivität NOx-präsentierender „resting cells“ ... 59
6.1.3.4 NADH-Oxidase-Aktivität von NOx-präsentierenden *E. coli* UT5600(DE3) ... 60
6.1.4 Optimierung der Aktivitätsbestimmung ... 61
6.1.4.1 Aktivitätsbestimmung durch Messung von Zellüberständen im Mikrotiterplattenformat ... 61
6.1.4.2 Aktivitätsbestimmung durch Messung von Zellsuspensionen im Mikrotiterplattenformat ... 64
6.1.5 Optimierung der Umsetzungsparameter ... 65
6.1.5.1 Optimierung des Kulturmediums ... 65
6.1.5.2 Untersuchungen zu Stabilität und Lagerungsfähigkeit des NOx-Ganzzellbiokatalysators ... 71
6.1.5.3 Untersuchungen zur Wiederverwendbarkeit des NOx-Ganzzellbiokatalysators ... 77
6.1.6 Einsatz des NOx-Ganzzellbiokatalysators als regenerierendes System ... 79
6.1.7 Die Rolle des FAD-Cofaktors bei Expression und Aktivität der NOx ... 84

6.2 Autodisplay der Prenyltransferase aus *Aspergillus fumigatus* ... 91
6.2.1 Genkonstruktion ... 91
6.2.2 Expression und Oberflächenständigkeit der Prenyltransferase FgaPT2 ... 92
6.2.3 Aktivitätsbestimmung des FgaPT2-Ganzzellbiokatalysators ... 94
6.2.3.1 Umsetzung von Indol-3-propionsäure und L-β-Homotryptophan ... 94
6.2.3.2 Regioselektivität der Reaktion des FgaPT2-Ganzzellbiokatalysators ... 97
6.2.3.3 Optimierung der Umsetzung ... 99
6.2.3.4 Untersuchung zu Wiederverwendbarkeitsmöglichkeiten ... 100

6.2.3.5 Untersuchungen zu Stabilität und Lagerungsfähigkeit 101
6.2.3.6 Effizienz des FgaPT2-Ganzzellbiokatalysators 102

7 DISKUSSION 104

7.1 Autodisplay der NOx 104

7.2 Inkorporierung des FAD-Cofaktors 108

7.3 Autodisplay der FgaPT2 113

7.4 Fazit und Ausblick 116

8 LITERATURVERZEICHNIS 117

9 ANHANG 129

9.1 Abkürzungsverzeichnis 129

9.2 Sequenzen 132

9.3 Plasmidkarten 134

9.4 Veröffentlichungen 135