



DBU Abschlussbericht

Optimierung des
Bacillus megaterium-
Expressionssystems für die
umweltfreundliche
biotechnologische Synthese von
steroidalen Arzneimitteln

Aktenzeichen AZ 32269/01

Projektbeginn 1. Mai 2015

Zwischenbericht 12. Dezember 2016

Projektende 31. Dezember 2018

Kooperationspartner

Dr. Frank Hannemann und Prof. Dr. Rita Bernhardt (UdS),

arbeiten in der Universität des Saarlandes, sie besitzen langjährige Forschungserfahrung auf dem Gebiet der Ganz-Zell-Biotransformation von Steroiden, der gerichteten Evolution / des Proteindesigns, der Anwendung von mikrobiellen und humanen Cytochromen P450 sowie von Steroid-Dehydrogenasen.

Dr. Frank Hannemann und Prof. Dr. Rita Bernhardt

Universität des Saarlandes

Institut für Biochemie

66123 Saarbrücken

0681 302 4241 (RB) - 6671 (FH) - 3005 (Sekretariat)

f.hannemann@mx.uni-saarland.de ritabern@mx.uni-saarland.de

Dr. Martina Schad und Dr. Jim Kallarackal (OL),

sind Gründer und Geschäftsführer der Firma OakLabs GmbH. Die Firma bietet maßgeschneiderte Produkte und Dienstleistungen im Bereich Transkriptomanalyse und Entwicklung von Software und Algorithmen an.

Dr. Martina Schad

OakLabs GmbH (OL)

Neuendorfstr. 16b

16761 Hennigsdorf

03302 207 1391

m.schad@oak-labs.com

Dr. Nicolas Schauer (MD)

Ist Managing Director der Firma Metabolomic Discoveries GmbH. Die Firma befasst sich mit der Metabolom Analyse komplexer biologischer Proben. Mit hochauflösenden Massenspektrometern und vorgeschalteten, chromatographischen Auftrennungen werden sowohl polare als auch apolare Substanzen gleichzeitig erfasst.

Dr. Nicolas Schauer

Metabolomic Discoveries GmbH (MD)

Am Mühlenberg 11

14476 Potsdam

0331 87907885

schauer@metabolomicdiscoveries.com

Zusammenfassung

Die Förderperiode des von der DBU geförderten Projekts AZ 32269 sollte nach 3jähriger Förderung am 31.04.2018 enden. Neben der verspäteten Besetzung und Umbesetzung der Doktorandenstellen des Projektpartners UdS ergaben sich einzelne zusätzliche Verzögerungen durch Anpassen des Arbeitsprogramms (in AP4 Umstellung auf ein neues Reportersystems für die Promotorevaluierung, in AP2 Umstellen des Verfahrens auf das Enzym 11 β HSD1 als Alternative zum davor geplanten und untersuchten Enzym CYP106A1). Eine kostenneutrale Verlängerung wurde vom Projektträger bis zum 31.12.2018 bewilligt.

Das Projekt wurde trotz verzögerter Anfangsphase und Anpassung des Arbeitsprogramms in allen Arbeitspaketen erfolgreich beendet. Ein Verfahren zur Produktion von Kortisol mit erheblich verbesserten und umweltfreundlicheren Produktionsbedingungen wurde erarbeitet.

- Das Arbeitspaket **AP1** (Microarraydesign und Fermentationsetablierung) wurde erfolgreich abgeschlossen.
- Das **AP2** (Zellanzucht, Zeitreihe, Genexpressionsanalyse, Analyse intergenischer und Antisense-Signale, Metabolomanalysen, Aktivität 11 β HSD1, Optimierung der Prozessführung, Ökoeffizienzanalyse, Benchmarking) wurde ebenfalls erfolgreich abgeschlossen. Die Analyse der intergenischen und Antisense-Signale ergaben durchgehend sehr niedrige Signalintensitäten, so dass durch diesen Ansatz keine effizienten Promotoren zu identifizieren waren und die Arbeiten deshalb an dieser Stelle nicht weitergeführt wurden. Aufgrund höherer Produktausbeute und -selektivität wurde auf ein alternatives, auf der 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 (11 β HSD1) basierendes System umgestellt. Die Ökoeffizienzanalyse und das Benchmarking wurden in einem Unterauftrag von Prof. Elmar Heinzle durchgeführt.
- Im **AP3** (Identifizierung und Klonierung der Promotoren, Korrelation von Transkriptom & Metabolom) wurden zahlreiche putative Promotoren identifiziert und kloniert und das Screening (nicht wie geplant mit dem ungeeigneten eGFP sondern nach Umstellung mit β -Galaktosidase als Reporter gen) erfolgreich durchgeführt. Die Korrelation von Transkriptom- und Metabolomdaten wurde von den beteiligten KMUs ebenfalls evaluiert und abgeschlossen.
- Im **AP4** (Validierung der Promotoren, Induktor Identifizierung) ist die Validierung der klonierten Promotoren in der Verlängerungszeit abgeschlossen worden und die Ergebnisse wurden erfolgreich in AP5 weiterverwertet.
- Im **AP5** (Optimierung der Cortisonproduktion) wurden die Arbeiten ebenfalls in der Verlängerungszeit abgeschlossen. Die anfängliche Produktausbeute mit dem Enzym CYP106A2 lag bei 0,014 g L⁻¹ pro 24 h und einer Selektivität von 19,6% und konnte durch Umstellung auf das Enzym 11 β HSD1 auf eine Produktausbeute von 0,9 g L⁻¹ pro 24 h und einer Selektivität von 88,4% gesteigert werden. Während des AP5 konnte das Verfahren durch Modifikation des Enzyms und Änderungen der Fermentationsbedingungen weiter auf

eine finale Produktausbeute von $13,6 \text{ g L}^{-1}$ pro 24 h mit einer Selektivität von 98% gesteigert werden. Die geplante Erweiterung des **AP5** um die Reaktion zum pharmazeutisch relevanten Acetylcortison wurde nicht weitergeführt, da die *Bacillus megaterium* Stämme starke Deacetylierungsreaktionen zeigten und eine Stammoptimierung im Rahmen des Projekts nicht realistisch war.

- Im **AP6** (DirektArray Software, Modulerweiterung) wurden alle Projektarbeiten im Verlängerungszeitraum fertiggestellt.

- **Zusätzliche Arbeiten:** Die Zusammenarbeit mit MD wurde zum gezielten Screening nach Sekundärmetaboliten mit besonderer biotechnologischer Relevanz genutzt. Hier konnte das C30 Carotinoid Derivat Diaponeurosporensäure im Metabolom von *B. megaterium* nachgewiesen werden, dessen unmittelbarer Vorläufer Diaponeurosporen sich durch eine hohe Stabilität und vielversprechende Eigenschaften bezüglich der Prävention und Behandlung inflammatorischer Krankheiten auszeichnet. Durch Kombination mit den im Projekt entwickelten Promotorsystemen konnte ein Produktionsprozess für Diaponeurosporen als weitere Anwendung der Projektergebnisse aufgezeigt werden.

- Direkt aus der Projektarbeit sind folgende **Publikationen** hervorgegangen:

- 1) Hartz P, Mattes C, Schad M, Bernhardt R, Hannemann F., Expanding the promoter toolbox of *Bacillus megaterium*. *J Biotechnol.* 2019 Feb 13. pii: S0168-1656(19)30044-6.

- 2) Hartz P, Milhim M, Trenkamp S, Bernhardt R, Hannemann F., Characterization and engineering of a carotenoid biosynthesis operon from *Bacillus megaterium*., *Metab Eng.* 2018 ;49:47-58.

- 3) König L, Hartz P, Bernhardt R, Hannemann F, High-yield C11-oxidation of hydrocortisone by establishment of an efficient whole-cell system in *Bacillus megaterium*, *Metab Eng.* 2019; 55: 59-67.

Einleitung

Das Projekt verfolgte das generelle Ziel, effizientere Promotoren für die rekombinante Expression von Proteinen in *Bacillus megaterium* zu identifizieren und zu klonieren. Das sollte den Einsatz dieses für die Biotechnologie interessanten und wichtigen Wirtsorganismus verbessern und umweltfreundlicher gestalten. Eine höhere Expressionsrate von rekombinanten Proteinen und Biokatalysatoren, bedingt durch die verbesserten Promotoren in Kombination mit der geplanten Mutagenese des CYP106A1/11bHSD1 sowie der Anpassung des Kultivierungsprozesses und der Stammverbesserung sollten zu einer erheblichen Umweltentlastung bei der Cortisonproduktion führen. Die biotechnologische Produktion von steroidal Wirkstoffen mit diesem Mikroorganismus sollte dadurch entscheidend optimiert und umwelt- und ressourcenschonender werden. Diese Strategie sollte beispielhaft am Modell der Produktion von Cortison aus Cortisol (Abb. 1) entwickelt und getestet werden und das Potential einer breiteren Anwendung auf andere Reaktionen aufgezeigt werden.

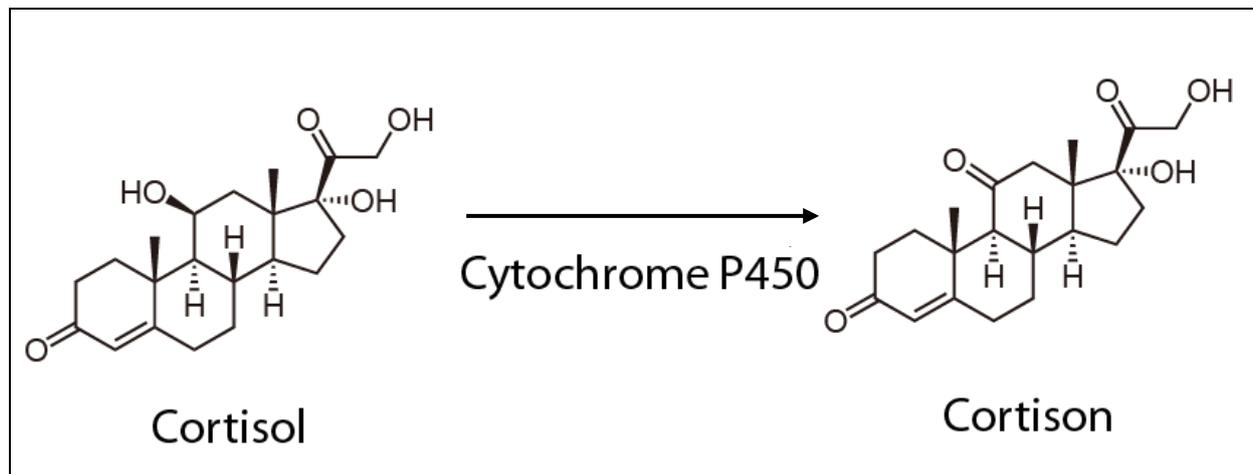


Abbildung 1 Cytochrom P450 katalysierte Reaktion von Cortisol zu Cortison

Folgende konkrete Ziele sollten entsprechend der Antragstellung erreicht werden:

- 1) Optimieren der Produktivität des P450 Systems durch Mutagenese und Redoxpartneranpassung und Etablieren einer Prozessführung (im Labormaßstab), um optimale Bedingungen für Proteinsynthese und Cortisonproduktion zu gewährleisten.
- 2) Identifizierung neuer effizienter Promotoren für die heterologe Produktion von Proteinen in *B. megaterium* (inklusive Induktoren/ Derepressoren) sowie Identifizierung eines sich zu Beginn der stationären Phase anschaltenden Promotors
- 3) Anwendung des/der neuen Promotoren für die Expression eines Cytochroms P450
- 4) Effizientere Produktion des Wirkstoffs Cortison (für das im AK Bernhardt ein neues CYP-abhängiges Laborverfahren entwickelt wurde) mit Hilfe des neuen Promotors und des durch Transkriptomics und Metabolomics optimierten Prozesses

- 5) Entwicklung eines experimentell validierten Microarrays für *B. megaterium* in zwei Formaten:
 - a. 8x15K Format für kosteneffiziente klassische Analyse der globalen Genexpression
 - b. 8x60K Format für umfassende Transkriptom-Analyse einschließlich Antisense- und Intergen-Expression
- 6) Entwicklung von Zusatz-Modulen für DirectArray, die essentiell für eine effiziente Auswertung der Genexpressionsanalysen sind:
 - Normalisierung auf Spike-In RNA
 - Kombination von Evaluierung der Signalintensitäten sowie deren relative Unterschiede zur Identifizierung starker Promotoren
 - Analyse von Antisense- und Intergen-Transkripten (Erarbeiten von Schwellenwerten, Integration mehrerer Parameter)
- 7) Etablierung eines gemeinsamen Angebots im Bereich der Metabolomics und Transcriptomics beider KMUs für neue Marktchancen und größeren Kundenkreis. Beinhaltet Entwicklung einer Software zur Datenintegration und –visualisierung

Die Projektarbeit wurde in 6 Arbeitspakete unterteilt und in dem folgendem Arbeitsprogramm tabellarisch erfasst. Wegen des verzögerten Arbeitsbeginns der Doktoranden an der UdS wurden die Arbeiten kostenneutral bis zum 31.12.2018 weitergeführt. Abgeschlossene Arbeiten sind grün dargestellt, nicht weitergeführte Arbeiten in grau.

Arbeitsprogramm DBU Projekt AZ 32269/01 (grün: Arbeit abgeschlossen, grau: Arbeit nicht durchgeführt)

AP	Partner	Q2'15	Q3'15	Q4'15	Q1'16	Q2'16	Q3'16	Q4'16	Q1'17	Q2'17	Q3'17	Q4'17	Q1'18	Q1'18 – Q4'18	
1	UdS	RNA/DNA; Protokolltablierung; Anzuchtparameter													
	OL	XL-Design; validiertes Microarray-Design													
	MD	Protokolltablierung; Anzuchtparameter													
2.1	UdS	Zellanzucht, Zeitreihe													
	OL	Genexpressionsanalysen und Analyse intergenischer und Antisense-Signale													
	MD	Metabolomanalysen													
2.2	UdS	Optimierung: Prozessführung, Aktivität CYP106A1/11ß_HSD, Redoxpartnerinteraktion, Etablierung Screeningsystem zur Molekularen Evolution													
2.2	Auftrag								Rechnung der Okobilanz 1, Benchmarking, Cortisonproduktion				Rechnung der Okobilanz 2		
	UdS								Klonierung der Promotoren, knock-out						
3	OL								Identifizierung der Promotoren und negativ regulierender ncRNA, Korrelation von Transkriptom & Metabolom						
	MD								Korrelation von Transkriptom & Metabolom; Metabolitenaufreinigung						
4	UdS								Validierung der Promotoren, Induktor-Identifizierung						
	UdS								Optimierung Cortisonproduktion im Ganzellsystem Stammoptimierung						
5	MD								Induktor-Identifizierung & Optimierung						
	OL	DirectArray Software, Modulerweiterung													
6	OL												DirectArray Software, Modulerweiterung		

Ergebnisse

AP1

RNA/DNA; Protokolletablierung; Anzuchtparameter

Als Voraussetzung zur Validierung des Microarray-Designs durch OL wurden Protokolle für die Bakterianzucht, DNA und RNA Präparationen der *B. megaterium* Stämme DSM319 und QMB1551 etabliert. Hierzu wurden DNA und RNA Präparationen nach Variation von Anzuchtmedien / Anzuchtzeiten und Präparationskits durchgeführt und durch entsprechende Agarosegelelektrophorese in Saarbrücken überprüft. Die hier erfolgreich überprüften Proben wurden zu OL nach Hennigsdorf geschickt und dort den strengen Kontrollen für die Microarray Entwicklung unterzogen. Die so als optimal für die Anzucht mit anschließender DNA/RNA Präparation bestätigten Bedingungen wurden zusammengefasst und in Form von Arbeitsanweisungen festgehalten. Die Anzucht erfolgte in einem adaptierten, von Korneli et al. (Biotechnol Bioeng. 2012 Jun;109(6):1538-50, Appl Microbiol Biotechnol. 2013 Apr;97(8):3343-53.) für *B. megaterium* beschriebenen Minimalmedium, das im späteren Projektverlauf auch für die Fermentation eingesetzt wurde. Für den Zellaufschluss wurde ein Verfahren mit dem Enzym Endolysin aus dem Phagen Φ 28 etabliert, das die schonende Lyse der Zellwand des Bakteriums bis zu Anzuchtzeiten von 48 h erfolgreich ermöglichte. Für Präparation von DNA und RNA wurden die Kits der Firma Macherey und Nagel adaptiert.

Entsprechend der so etablierten Protokolle wurden DNA und RNA Proben der Stämme DSM319 und QMB1551 für die Analyse bei OL vorbereitet und nach Hennigsdorf versendet.

XL-Design; validiertes Microarray-Design

Bei OL in Hennigsdorf wurden zwei universelle Microarray Designs für *B. megaterium* erstellt. Für die Entwicklung wurde die Datenbasis der drei sequenzierten *B. megaterium* Stämme (DSM319, QMB1551 und WSH002) verwendet.

Auf Basis der Transkriptom-Sequenzen wurden für alle Stämme bis zu 15 verschiedene isothermale Oligonukleotide für jede kodierende und nicht-kodierende Sequenz konstruiert. Für die intergenischen Bereiche wurden isothermale Oligonukleotide mit einem Spacing von etwa 50 Basenpaaren (Abstand der Startpunkte zwischen zwei benachbarten Oligonukleotiden) konstruiert.

Alle konstruierten Oligonukleotide wurden in einem 400K Design angeordnet und die Produktion der entsprechenden 2x400K Microarrays durch Agilent veranlasst.

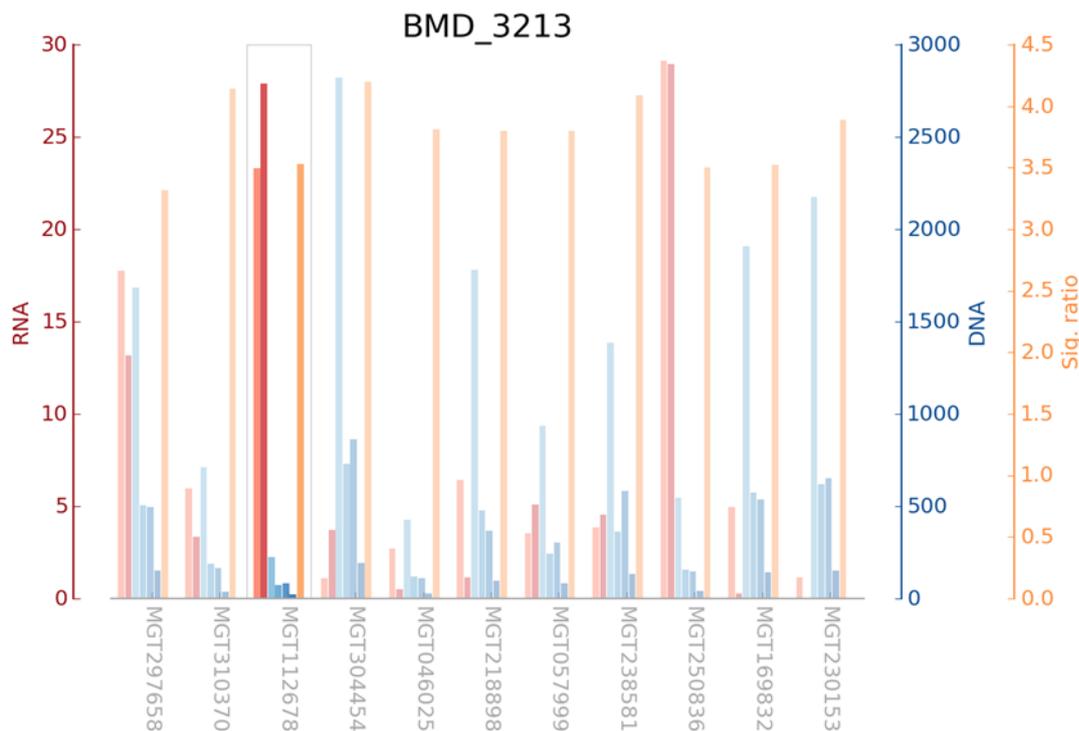


Abbildung 2 : Für ein Gen ist die Auswahl des Oligonukleotids für das 15K Design dokumentiert. Dargestellt sind die Signalintensitäten der RNA (rot) und DNA (blau) Hybridisierungen für jedes getestete Oligonukleotid, sowie das Verhältnis der Signalintensitäten aus den verschiedenen Hybridisierungsmengen (orange). Das für das 8x15K selektierte Oligonukleotid ist markiert.

Für die experimentelle Validierung standen RNA und DNA Proben der Stämme DSM319 und QMB1551 zur Verfügung. Die Proben wurden prozessiert, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf den 2x400K Microarrays hybridisiert.

Basierend auf den Hybridisierungsdaten wurde für jedes Gen das optimale Oligonukleotid ausgewählt. Dabei wurden einschließlich, jedoch nicht begrenzt, folgende Parameter gewichtet:

- Signalintensität
- Isolat-unabhängig gute Performance
- Lage innerhalb der Gensequenz
- Fähigkeit der Detektion eines differentiellen Unterschieds

Für jedes Gen wurde eine Abbildung erzeugt, in der die Signalintensitäten aller getesteten Oligonukleotide dargestellt und das selektierte Oligonukleotid farbig markiert ist (Abb.2)

Die selektierten Oligonukleotide wurden in einem 15K Design angeordnet; die resultierenden 8x15K Microarrays stehen für die genomweite hochqualitative Genexpressionsanalyse in *B. megaterium* zur Verfügung.

Die Selektion der Oligonukleotide für die umfassende Transkriptom-Analyse einschließlich Antisense- und Intergen-Expression für ein 60K Design auf Basis der vorliegenden Hybridisierungsdaten wurde derzeit durchgeführt und wird demnächst für die Analyse zur Verfügung gestellt.

Protokolletablierung; Anzuchtparameter

Medienzusammensetzungen und Anzuchtprotokolle für *B. megaterium* wurden von UDS zusammengestellt und MD zur Prüfung übermittelt um mögliche mit der Metabolomstudie bei MD inkompatible Komponenten zu identifizieren. Hierbei wurden entsprechende Hinweise berücksichtigt und das Minimalmedium wie für die RNA/DNA Präparationen auch für die folgenden Fermentationen festgelegt. Das Medium enthält folgende Komponenten: Na₂HPO₄ 42,3 mM, KH₂PO₄ 22,1 mM, NaCl 8,6 mM, NH₄Cl 18,7 mM, Casaminoacids 2,0 g/L, CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄ 2 mM, Thiamin 1 µM, Glycerin 3 %, EDTA 6,7 mM, FeSO₄·7H₂O 50 µM, MnCl₂·4H₂O 10 µM, ZnCl₂ 10 µM, CoCl₂·6H₂O 2 µM, CuCl₂·2H₂O 2 µM, NiCl₂·6H₂O 2 µM, Na₂MoO₄·2H₂O 2 µM, Na₂SeO₃·5H₂O 2 µM, H₃BO₃ 2 µM, Antifoam. 0,05%, Tetracyclin 10mg/L.

Eine Standard Operating Procedure (SOP) zur Probennahme wurde von MD erstellt und von UDS an die Laborbedingungen in Saarbrücken angepasst. Dementsprechend wurden Proben direkt aus dem Fermentationsbehälter in eine auf -20°C vorgekühlte 60 % (v/v) Methanol (HPLC-grade) Quenchinglösung überführt und bei -10 °C zentrifugiert. Diese so präparierten Zellen sowie entsprechende Kontrollen wurden auf Trockeneis gekühlt zur Qualitätskontrolle der Metabolomanalyse nach Potsdam zu MD geschickt. Gleichzeitig wurden daraus DNA/RNA Präparation durchgeführt und zum Verfahrenstest zu OL nach Hennigsdorf überführt. Die so als geeignet für die Anzucht und die Probenentnahme und Aufbereitung bestätigten Bedingungen wurden in Form einer adaptierten Arbeitsanweisung festgehalten und wurden für die weiteren Probennahmen aus den Fermentationsläufen beibehalten.

AP2.1

Zellanzucht, Zeitreihe

Für die Zellanzucht im Fermenter wurden folgende Bedingungen bei UdS in Saarbrücken eingestellt:

Eine Glycerinkultur wurde als Inoculum für eine Vorkultur in einem 200ml Schüttelkolben mit 50 ml Minimalmedium genutzt. Die Kultur wurde für 12 h bei 37°C and 130 UpM inkubiert (Innova 4230, New Brunswick Scientific), gewaschen und daraus die Hauptkultur beimpft. Die Hauptkultur wurde in

einem 2,5 l Bioreaktor (Infors, Minifors) bei 30°C pH 6,0 und Startvolumen von 1 l Minimalmedium betrieben. Zum Start der Kultivierung wurde eine Rühr-geschwindigkeit von 500 UpM und eine Luftbegasung mit 2,5 l min⁻¹ eingestellt. Während der Fermentation wurde von der Bioreaktor Kontrollsoftware die gelöste Sauerstoffkonzentration auf 20% Sättigung durch Kontrolle der Rührgeschwindigkeit geregelt. Nachdem der reproduzierbare Ablauf der Fermentation durch Kontrolle der Wachstumskurven (Messung der OD578 und Bestimmung der Feuchtmasse) sichergestellt werden konnte, wurden 3 unabhängige Fermenterläufe durchgeführt und entsprechend der Abstimmung mit OL und BD aus 4 Wachstumsphasen beprobt. Die Proben wurden für die genomweite Genexpressionsanalyse bei OD sowie für die Metabolomanalyse bei BD aufgearbeitet und auf Trockeneis gekühlt versendet.

Genexpressionsanalysen und Analyse intergenischer und Antisense-Signale

Genomweite Genexpressionsdaten von den ersten 24 Proben wurden erfolgreich aufgenommen. Dabei wurden Proben von drei unabhängigen Fermentationen, bei vier Zeitpunkten, prozessiert und auf den 8x15K Microarrays hybridisiert. Um das Ausmaß der technischen Varianz der Fermentationen abzuschätzen, wurde außerdem ein technisches Replik mitgeführt, d.h. bei einer Fermentation wurden von jedem Zeitpunkt zwei Proben analysiert. Die Reproduzierbarkeit der Fermentationen ist zufriedenstellend hoch, die Pearson Korrelationen liegen um 0,96.

Es wurden statistische Vergleiche zwischen den verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt und signifikant differentiell exprimierte Gene identifiziert und in Form von Heat-Maps und Volcano-Plots visualisiert.

Um die Interpretation der teilweise einige hundert Gene umfassenden Genlisten zu erleichtern, wurden Pathway Analysen durchgeführt (Abb. 3).

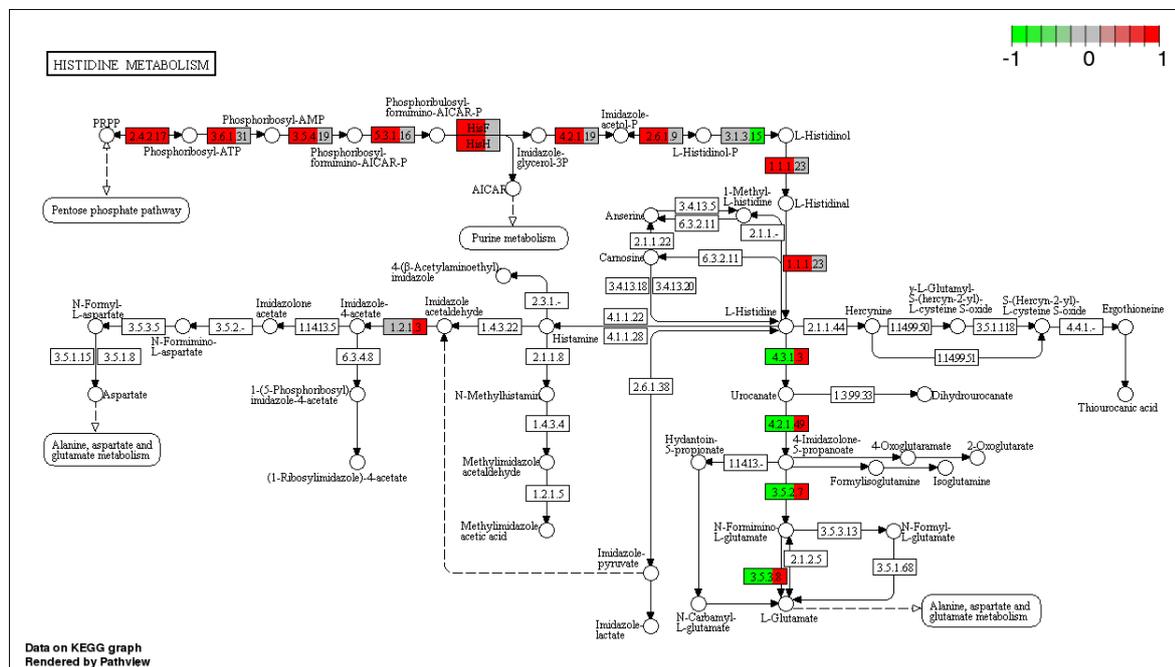


Abbildung 3 Exemplarische Karte eines relevanten Stoffwechselwegs, in dem die differentiell exprimierte Gene der Vergleiche der drei Wachstumsphasen visualisiert sind. Je ein Drittel eines Kästchen repräsentiert die Expression der entsprechenden Gene eines statistischen Vergleichs (z.B. Zeitpunkt 2 vs. Zeitpunkt 1). Hoch regulierte Gene sind rot und herunter regulierte Gene sind grün dargestellt.

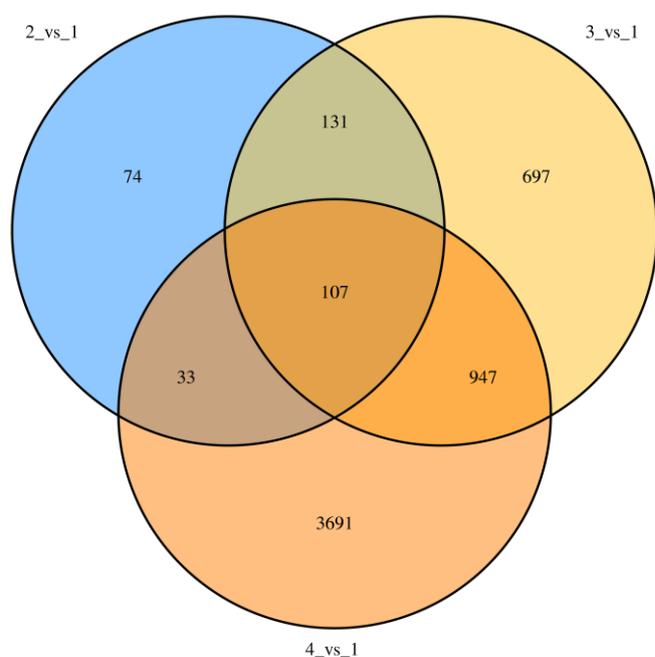


Abbildung 4 Venn Diagramm der 3 statistischen Vergleiche liefert Ansatzpunkte für die weitere Auswertung.

Dazu wurden zunächst den Gensequenzen KEGG orthologe Gene zugeordnet, um mit öffentlich zugänglichen Tools relevante Pathways identifizieren zu können und anschließend die differentiell exprimierte Gene in Pathway Maps zu visualisieren. So wurden die langen Genlisten auf max. zehn übersichtliche Abbildungen heruntergebrochen. Geplant war es, Transkriptom- mit Metabolom-Daten zu korrelieren. Hierfür sollten im weiteren Projektverlauf z.B. in den Pathway Maps neben den differentiellen Genen auch differentielle Metabolite dargestellt werden, die von MD

aufgenommen wurden. Hierfür sind Absprachen zwischen OL und MD über Darstellungsmöglichkeiten und Übergabe-Formate erfolgt, so dass die Zusammenfassung beider Datensätze ermöglicht wurde.

Die Analyse von Antisense- und Intergen-Transkripten wurde bei ausgewählten, interessant erscheinenden Proben durchgeführt, die im weiteren Projektverlauf durch genomweite Analysen mittels 8x15K Microarrays bzw. Metabolom-Analysen charakterisiert wurden.

Metabolomanalysen

Zusätzlich zur Transkriptom-Analyse sollten neue Promotoren, die entweder konstitutiv oder in spezifischen Wachstumsphasen aktiv sind, auch auf Metabolom-Ebene bestätigt werden. Metabolite, deren Level entweder konstant ist oder zu einem bestimmten Zeitpunkt der Fermentation steigt, könnten mit Promotoren korrelieren, die konstant aktiv oder spezifisch induziert sind. Dazu wurden im ersten Schritt die Zeitverläufe der in der Metabolomanalyse detektierten Metabolite untersucht. Im nächsten Schritt sollten die erhaltenen Daten in Kooperation mit OL mit den Transkriptom-Daten korreliert werden.

Damit die geplanten Transkriptom- und Metabolom-Analysen den aktuellen Zustand im Fermenter abbilden, ist das sofortige Abstoppen enzymatischer Reaktionen während der Probenahme eine wichtige Voraussetzung. Dazu wurde in Kooperation mit allen Projektpartnern ein Probenahmeprotokoll für *Bacillus megaterium* entwickelt, das dies einerseits gewährleistet und zum anderen die technischen Möglichkeiten am Fermenter berücksichtigt sowie Wechselwirkungen mit den empfindlichen späteren Transkriptom- und Metabolom-Analysen ausschließt. Das Protokoll, das diese Voraussetzungen erfüllt, beinhaltet die schnelle Probenahme in ein gekühltes Methanol/Wasser-Gemisch direkt am Fermenter. In einem kleinen Testansatz konnte gezeigt werden, dass diese Probenahme für alle Projektpartner geeignet ist, mit den folgenden Analysen harmonisiert und keine Wechselwirkungen durch störende Chemikalien zeigt.

Ebenfalls wurden die Anzahl und Art der gewünschten Replikate (technische und biologische) und die unterschiedlichen Zeitpunkte mit den Projektpartnern diskutiert und abgestimmt. Als Ergebnis wurden drei unabhängige *Bacillus megaterium* Fermentationen (Fermenter 1-3) in vier unterschiedlichen Wachstumsphasen untersucht. Während der ersten Fermentation wurden zu jedem der vier Probenahmezeitpunkte zwei technische Replikate genommen, aus Fermenter 2 und 3 jeweils eine Probe pro Zeitpunkt.

MD hat ein Extraktionsprotokoll für die umfassende Metabolitanalyse in *Bacillus megaterium* entwickelt. Der Zellaufschluss erfolgte mit Glasperlen, als organisches Lösungsmittel für die Extraktion der Metabolite wurde Methanol verwendet. Verschiedene Konzentrationen wurden analysiert, um die jeweils optimale Konzentration für die unterschiedlichen analytischen Geräte zu bestimmen.

Die globale, nicht zielgerichtete Metabolitanalyse umfasste die Analyse mittels GC-MS und LC-QTOF/MS. Mit diesen Methoden können Metabolite im Bereich von 50 - 1700 Da mit einer Massengenauigkeit von 1-2 ppm (für die LC) und einer Auflösung von $\text{Masse}/\Delta\text{Masse} = 40.000$ analysiert werden. Metabolite, die mittels LC gemessen wurden, wurden anhand ihrer akkuraten Masse, der daraus resultierenden Summenformelberechnung und der Retentionszeit annotiert, Metabolite aus der GC anhand des Retentionsindex und Massenspektrums.

Insgesamt wurden 533 Metabolite in allen Proben analysiert. Diese Zahl umfasst alle gemessenen Substanzen, die mit Hilfe der Datenbank von Metabolomic Discoveries annotiert werden konnten. Detektierte unbekannte Substanzen wurden nicht in die Analyse einbezogen, da die Integration mit den Transkript-Daten nicht möglich ist. Für einen ersten Überblick über das Datenset wurde eine Principal Component Analysis (PCA) durchgeführt (Abb. 5).

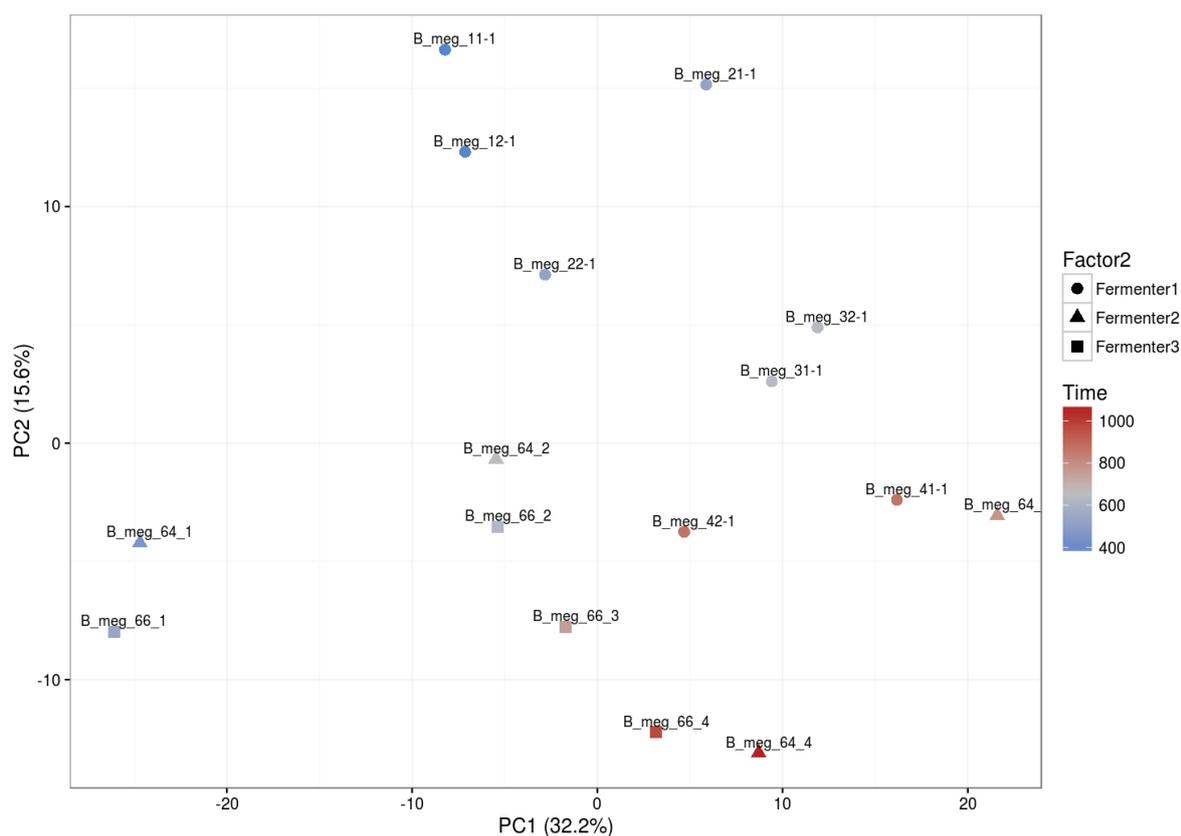


Abbildung 5 Principal Component Analysis (PCA), PC1 vs. PC2. Der Farbverlauf der Proben spiegelt die Probenahmezeitpunkte wider (blau: frühe Zeitpunkte, rot: späte Zeitpunkte). Die Form entspricht den unterschiedlichen Fermentern (Kreis: Fermenter 1, Dreieck: Fermenter 2, Quadrat: Fermenter 3).

Die PCA zeigt eine Verteilung der Proben über den Faktor Zeit. Ebenfalls wird eine relativ große Varianz der biologischen Replikate (gleiche Zeitpunkte, unterschiedliche Fermenter) deutlich. Dies spiegelt die Tatsache wider, dass sich die metabolische Zusammensetzung der

Zellen über die verschiedenen Phasen im Fermentationsverlauf sehr schnell ändert, was eine Probenahme zu vergleichbaren Fermentationszeitpunkten sehr schwierig macht, da die Zellen selbst zu einem gleichen Probenahmezeitpunkt in einer anderen Phase des Wachstums sein können.

In Abbildung 6 ist die Principal Component 1 (PC1) gegen PC4 gezeigt. Auch hier ist die Varianz innerhalb der Zeitpunkte sichtbar, aber der Zeitverlauf ist trotzdem auch hier sehr deutlich.

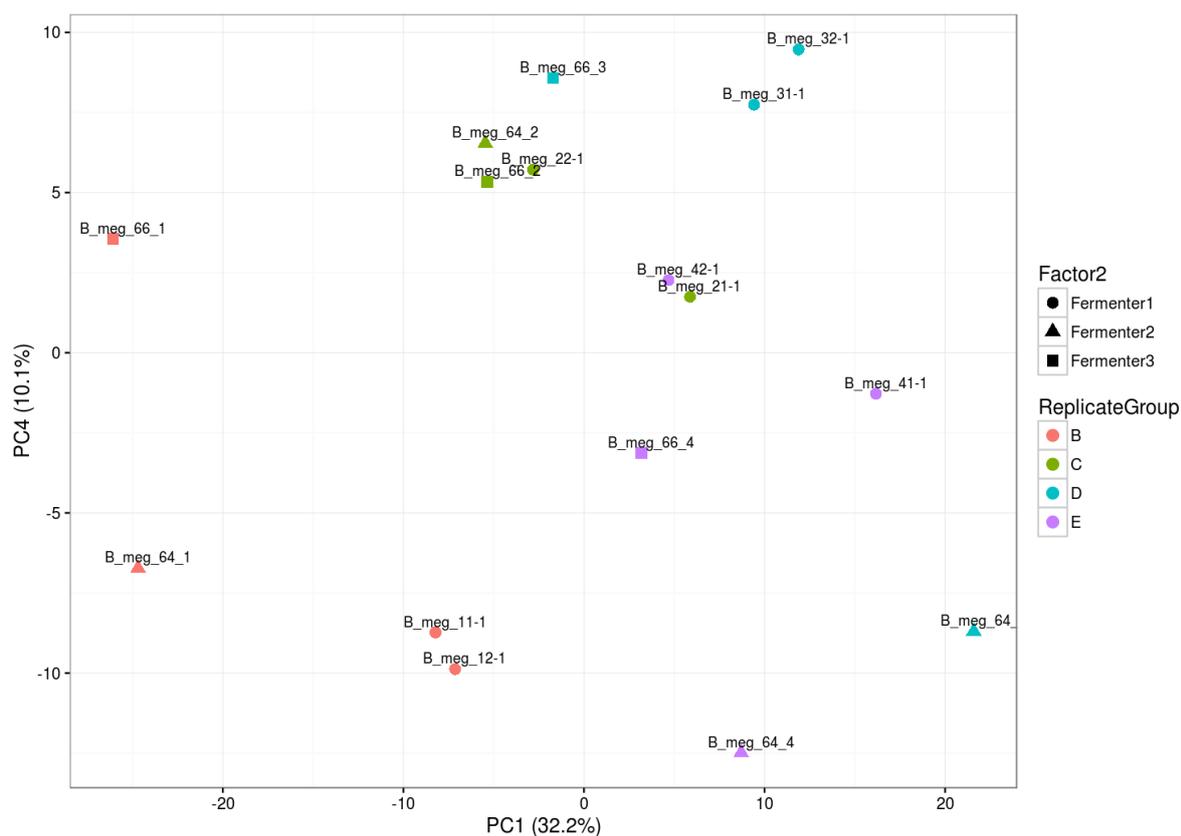


Abbildung 6 Principal Component Analysis (PCA), PC1 vs. PC4. Die unterschiedlichen Probenahmezeitpunkte sind farblich dargestellt (rosa: Zeitpunkt 1, grün: Zeitpunkt 2, blau: Zeitpunkt 3, lila: Zeitpunkt 4). Die Form entspricht den unterschiedlichen Fermentern (Kreis: Fermenter 1, Dreieck: Fermenter 2, Quadrat: Fermenter 3).

In der differentiellen Analyse wurde jeder Zeitpunkt mit dem ersten Probenahmezeitpunkt verglichen. Trotz der oben erwähnten Varianz konnten signifikante Unterschiede zu jedem Zeitpunkt gefunden werden. Ebenfalls konnten Metabolite identifiziert werden, die einen Anstieg über den Fermentationsverlauf zeigen.

Die Ergebnisse der differentiellen Analyse sind in Abb. 7 als "volcano-plot" visualisiert. Ein "volcano-plot" zeigt eine Übersicht über alle Veränderungen (x-Achse) und deren Signifikanz (y-Achse).

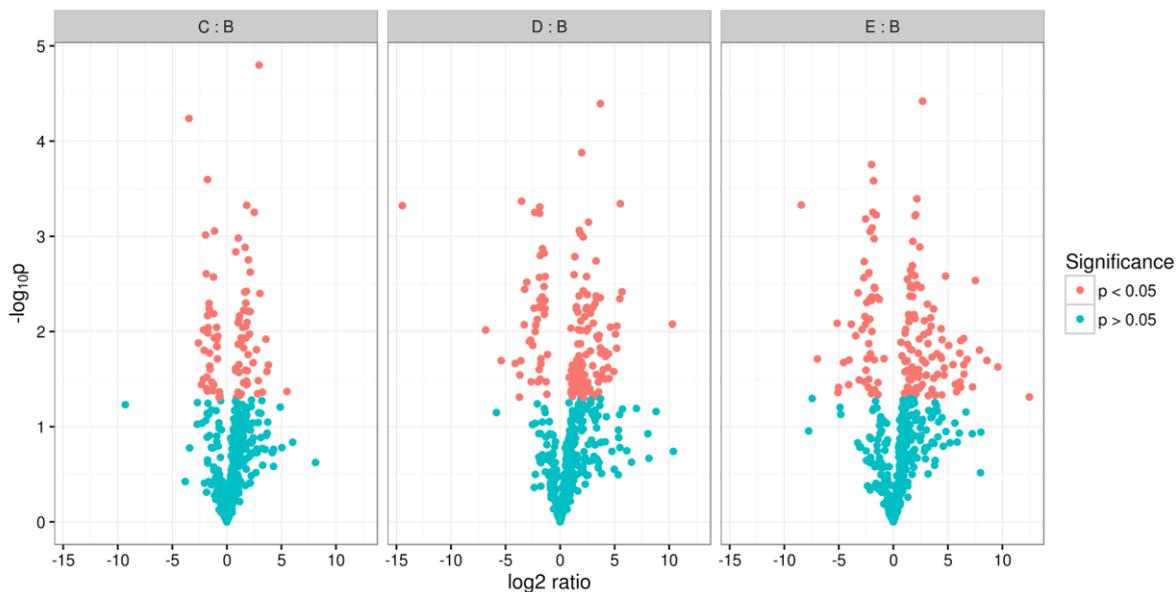


Abbildung 7 Volcano plots. Übersicht über alle Metabolit-Veränderungen über die Zeit. Jeder Zeitpunkt wurde mit dem ersten Probenahmezeitpunkt verglichen (B: 1. Zeitpunkt, C: 2. Zeitpunkt, D: 3. Zeitpunkt, E: 4. Zeitpunkt). Der jeweilige x-fold ist als log₂ auf der x-Achse dargestellt (<0 bedeutet eine relative Abnahme des Metaboliten gegenüber dem 1. Zeitpunkt, >0 eine Zunahme gegenüber dem 1. Probenahmezeitpunkt), der Signifikanzwert (-log₁₀) auf der y-Achse. Alle signifikant (p<0.05) veränderten Metabolite sind rot dargestellt.

Die meisten Metabolite, deren Konzentrationen sich über den Fermentationsverlauf verändern, zeigen einen Anstieg über die Zeit. Metabolite, die konstant über den Fermentationsverlauf mit einem adjustierten, globalen Signifikanzwert von p<0.05 ansteigen, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 2.1. Metabolite mit einem konstanten Anstieg über den Fermentationsverlauf (globaler, adjustierter p<0.05)

Metabolite	C/B: local.p	C/B: ratio	D/B: local.p	D/B: ratio	E/B: local.p	E/B: ratio
2-Methyl-1-methyl-thio-2-butene	0.796	0.493	0.205	3.109	0.012	6.184
Betaine	0.509	0.620	0.012	3.504	0.652	0.453
2-Acetylpyrazine	0.012	3.580	0.011	5.075	0.513	0.655
6,8-Dihydroxy-purine	0.376	0.422	0.152	0.788	0.024	9.579

Lys-Thr-Thr-Tyr	0.980	0.021	0.699	0.541	0.022	6.455
4-Methylene-L-glutamine	0.035	1.876	0.009	4.613	0.003	4.786
DG (20:2n6/0:0/20:5n3)	0.026	0.808	0.000	1.984	0.003	1.284
DG (16:0/24:0/0:0)	0.133	0.922	0.010	1.918	0.000	2.682
PG(O-36:4)	0.191	0.522	0.315	0.390	0.003	2.154
3-Hydroxy-2-pentanone	0.381	0.857	0.024	1.921	0.009	4.376
Serine	0.391	2.149	0.005	5.476	0.164	3.170

Um Metabolite zu gruppieren, die einen ähnlichen Zeitverlauf zeigen, wurden die Zeitverläufe aller Metabolite geclustert. Dazu wurde zuerst die optimale Anzahl der Cluster festgelegt, die die generellen Verläufe am besten beschreibt. Das anschließende Clustering zeigt die verschiedenen Typen von Metabolit-Zeitverläufen (Abb. 8).

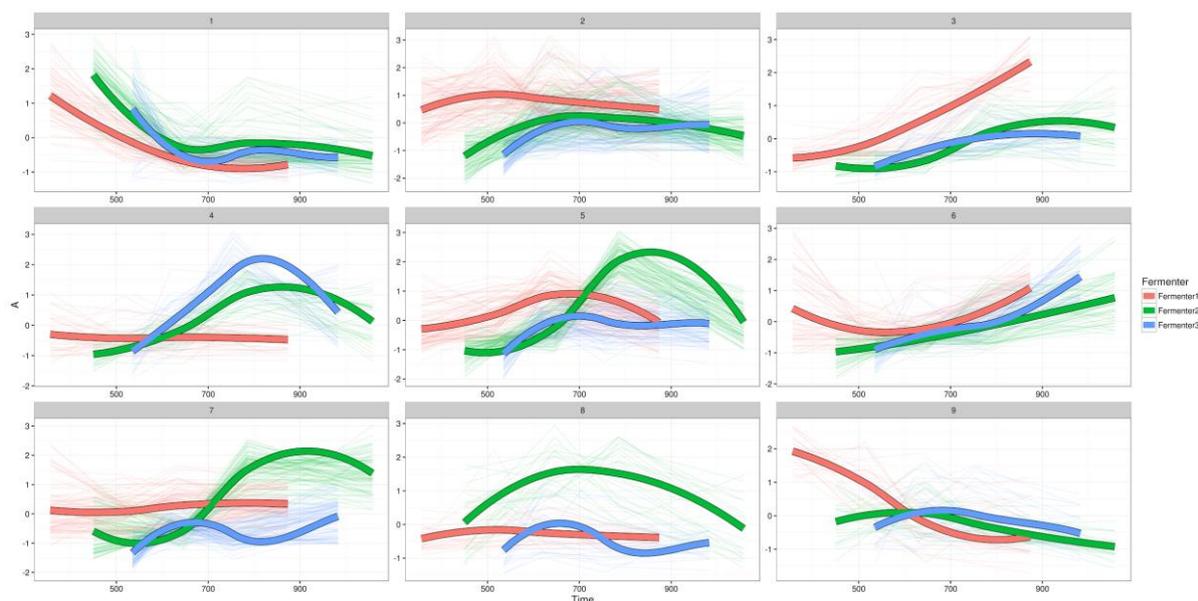


Abbildung 8 Cluster der Metabolit-Verläufe. Im ersten Schritt wird die optimale Anzahl der Cluster festgelegt, die am besten alle unterschiedlichen Metabolit-Verläufe beschreibt. Die Metabolite fallen in neun unterschiedliche Cluster. Für jedes Cluster ist der gemittelte Verlauf aller Metabolite für jeden Fermenter gezeigt (rosa: Fermenter 1, grün: Fermenter 2, blau: Fermenter 3)

Das Clustering zeigt noch einmal, dass sich Fermentation 1 am meisten von den anderen beiden Fermentationen unterscheidet. Die Zeitverläufe sind leicht verschoben (s. Cluster 4 und 5). Das bedeutet vermutlich, dass die Zeitpunkte zu leicht unterschiedlichen Phasen der Fermentation genommen wurden, was zu der beobachteten Varianz führt.

Cluster 2 erschien interessant, da es Metabolite enthält, die sich während der Fermentation nicht signifikant veränderten. Dies könnte bedeuten, dass diese Metabolite in einem konstanten Fluss sind und ihre Produktion und Metabolisierung in einem gleichen Verhältnis stehen, oder diese Substanzen sind von Beginn an da und werden nicht weiter metabolisiert.

Cluster 3 und 4 zeigten ebenfalls interessante Daten, da sie Metabolite enthalten, deren Gehalt über die Zeit ansteigt, d. h. ihre Produktion steigt konstant bzw. startet erst in einer bestimmten Wachstumsphase.

Das Clustering zeigte somit interessante Metabolitcluster, die entweder auf eine konstante Produktion während der gesamten Fermentation hinweisen oder auf eine induzierte Produktion zu spezifischen Phasen. Im nächsten Schritt wurde mit der Integration der Metabolit- und Transkript-Daten begonnen, um mögliche, bisher identifizierte Targets zu verifizieren. Die Integration der Daten wurde jedoch nach der Korrelationsanalyse der beiden Datensätze abgebrochen, weil die Ergebnisse keine zusätzlichen, interessanten Einblicke lieferten.

AP2.2

Optimierung: Prozessführung, 11 β HSD1-Aktivität und Produktselektivität

Der folgende Abschnitt beschreibt die Etablierung und Anwendung eines biokatalytischen Prozesses zur Cortisonproduktion. Anhand der zuvor durchgeführten RNA- und Metabolomanalysen konnten neue und potenziell einsatzfähige Promotoren in *B. megaterium* identifiziert und zur Durchführung eines Benchmarkings und einer anschließenden ökologischen Bewertung genutzt werden. Hierzu diente die biokatalytische Oxidation von Hydrocortison zu Cortison im optimierten *B. megaterium* Ganzellsystem.

Da Hydrocortison einerseits von der Firma Sanofi demnächst mit Hilfe eines Hefe-Designer Stammes biotechnologisch produziert werden soll, andererseits aber auch aus anderen Quellen auf dem Weltmarkt verfügbar ist, würde eine weitere biotechnologische „Veredlung“ dieses Ausgangsproduktes zu einer erheblichen Wertsteigerung führen (Sigma-Aldrich € / pro Gramm: Hydrocortison 37.80, Cortison 96.50; Stand 21.01.2019). Hierbei sind in Anbetracht der potentiell großen Produktionsmengen Ganzell-Biotransformationen

sinnvoll, da sie skalierbar sind und der Produktionsmaßstab somit praktisch nur von der Größe der verfügbaren Fermentationseinrichtungen abhängt.

Zur Katalyse dieser Reaktion wurde im Projektantrag das Cytochrom P450 CYP106A1 als mögliches Enzym vorgestellt, welches als etabliertes, jedoch optimierungsfähiges Ganzzellsystem in *B. megaterium* zur Verfügung stand und dessen katalytischen Aktivität mittels molekularer Evolution und Redoxpartneroptimierung erhöht werden sollten¹.

Aufgrund höherer Produktausbeute und -selektivität wurde nach einer Gegenüberstellung ein alternatives, auf der 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 (11 β HSD1) basierendes System, zur weiteren Prozessoptimierung gewählt. Hierzu wurde ein plasmid-vermitteltes heterologes System mit 11 β HSD1 der Spezies *Cavia porcellus* und der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (*LbADH*) etabliert, welches die Produktion hoher Konzentrationen an löslichen, aktiven Proteinen und zeitgleich die effiziente Regeneration von NADP⁺ in *B. megaterium* ermöglicht (Abb. 9).

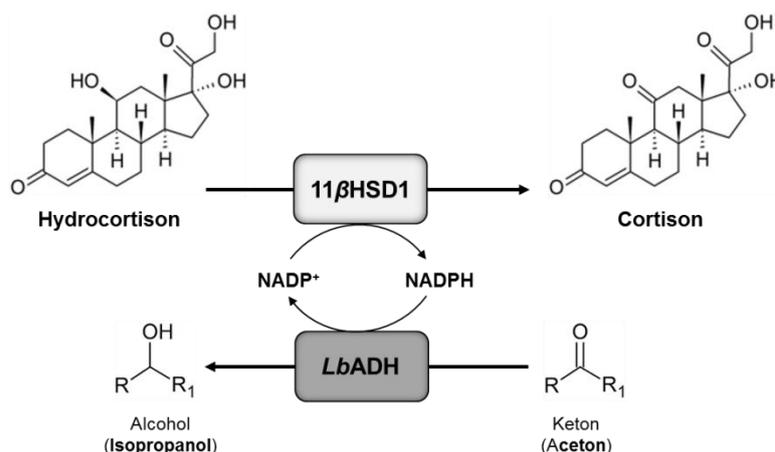


Abbildung 9: Kofaktorregenerierung. Schematische Darstellung der Kofaktorregenerierung durch *LbADH* in Biotransformationen mit 11 β HSD1.

Zhang *et al.* beschrieben erstmals die funktionelle Expression der *Cavia porcellus* 11 β HSD1 zur biotechnologischen Umsetzung von Cortison zu Hydrocortison durch ein *E. coli*-basiertes Ganzzellsystem². Da das Enzym sowohl zur Katalyse der Oxidoreduktion (Bildung von Hydrocortison) als auch der Dehydrogenierung (Bildung von Cortison) fähig ist, wurde das Enzym als Alternative zu CYP106A1 in das Projekt aufgenommen.

Bei der 11 β HSD1 handelt es sich um ein in Eukaryonten produziertes mikrosomales Membranprotein mit einer Molekularmasse von 34 kDa. Es zählt zur Superfamilie der Short-chain Dehydrogenase Reduktasen (SDR). In Eukaryoten ist das Protein mit einem N-terminalen Membrananker in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER)

eingebettet, wohingegen der C-Terminus, der die katalytische Domäne enthält, in das Lumen des ERs ragt.

Kofaktor-Regenerierung

In intakten Zellen agiert das Enzym 11 β HSD1 vorwiegend als Oxidoreduktase, wohingegen sie in humanen Zellhomogenaten der Leber, abhängig von vorhandenen Kofaktoren, bidirektional interagiert. Im ER Lumen herrscht ein hohes NADPH/NADP⁺ Verhältnis durch die Aktivität der kolokalisierten Hexose-6-phosphat Dehydrogenase (H6PDH), deren Aktivität das Gleichgewicht der 11 β HSD1 katalysierten Reaktion bestimmt^{3,4}. Ist keine H6PDH vorhanden, wie beispielsweise in humanen Präadipozyten, ist das Reaktionsgleichgewicht der 11 β HSD1 in Richtung der Dehydrogenierung von Hydrocortison zu Cortison verschoben⁵. Dieser Effekt ist ebenfalls nach dem Verlust der H6PDH-Aktivität zu beobachten, welcher durch inaktivierende Mutationen im Enzym hervorgerufen werden kann⁶.

Um die maximale Aktivität des heterologen Systems in *B. megaterium* zu gewährleisten und einer möglichen NADP⁺ Limitierung vorzubeugen, wurde die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (*LbADH*) während der Kultivierung im selben Wirt produziert. Hierbei handelt es sich um ein Enzym, ausgezeichnet durch dessen hohe Effizienz und Stabilität, welches bereits häufig in biotechnologischen Prozessen Anwendung findet⁷. Durch dessen Koproduktion in Fermentationskulturen ist es möglich, anfallendes und überschüssiges NADPH als Kosubstrat für eine simultane Reduktion von Ketonen zu nutzen, welche in der Bildung der korrespondierenden Alkohole und NADP⁺ resultiert. Da NADP⁺ anschließend wiederum als Kofaktor der gewünschten Dehydrogenierungsreaktion genutzt wird, stellt dieses System einen eleganten und nahezu unerschöpflichen Kreislauf zur Kofaktor-Regeneration dar.

Die extern generierten Gene der 11 β HSD1 und *LbADH* wurden durch Klonierung in ein speziell für *B. megaterium* entwickeltes Vektorrückgrat eingefügt, womit die heterologe Expression von 11 β HSD1 und *LbADH* unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors ermöglicht wurde. Die Kultivierung erfolgte hierbei in gepuffertem Komplexmedium (TB Medium) in Erlenmeyerkolben. Der anschließende Ganzzellumsatz wurde durch die Überführung der Zellen in ein Kaliumphosphat Puffer-System mit definierter Zelldichte (100 g L⁻¹) in Reagenzgläsern durchgeführt. Durch die anschließende Analyse mittels Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (reverse-phase high pressure liquid chromatography; RP-HPLC) konnte eine erfolgreiche Umsetzung von Hydrocortison zu Cortison beobachtet werden. Zusätzlich konnte eine Steigerung der Ausbeute und eine zusätzliche Eliminierung einer wirtsspezifischen Nebenproduktbildung durch die Zugabe von 2,5% Aceton zur Umsatzkultur erreicht werden. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 10 die Chromatogramme der biotechnologischen Umsetzung von

Hydrocortison (100 μM) mit und ohne Zugabe von Aceton nach einer Reaktionszeit von einer Stunde dargestellt. Nach einer Feinjustierung der Acetonkonzentration auf 2% konnte die Cortisonausbeute um den Faktor 3.3 (im Vergleich zu Ganzzellumsätzen ohne Acetonzugabe) gesteigert werden. Dies lässt sich sowohl auf eine erhöhte Geschwindigkeit und Effizienz als auch auf eine erhöhte Produktselektivität der Reaktion zurückführen, da der erzeugte Mangel an NADPH innerhalb der Zelle vermutlich die Aktivität bestimmter wirtsspezifischer und unerwünschter Folgereaktionen von Cortison herabsetzt.

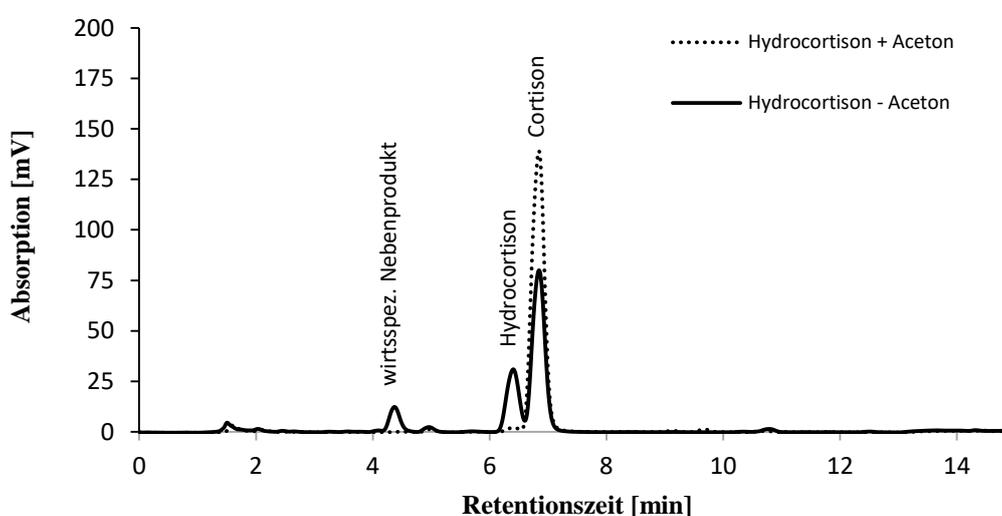


Abbildung 10 : Chromatogramme der Ganzzellumsätze von 100 μM Hydrocortison in *B. megaterium* mittels RP-HPLC. Dargestellt sind die Produktmuster der Reaktion nach einer Stunde in Abhängigkeit der Acetonzugabe.

Enzymmodifikation

Um die $11\beta\text{HSD1}$ zur effizienten Biotransformation von Hydrocortison zu Cortison in *B. megaterium* zu nutzen, wurde die Synthese des $11\beta\text{HSD1}$ Gens der Gattung *Cavia porcellus* veranlasst. Diese weist im Vergleich zur humanen Version eine erhöhte Produktion des löslichen Proteins auf. In isolierter, löslicher Form (durch die Deletion der N-terminalen Transmembrandomäne) zeigte das Enzym eine erhöhte Aktivität der Dehydrogenierung mit Hydrocortison als Substrat *in vitro*⁸. Zusätzlich zeigten Analysen der Enzymkinetik ausschließlich in *Cavia porcellus* Lebermikrosomen eine ähnliche Affinität zu beiden Substraten, wohingegen in anderen Säugetierspezies eine 10-fach erhöhte Affinität von $11\beta\text{HSD1}$ zu Cortison beobachtet wurde⁹.

Das Protein besitzt eine konservierte C-terminale Region, die an der Oberfläche des Proteins eine unpolare Ebene bildet, welche von positiv geladenen Resten umgeben ist¹⁰. Diese

Region ist in der unpolaren ER Membran intakter Zellen lokalisiert. Es wird vermutet, dass die Interaktion der positiv geladenen AS-Reste mit Kopfgruppen der Membran den Zugang und die Direktion der hydrophoben Substrate zum aktiven Zentrum der 11 β HSD1 koordiniert.¹¹ Deshalb wurde das Enzym 11 β HSD1 für die Anwendung im Ganzzellsystem modifiziert und angepasst, welches unter anderem durch die Deletion der N-terminalen Transmembrandomäne und eine Substitution F278R nahe des C-terminus realisiert wurde. Diese Modifikationen wurden auf Grundlage einer Publikation von Lawson *et al.* gewählt, da der fehlende Membrananker und eine analoge Substitution in Position F278 in einer verbesserten Löslichkeit des Proteins und somit in einer erhöhten katalytischen Aktivität resultierte¹².

Durch Verwendung der modifizierten Sequenz wurde die heterologe Koexpression der Enzyme 11 β HSD1 und *LbADH* ermöglicht. Die anschließende Durchführung eines Ganzzellumsatzes zeigte die erfolgreiche Umsetzung von Hydrocortison zu Cortison mit einer Ausbeute von 0,9 g L⁻¹ innerhalb von 24 h Reaktionsdauer.

Überdies erzielte eine zusätzliche Verkürzung der C-terminalen Proteinsequenz um fünf Aminosäuren (Austausch von Tyrosin durch ein Stopcodon an Position 295) gemäß Zhang *et al.*, eine Steigerung der enzymatischen Aktivität im Ganzzellsystem um den Faktor von 2,8, was einer Cortisonproduktion von 2,5 \pm 0,09 g L⁻¹ entspricht (siehe Abb. 16 in AP5)².

Die vorgenommenen Modifikationen des Enzyms und die Festlegung der Reaktionsbedingungen ermöglichte die Nutzung des beschriebenen Systems für das Benchmarking zur Cortisonproduktion. Desweiteren wurde der beschriebene Prozess in Arbeitspaket 5 hinsichtlich der Cortisonproduktion im Ganzzellsystem optimiert und neu identifizierte Promotoren anhand dieses Systems wurden validiert.

Referenzen

1. Kiss, F. M. *et al.* Comparison of CYP106A1 and CYP106A2 from *Bacillus megaterium* – identification of a novel 11-oxidase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 8495–8514 (2015).
2. Zhang, D. *et al.* Engineering a hydroxysteroid dehydrogenase to improve its soluble expression for the asymmetric reduction of cortisone to 11 β -hydrocortisone. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 8879–8886 (2014).
3. Atanasov, A. G., Nashev, L. G., Schweizer, R. A. S., Frick, C. & Odermatt, A. Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase. *FEBS Lett.* **571**, 129–133 (2004).
4. Zhang, Y. ling *et al.* H6PDH interacts directly with 11 β -HSD1: Implications for determining the directionality of glucocorticoid catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **483**, 45–54 (2009).

5. Bujalska, I. J., Walker, E. a, Hewison, M. & Stewart, P. M. A switch in dehydrogenase to reductase activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 upon differentiation of human omental adipose stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 1205–1210 (2002).
6. Lavery, G. G. *et al.* Steroid biomarkers and genetic studies reveal inactivating mutations in hexose-6-phosphate dehydrogenase in patients with cortisone reductase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 3827–3832 (2008).
7. Leuchs, S. & Greiner, L. Alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*: A versatile robust catalyst for enantioselective transformations. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **25**, 267–281 (2011).
8. Shafqat, N. *et al.* Comparative enzymology of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from glucocorticoid resistant (guinea pig) versus sensitive (human) species. *J. Biol. Chem.* **278**, 2030–2035 (2003).
9. Pu, X. & Yang, K. Guinea pig 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: primary structure and catalytic properties. *Steroids* **65**, 148–156 (2000).
10. Ogg, D. *et al.* The crystal structure of guinea pig 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 provides a model for enzyme-lipid bilayer interactions. *J. Biol. Chem.* **280**, 3789–3794 (2005).
11. Hosfield, D. J. *et al.* Conformational flexibility in crystal structures of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I provide insights into glucocorticoid interconversion and enzyme regulation. *J. Biol. Chem.* **280**, 4639–4648 (2005).
12. Lawson, A. J. *et al.* Mutations of key hydrophobic surface residues of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 increase solubility and monodispersity in a bacterial expression system. *Protein Sci.* **18**, 1552–1563 (2009).

AP2.3

Ökoeffizienzanalyse der biotechnologischen Cortison Synthese

Die SHE-Bewertung (Sicherheit, Gesundheit, Umwelt) wurde im Rahmen eines Unterauftrages von Elmar Heinzle und Christian Weyler, (Technische Biochemie, Universität des Saarlandes) durchgeführt.

Folgende übergeordnete Ziele wurden eingangs definiert:

- Vergleich der Ökoeffizienz einer herkömmlichen chemisch/biologischen Synthese mit einem neuen biokatalytischen Verfahren mit *B. megaterium*
- Bedeutung verschiedener Charakteristiken des neuen Biokatalysators (Ausbeute, Umsatz, Selektivität, Endkonzentration) für die Ökoeffizienz eines zu definierenden Produktionsprozesses
- Vergleich des Einsatzes herkömmlicher Fermentationssubstrate (Kohlenhydrate) mit dem alternativen Substrat Glycerin

In der Ökoeffizienzanalyse zur ersten Projektphase wurden Endkonzentration und Ausbeute (Selektivität) der Umsetzung als dominierende Faktoren für eine erfolgreiche Durchführung der angestrebten Katalyse identifiziert. Die Erhöhung der zu diesem Zeitpunkt geringen Endkonzentration (14 mg/l) sowie eine Steigerung der Ausbeute (19 %) lagen daher entsprechend im Fokus der Arbeiten der hier untersuchten Projektphase. Diese Ziele wurden weitgehend erreicht.

- Durch Verwendung und Promotor-Optimierung des Enzyms 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase sowie durch eine Erhöhung der Substratkonzentration konnte die Endkonzentration an Cortison auf 14 120 mg/l erhöht werden.
- Die Ausbeute konnte auf 78 % gesteigert werden. Dies erleichtert eine Aufreinigung des Produktes und reduziert den Verbrauch des teuren Substrats Cortisol.
- Aus diesen Weiterentwicklungen ergab sich eine Verbesserung des Massenindex des Syntheseprozesses von 20000 kg/kg Produkt (Stand 01 2017) auf ca. 50 kg/kg Produkt. Der SHE Index von über 100000 (Stand 01 2017) verringerte sich sogar auf ca. 200 (Stand 02 2018).

2.3.1 Ökologische Bewertung – Methode

Bei frühen Bewertungen von Prozessen stehen insbesondere das umfassende Erkennen potentiell kritischer Aspekte und das Aufzeigen und die Bewertung von

Optimierungspotenzialen im Zentrum (Heinzle und Hungerbühler, 1997). Eine erste Betrachtung konzentriert sich auf den Einsatz kritischer Stoffe. In dieser frühen Phase der Entwicklung wird zur SHE-Bewertung die Methode von Heinzle et al. (2006) eingesetzt, die eine Bewertung auf der Basis von Stoffbilanzen und gut verfügbaren SHE-Merkmalen der eingesetzten und soweit bekannt auch der gebildeten Stoffe erlaubt. Für die Stoffe wurde zunächst eine ABC-Einstufung durchgeführt (Siehe Tabelle 1). Wie in Heinzle et al. (2006) und in früheren Arbeiten (Heinzle et al., 1998; Biber und Heinzle, 2004) ausführlich dargestellt, handelt es dabei um Risikopotentiale und nicht um die mit einem späteren Prozess tatsächlich verbundenen Risiken. Diese können ja einerseits durch technische Verbesserungen wie Änderung der Einsatzstoffe oder der Lösungsmittel, andererseits durch Änderung der Prozessführung oder durch den Einsatz von Schutzmaßnahmen eventuell wesentlich vermindert werden. Tabelle 1 enthält die ermittelten ABC-Klassifizierungen der eingesetzten Stoffe. Die Einstufung erfolgt durchgängig mit den Daten der reinen Stoffe. Durch Multiplikation der aus der ABC Klassifizierung errechneten Wichtungsfaktoren mit den Stoffströmen erhält man eine erste Quantifizierung der SHE-Risiken (Abbildung 1).

Ökologische Bewertungen zum Projekt wurden nach Möglichkeit auf der Basis von experimentellen Daten oder gut dokumentierten Literaturdaten durchgeführt. Dies betrifft insbesondere die biotechnologische Herstellung von Cortison. Die Parameter für das zum Vergleich ebenfalls diskutierte chemische Verfahren wurden der Patentschrift CN 103304615 B entnommen.

2.3.2 Ökologische Bewertung – Herstellung von Cortison

Die Bewertung wurde mit den in AP5 beschriebenen Daten durchgeführt, wobei auch ein chemischer Prozess zum Vergleich herangezogen wurde. Die daraus erstellten Stoffbilanzen erlauben einen Einblick in die damit verbundenen Risikopotentiale in den Bereichen Gesundheit, Sicherheit und Umweltschutz (SHE). Es wird ebenfalls die Entwicklung seit dem Zwischenbericht im Januar 2017 diskutiert. Zur Zeit des Zwischenberichts bestand noch ein erhebliches Potential zur Optimierung der Synthese hinsichtlich Produktqualität, Produktivität aber auch SHE-Aspekten. In den folgenden Arbeiten wurde das Syntheseverfahren, auch unter Einbeziehung der Erkenntnisse aus der ersten ökologischen Bewertung, konsequent weiterentwickelt. Wie man aus der folgenden Analyse sehen kann, sind die erreichten Endkonzentrationen an Cortison ein wesentlicher Faktor in der ökologischen Bewertung. Höhere Produktkonzentrationen vermindern den notwendigen Einsatz von Lösungsmitteln und anderen Hilfsstoffen beinahe proportional, sodass im Wesentlichen das Umweltgefährdungspotential vermindert werden kann. Im gegebenen Fall wurde im biotechnologischen Verfahren eine Produktendkonzentration von 14120 mg/L erreicht (Stand 01.2017: 14 mg/l), was ausgehend vom Substrat Cortisol einer Ausbeute von

78% entspricht (Stand 01.2017: 19 %). Als erstes wurde der Biokatalysator *B. megaterium* im Komplexmedium (M9CA) kultiviert. Die intakten Zellen wurden dann als Katalysator bei der Synthese von Cortison aus Cortisol eingesetzt. Diese Reaktion wird durch das Enzym 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase katalysiert.

Für eine in einem Gesamtverfahren vermutlich notwendige Isolierung und Aufreinigung des Produkts sind die erreichte Endkonzentration und die Selektivität, d.h. die Abwesenheit von Nebenprodukten, die diesem chemisch sehr ähnlich sind, von herausragender Bedeutung. In diesen beiden Aspekten konnten in der hier betrachteten Projektphase entscheidende Verbesserungen erzielt werden. Neben einer Steigerung der Produktendkonzentration um einen **Faktor 1000 (!)** werden im vorliegenden Verfahren auch **keine Nebenprodukte** mehr gebildet. Zum Stand vom Januar 2017 war das unerwünschte Nebenprodukt 15- β -Hydroxycortison mit einer Ausbeute von 81 % noch das dominante Reaktionsprodukt.

Ein chemisches Verfahren, das vom identischen Rohstoff Cortisol ausgeht, konnte nicht gefunden werden. Es wurde jedoch ein chemisches Verfahren gefunden, bei dem ausgehend vom kommerziell verfügbaren Substrat 17-(2-Iodoacetyl)-Cortison (Cas. No. 5758-63-4) in einem Schritt Cortison gebildet wird. In diesem Verfahren, welches hier vergleichend betrachtet werden soll, wurde eine Produktkonzentration von ca. 81 g/l erreicht, was einer Ausbeute von 91% entspricht. Hier wurde eine methanolische KOH Lösung zum in Wasser/Methanol (1:1) gelösten Substrat in Anwesenheit von Tetramethylammoniumhydroxid zugetropft. Das iodierter Substrat wurde nicht vollständig verbraucht. Es fällt auf, dass die Stoffbilanz nicht ganz aufgeht, d.h. dass noch undefinierte Nebenprodukte gebildet werden, die in der Bewertung aber summarisch berücksichtigt wurden.

Bei dem ursprünglichen biotechnologischen Prozess waren die Massen- und SHE-Indices sehr groß (Abb. 11 A, B). Es mussten extrem hohe Mengen (>20000 kg) an Materialien pro kg Produkt eingesetzt werden. Hieraus resultierte die gegenüber dem chemischen Verfahren viel höhere (schlechtere) SHE Bewertung. Zum Projektstand von 2017 lag er SHE Index des biotechnologischen Prozesses noch über 100000. Eine entscheidende Maßnahme zur Reduzierung dieser Indices war eine Erhöhung der Produktkonzentration. Wie in Abb. 1 E, F zu sehen, werden beim Verfahrensstand von 2018 <50 kg Material zur Gewinnung von 1 kg Cortison benötigt. Da die eingesetzten Materialien außerdem deutlich geringere Risikopotentiale aufweisen als die beim chemischen Verfahren verwendeten Komponenten (Tabelle 1), ergibt sich für das biotechnologische Verfahren eine tendenziell günstigere SHE Beurteilung (SHE Index ca. 200) als für den chemischen Prozess (SHE Index ca. 250) (Abb. 1 D, F).

Bei der chemischen Variante ist besonders das eingesetzte Methanol aufgrund seiner hohen Toxizität und wegen der leichten Entflammbarkeit kritisch zu beurteilen. Außerdem stellt das, bezüglich Risiko noch nicht charakterisierte, Substrat 17-(2-Iodoacetyl)-Cortison ein potentiell Risiko dar.

Diesem Umstand wurde durch die A-Kategorisierung bei akuter Toxizität, chronischer Toxizität und Ökotoxizität Rechnung getragen, wie in Tabelle 1 zu sehen ist. Weiterhin stellen die Giftigkeit des hier verwendeten Katalysators Tetramethylammonium Hydroxid sowie der Einsatz relativ hoher Mengen KOH relevante Sicherheits- und Gesundheitsrisiken dar.

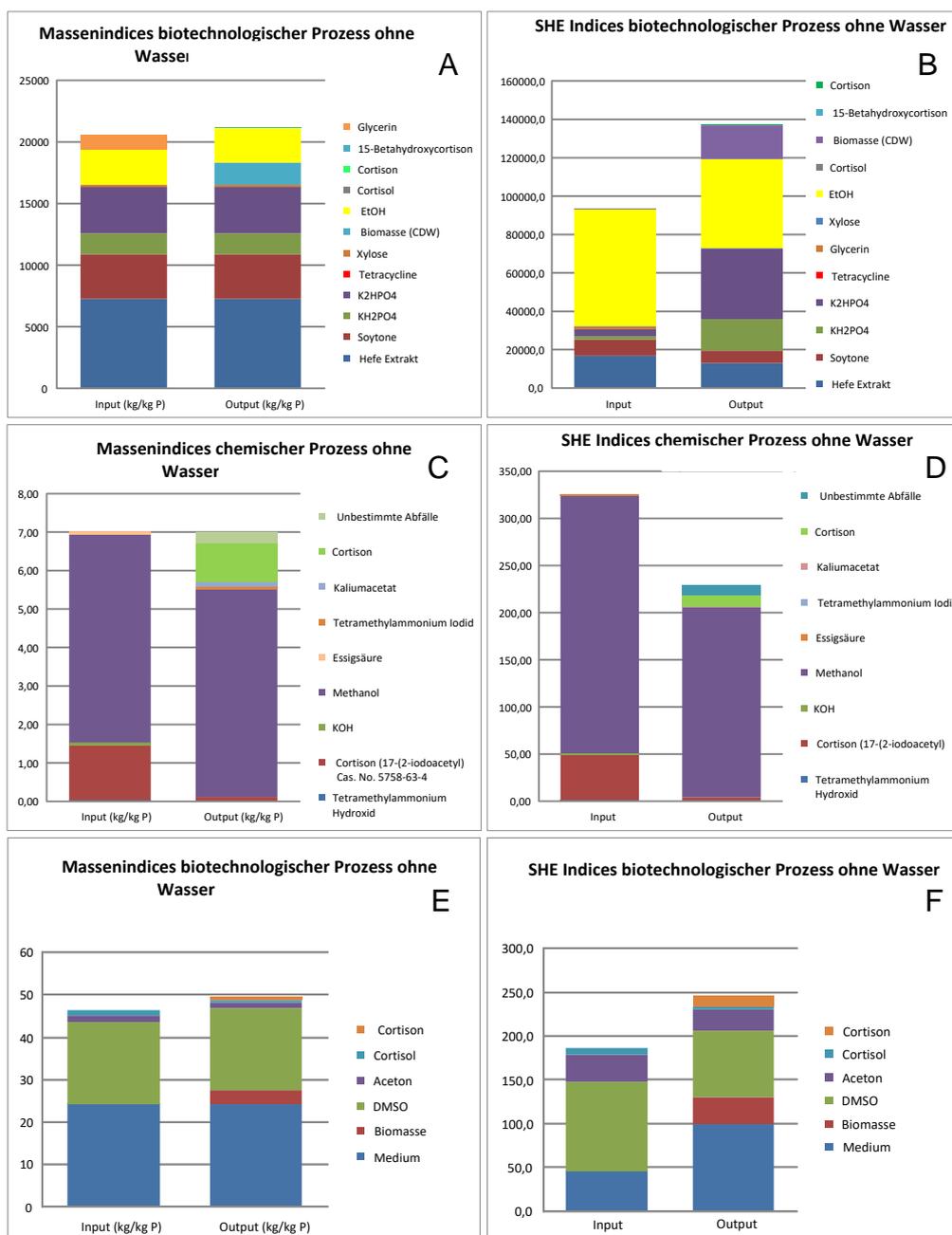


Abbildung 11: Produktion von Cortison. Massenindices (links A,C,E) und Umweltindices (rechts B,D,F) für die biotechnologischen (oben A,B und unten E,F) und das chemische (Mitte C,D) Syntheseverfahren. (Berechnungsmethode Heinzle et al., 2006).

2.3.3 Diskussion

Zusammenfassend können aus der Ökoeffizienzanalyse folgende Schlüsse gezogen werden: Während im chemischen Verfahren die höhere Produktkonzentration erreicht wird, kommt das biotechnologische Verfahren ohne hochgradig toxische oder brennbare Materialien aus. Außerdem sind alle in diesem Verfahren verwendeten Komponenten gut charakterisiert, was bei dem im chemischen Verfahren als Substrat eingesetzten 17-(2-Iodoacetyl)-Cortison nicht der Fall ist. Nachhaltigkeit ist bei der Entwicklung neuer Produktionsverfahren heute ein wichtiger Aspekt, dessen Bedeutung zukünftig noch zunehmen wird. Deswegen und auf Grund der erreichten hohen Produktkonzentration von > 14 g/l stellt das in diesem Bericht vorgestellte biotechnologische Verfahren eine potentielle Alternative zur chemischen Cortison Synthese dar.

Ökonomisch sind relativ enge Grenzen durch die nicht allzu großen Preisunterschiede von Edukt und Produkt gesteckt. Die abgeschätzten Großmarktpreise liegen bei 1450 bzw. 7000 €/kg.

Hier ergibt sich die Möglichkeit, das im Projekt untersuchte Enzym 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase direkt in einem Hefestamm zu exprimieren, der Cortisol aus billigen Kohlenhydraten produziert (Duport et al., 1998). Damit könnte Cortison idealerweise direkt aus Kohlenhydraten hergestellt werden. Dieser Ansatz könnte in einem neuen Projekt untersucht werden.

Tabelle 1.: ABC Einstufung der Komponenten aus dem biotechnologischen (A.) und dem chemischen (B.) Verfahren gemäß Heinzle et al. (2006). LVb = Landverbrauch, Vfg = Verfügbarkeit, KSy = Komplexität der Synthese, ThR = thermische Risiken, ATox = akute Toxizität, CTox = chronische Toxizität, BiR = biologisches Risiko, OTox = ökologische Toxizität, GWP = Potenzial für globale Erwärmung, ODP = Ozonabbaupotenzial, POCP = Ozonbildungspotenzial, AP = Versauerungspotenzial, Odr = Geruch, Eutr = Eutrophierung.

A. Biotechnologisches Verfahren																	
Name	LVb	Vfg	KSy	ThR	ATox	CTox	BiR	OTox	GWP	ODP	AP	POCP	Odr	Eutr	A#	B#	C#
Na ₂ HPO ₄	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	1	0	13
KH ₂ PO ₄	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	1	0	13
NaCl	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	0	14
NH ₄ Cl	C	C	C	C	A	A	C	B	C	C	C	C	C	A	3	1	10
Casaminoacids	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	0	2	12
CaCl ₂	C	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C	0	2	12
MgSO ₄	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	1	13
EDTA	C	C	C	C	B	C	C	C	C	C	C	C	C	B	0	2	12
Glycerin	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	0	1	13
Tetracycline	B	C	C	C	B	C	C	A	C	C	C	C	C	C	1	2	11
Wasser	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	0	14
Biomasse	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	1	1	12
DMSO	B	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	B	0	4	10
Aceton	B	C	C	A	B	B	C	C	C	C	C	B	B	B	1	6	7
Cortisol	B	C	B	C	B	B	C	A	C	C	C	C	C	B	1	5	8
Cortison	C	C	B	C	C	B	C	A	C	C	C	C	C	B	1	2	10
B. Chemisches Verfahren																	
Name	LVb	Vfg	KSy	ThR	ATox	CTox	BiR	OTox	GWP	ODP	AP	POCP	Odr	Eutr	A#	B#	C#
Tetramethylammonium Hydroxid	C	C	B	C	A	A	C	C	C	C	C	C	C	B	2	2	10
Cortison (17-(2-iodoacetyl) Cas. No. 5758-63-4 *	B	C	B	C	A	A	C	A	C	C	C	C	C	B	3	3	8
KOH	C	C	C	C	A	B	C	C	C	C	C	C	C	C	1	0	12
Methanol	B	C	C	A	A	A	C	C	C	C	C	B	B	B	3	4	7
Wasser	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	0	14
Essigsäure	B	C	C	B	A	C	C	A	C	C	C	C	A	B	3	3	8
Tetramethylammonium Iodid	C	C	B	C	C	C	C	A	C	C	C	C	C	B	1	2	11
Kaliumacetat	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	0	1	13
Cortison	C	C	B	C	C	B	C	A	C	C	C	C	C	B	1	2	10
Unbestimmte Abfälle*	C	C	C	B	A	A	C	A	C	C	C	C	C	C	3	1	10

* Klassifizierung abgeschätzt da keine detaillierten Sicherheitsdaten verfügbar.

2.3.4 Referenzen

Biwler A, Heinzle E (2004) Environmental Assessment in Early Process Development. *J Chem Technol Biotechnol*, 79:597–609

Duport, C., Spagnoli, R., Degryse, E., and Pompon, D. (1998) Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast, *Nature Biotechnology* 16, 186-189.

Heinzle E, Biwler A, Eissen M, Abdul Kholiq M (2006) Bewertung biotechnologischer Prozesse in frühen Phasen der Entwicklung hinsichtlich Risiken bezüglich Ökologie, Sicherheit und Gesundheit. *Chemie Ing. Tech.*, 78:301-305.

Heinzle E, Hungerbühler, K (1997) Integrated process development: The key to future production of chemicals. *Chimia* 51:176-183.

Heinzle, E., Weirich, D., Brogli, F., Hoffmann, V., Koller, G., Verduyn, M.A., Hungerbühler, K. (1998) Ecological and Economic Objective Functions for Screening in Integrated Development of Fine Chemical Processes. I. Flexible and Expandable Framework Using Indices. *Ind. Eng. Chem. Res.* 37, 3395-3407.

McIntosh JA, Farwell CC, Arnold FH. (2014). Expanding p450 catalytic reaction space through evolution and engineering. *Curr. Opin Chem. Biol.* 19:126-134.

Nguyen KT, Virus C, Günnewich N, Hannemann F, Bernhardt R. (2012) Changing the regioselectivity of a P450 from C15 to C11 hydroxylation of progesterone. *Chembiochem* 13:1161-6.

Patent: Baoding Jiufu Biochemical Co., LTD. (2015) Preparation method of cortisone. Ref: CN 103304615 B

AP 3

Klonierung der Promotoren

Um auf Promotoraktivitäten Rückschlüsse zu ziehen und geeignete Kandidaten zu identifizieren wurden Änderungen der Transkriptionslevel (fold change) auf Basis der normalisierten Daten aus den genomweiten Expressionsanalysen des *Bacillus megaterium* Stammes MS941 berechnet. Als Referenz dienten die Transkriptionslevel zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme (frühe exponentielle Wachstumsphase: T1) des entsprechenden Fermenter Laufes. Insgesamt wurden 3 unabhängige Fermenter Läufe bei identischen Kultivierungsbedingungen durchgeführt, so dass die nachfolgenden Expressionsanalysen durch den Projektpartner OL als Triplikate erfolgen konnten.

Bei einer ersten Auswertung der genomweiten Expressionsanalysen wurde für jedes untersuchte Gen (*open reading frame*: ORF) sowohl der entsprechende Mittelwert als auch die zugehörige Standardabweichung der Expressionsänderung (fold change) berechnet. Wie in Tabelle 3.1 dargestellt ist, konnte in der mittleren exponentiellen Phase (T2) des bakteriellen Wachstums lediglich für einen geringen Teil der analysierten ORFs eine entsprechende Änderung der Transkriptionslevel beobachtet werden. Nur 1,76 % aller Transkriptionslevel waren signifikant herunterreguliert während 2,76 % aller Transkriptionslevel hochreguliert waren.

Tabelle 3.1: Differentielle Genexpressionsanalyse zu unterschiedlichen Phasen des bakteriellen Wachstums; FC = fold change.

	Differentiell exprimierte Gene [%]		
	mid-exponentiell	spät exponentiell	früh stationär
FC = 0	95,48	79,35	44,65
FC < 0	1,76	10,08	30,07
FC > 0	2,76	10,57	25,28

In der späten exponentiellen Phase des Bakterienwachstums (T3) hingegen, zeigten bereits 10,08 % bzw. 10,57 % aller untersuchten Gene eine signifikante Abnahme bzw. Erhöhung der zugehörigen Transkriptionslevel. Die meisten Gene waren jedoch zu Beginn der stationären Phase des bakteriellen Wachstums (T4) differentiell exprimiert. Ganze 30,07 % wiesen eine signifikante Abnahme und 25,28 % eine signifikante Zunahme der Transkriptionslevel auf.

In einem zweiten Schritt wurde eine Reduktion der Datenmenge vorgenommen, um eine erste Interpretation der Expressionsanalysen zu ermöglichen. Bei dieser Datenreduktion wurden solche Gene aussortiert, deren differentielle Expression (fold change) unterhalb des Faktors 4 lag. Ebenfalls aussortiert wurden Gene, deren differentielle Expression eine zu

hohe Standardabweichung aufwies. Durch diese Maßnahmen konnte die Anzahl an Genen mit signifikanten Änderungen der Transkriptionslevel auf 350 Gene eingegrenzt werden. Ein Auszug der analysierten Daten ist in nachfolgender Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Auszug aus den Daten der Transkriptionsanalyse (fold change) im *Bacillus megaterium* Stamm MS941. MV= mean value; SD= standard deviation

Fold change T2 vs T1			Fold change T3 vs T1			Fold change T4 vs T1		
Gene ID	MV	SD	Gene ID	MV	SD	Gene ID	MV	SD
BMD_0886	38,4838456	9,95327842	BMD_0886	26,1226477	4,42793344	BMD_2948	306,382225	52,9460537
BMD_0887	36,3916844	7,48448999	BMD_0887	25,580751	3,40975168	BMD_1081	130,537171	27,9266756
BMD_0884	36,0958356	5,86630039	BMD_0884	24,478431	3,84407422	BMD_0462	126,964397	22,8654623
BMD_0888	35,120193	9,57534387	BMD_0888	24,2410794	4,33113554	BMD_3981	112,920823	31,7601892
BMD_0885	26,8507166	1,50277346	BMD_0450	18,3847637	5,09414705	BMD_0464	110,285346	24,1936813
BMD_0450	23,66442	3,89786063	BMD_0885	17,8269095	1,24582215	BMD_0465	100,280797	28,786987
BMD_0554	19,3864701	0,81129952	BMD_0554	17,296213	1,24141834	BMD_0461	99,3378572	8,48626812
BMD_0552	18,5054342	0,75711171	BMD_0552	17,1878016	1,57509334	BMD_2274	91,6565547	14,0012952
BMD_0551	18,4733581	1,0111573	BMD_0555	16,4758803	1,66930264	BMD_1479	75,4903238	20,2880763
BMD_2525	17,8665515	5,16861204	BMD_0553	16,2048655	2,5322605	BMD_2510	71,6355787	18,8113147
BMD_0555	17,8622106	1,83851953	BMD_0556	14,5734243	0,47883851	BMD_1496	68,9387276	14,1343955
BMD_0713	16,9447324	4,72048737	BMD_0551	13,7744044	1,01724105	BMD_3758	58,9175099	15,3889837
BMD_0556	16,1581897	0,67259144	BMD_2097	11,0616086	0,90077377	BMD_2299	54,4548989	12,134232
BMD_0553	16,1522252	0,17757058	BMD_2025	7,47113921	0,53549822	BMD_3868	52,7378919	6,92957541
BMD_2097	13,5276718	1,49497564	BMD_2116	7,38894499	0,82529555	BMD_1478	50,2409638	14,9543805
BMD_0889	9,2742316	2,2445212	BMD_3472	7,09056437	1,20654555	BMD_3870	43,2944811	3,04311359
BMD_4242	8,50017591	2,1639671	BMD_2115	6,86647176	0,32095536	BMD_3858	42,1504592	10,3576718
BMD_2115	6,03339297	0,10829512	BMD_4863	6,51526727	0,50481044	BMD_3096	37,2763363	9,45673104
BMD_2116	5,73725979	0,38829094	BMD_1694	6,25464726	1,66533061	BMD_3393	34,8595772	3,23090376
BMD_4244	4,98627316	0,76076132	BMD_1788	6,16299458	1,58255351	BMD_1293	33,9591037	10,0461431
BMD_4471	4,39822427	0,49632803	BMD_3009	5,51218686	0,93444581	BMD_1170	33,782545	3,06667127
BMD_4470	4,11973994	0,55317282	BMD_2019	5,43775985	0,82042053	BMD_2026	33,4742105	6,69646182

Interessant in diesem Zusammenhang war die Beobachtung, dass sich nicht nur die Anzahl an differentiell exprimierten Genen mit zunehmender Fermentationsdauer (T2-T4) erhöhte, sondern dass sich auch die maximalen Unterschiede zwischen den Transkriptionslevels erhöhten. So konnte beispielsweise in der mittleren exponentiellen Phase (T2) des Bakterienwachstums eine maximale Änderungen der Transkriptionslevel um den Faktor 38 beobachtet werden, wohingegen sich die maximale Änderung der Transkriptionslevel in der frühen stationären Phase (T4) des Bakterienwachstums auf den Faktor 306 erhöhte. Die Gene in der frühen stationären Phase des Bakterienwachstums und deren putative Promotoren waren somit vielversprechendere Kandidaten für das angestrebte Promotorenscreening, da die Änderung der Genexpression hier deutlich höher ausfiel.

Allerdings wurden neben der alleinigen quantitativen Beurteilung der differentiellen Genexpression noch weitere Faktoren in Betracht gezogen, welche die Auswahl der zu identifizierenden und zu testenden Promotoren weiter eingrenzen sollten. So zum Beispiel, ob unter den 350 Genen mit signifikanten Änderungen der Transkriptionslevel auch solche

zu finden waren, die eventuell als Operon organisiert, ähnlich hohe Änderungen der Transkriptionslevel (fold changes) aufwiesen. Zudem sollte auch die Dauer der Transkriptionsänderung in Betracht gezogen werden, so dass eine kontinuierliche Proteinexpression mit hohen Proteinausbeuten gewährleistet wurde. Insbesondere während der mittleren exponentiellen Phase (T2) und späten exponentiellen Phase (T3) des Bakterienwachstums trafen die zuletzt genannten Faktoren auf die Änderung der Transkriptionslevel dreier interessanter und vielversprechende Operons zu. Es handelte sich hierbei beispielsweise um ein putatives Operon der Thiamin Biosynthese (BMD_0551-BMD_0556 in orange) und um ein Operon (BMD_0884-BMD_0888 in grün), welches sich allerdings ohne weitere Analysen nicht eindeutig einem bestimmten Biosyntheseweg zuordnen lies. Beide Operons zeichneten sich durch einen frühen Anstieg der Expressionslevel zum Zeitpunkt T2 aus, der bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase (T3) lediglich minimal absank. Andererseits zeigte auch das putative Operon für die Aufnahme von Glycerol (BMD_0461-BMD_0465) ähnliche hohe Änderungen der Trankriptionslevel (fold changes).

Sicherlich auch von Bedeutung sind die Energieressourcen, welche die Bakterienzellen in der entsprechenden Wachstumsphase für die Proteinbiosynthese nutzen können. Vermutlich sind diese gegen Ende der bakteriellen Wachstumsphase nahezu aufgebraucht, so dass die Ausbeuten einer heterologen Proteinexpression unter Umständen geringer ausfallen, obwohl dort die höchsten Änderungen der Transkriptionslevel, beispielsweise bei den ORFs BMD_1081 sowie BMD_2948, auftraten.

Auffällig bei der Analyse aller ORFs mit hohem fold change war, dass die zugehörigen Signalintensitäten im Vergleich zu den höchsten Signalintensitäten des Microarrays verhältnismäßig gering ausfielen. Aus diesem Grund wurden auch solche ORFs in die nachfolgenden Promotoranalysen mit einbezogen, die zwar entsprechend hohe Signalintensität aufwiesen, deren fold change allerdings teilweise deutlich unterhalb des anfangs festgelegten Grenzwertes (fold change < 4) lag. Tabelle 3.3 zeigt exemplarisch einige ORFs mit besonders hohen Signalintensitäten. Die zugehörigen ORFs scheinen an einer Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse, wie beispielsweise dem Zitratzyklus (BMD_4756, BMD_3115), dem Solute-Transport (BMD_0706, BMD_3537), der Stresstoleranz (BMD_4632) bis hin zur Proteinbiosynthese (BMD_0123) beteiligt zu sein. Besonderes Augenmerk bei der Auswahl vielversprechender ORFs samt putativer Promotoren wurde auf die unterschiedlichen Phasen des bakteriellen Wachstums gelegt.

Tabelle 3.3: Auszug aus den Daten der Transkriptionsanalyse (Signalintensitäten) im *Bacillus megaterium* Stamm MS941. MV = mean value; SD = standard deviation

Signal Intensität T1			Signal Intensität T2			Signal Intensität T3			Signal Intensität T4		
Gene ID	MV	SD									
BMD_0706	154964,967	6999,82487	BMD_0706	142956,033	7886,74354	BMD_4632	164092,367	2336,2759	BMD_4632	137310,577	60926,0081
BMD_4756	133575,4	13164,0533	BMD_3115	135882,133	6426,95407	BMD_1196	143448,167	26195,1284	BMD_3090	124479,12	64320,733
BMD_3115	125223,967	10160,5891	BMD_4738	118065,4	5367,06619	BMD_3115	131019	25723,0913	BMD_3842	88771,1433	40501,1604
BMD_1215	124595,833	16021,1854	BMD_4756	116625,067	9013,22303	BMD_3537	125695,333	13381,7884	BMD_4542	72455,0133	48954,2154
BMD_4684	114335,293	40697,8163	BMD_1215	114097,467	8454,18272	BMD_1215	119610,493	23868,2795	BMD_5113	60216,7867	35648,2282
BMD_4738	105693,76	17733,2276	BMD_2772	113551,467	4157,05081	BMD_0706	110475,933	2500,25317	BMD_3841	58545,8533	23360,482
BMD_2772	98540	27000,7933	BMD_4678	101413,673	4716,09333	BMD_4678	108507,877	18453,1445	BMD_3013	46455,2	31238,1293
BMD_0150	93737,8267	12978,1553	BMD_1196	100344,37	23195,4571	BMD_4684	104949,803	19534,147	BMD_1083	46212,19	35320,9753
BMD_4678	89622,9467	6949,97551	BMD_0150	99281,05	2148,02699	BMD_4738	101212,647	9557,91381	BMD_3813	42987,8267	18833,7468
BMD_4632	85473,8333	6861,59961	BMD_4684	95511,77	10196,5472	BMD_2386	95602,52	23835,4841	BMD_0587	42370,3533	21460,4906
BMD_2546	83849,4767	12220,7649	BMD_0123	91381,5667	2606,46767	BMD_1197	92481,4267	21252,3049	BMD_4756	41495,4133	25949,7552
BMD_0145	81095,2217	10995,7144	BMD_3537	89099,4533	21555,7873	BMD_4502	82238,9267	4153,52132	BMD_5086	39123,9567	24063,0995
BMD_1214	78192	6938,33702	BMD_0145	86710,3867	1201,65146	BMD_4756	77083,8133	7469,62035	BMD_3840	38714,73	20728,9967
BMD_0149	76359,7433	11122,9552	BMD_0134	85297,2517	3870,1287	BMD_2618	75226,8	754,627401	BMD_3489	36747,6733	30285,1184
BMD_0129	75107,355	14745,4648	BMD_0129	81611,02	4899,29833	BMD_1214	74638,6767	7385,29148	BMD_4544	36369,7843	26439,6939
BMD_0134	72929,665	10886,8263	BMD_0149	81246,4867	3196,0696	BMD_4917	64665,1967	26881,9204	BMD_3145	35879,2467	14959,3663
BMD_0144	70748,2517	8757,40011	BMD_0153	76487,5	2917,39517	BMD_3892	61815,8767	10687,3274	BMD_5114	34517,6633	17761,4795
BMD_0123	70643,3417	10239,967	BMD_0144	76284,3683	4806,60542	BMD_0150	58601,3783	6018,75984	BMD_3488	31408,3917	26601,7213
BMD_4502	68395,7167	11644,6257	BMD_1214	75194,9233	736,834326	BMD_3116	55009,1633	15429,0945	BMD_3537	30418,7067	13980,5029
BMD_0153	67184,5683	13006,9363	BMD_2386	73397,5467	16158,2171	BMD_3215	54491,1067	10613,2981	BMD_5066	30307,92	18035,9235
BMD_2926	66168,0233	10711,9383	BMD_4632	72693,5933	8695,92561	BMD_2059	54349,8233	11247,4058	BMD_4543	29355,789	22652,6899
BMD_0137	62731,745	9823,99863	BMD_0137	72280,0833	945,471531	BMD_0145	52921,63	4462,27985	BMD_4015	28952,4767	24585,6646
BMD_0135	62135,9967	8069,02844	BMD_0135	71286,9317	2118,73114	BMD_2546	52219,0133	6594,19996	BMD_0368	28349,6033	14614,878
BMD_4685	59752	33679,8643	BMD_4502	69008,0467	9636,28903	BMD_5052	52037,7133	24379,4802	BMD_3096	27910,1633	13178,4791
BMD_0151	58304,1867	11544,6475	BMD_0151	65648,4817	1701,04984	BMD_1515	51737,88	12688,5031	BMD_3814	26381,3833	13531
BMD_4296	55735,7233	8692,74768	BMD_0450	63556,2333	16206,01	BMD_5139	51350,91	4145,48393	BMD_0069	25782,4617	13985,7294
BMD_0159	54328,8483	8580,0148	BMD_0159	62775,8467	1295,875	BMD_3493	50619,78	9659,68386	BMD_4022	24640,8117	16272,1578
BMD_3116	54159,4967	11716,9129	BMD_3116	61848,9867	5386,29666	BMD_0134	50209,6367	2299,70814	BMD_3215	23933,8667	16385,1094

Die Gene der ORFs BMD_0123, BMD_0706 und BMD_4756 zeigten die höchsten Signalintensitäten in der frühen exponentiellen Wachstumsphase, während bspw. das Gen des ORFs BMD_0450 insbesondere in der mittleren Phase des bakteriellen Wachstums stark transkribiert wurde. Im Gegensatz dazu sind die höchsten Signalintensitäten der ORFs BMD_2386, BMD_2618, BMD_3537 und BMD_4632 in der späten exponentiellen Wachstumsphase zu beobachten. Interessant sind mit Sicherheit auch die ORFs BMD_1214 und BMD_3115, deren Signalintensitäten konstant hoch blieben und diese vermutlich der Klasse der konstitutiv exprimierten Gene zugeordnet werden können.

Proben für die gezielte Analyse von antisense und intergenomischen Transkripten wurden an OL gesendet und die entsprechenden Microarray Daten ausgewertet. Die untersuchten Transkriptionslevel wiesen allerdings durchgehend sehr niedrige Signalintensitäten auf, so dass nicht davon auszugehen war, effiziente Promotoren für die heterologe Proteinexpression in *B. megaterium* zu identifizieren. Folglich wurden die putativen antisense und intergenomischen Promotoren nicht für das β -Galaktosidase Screening berücksichtigt.

Für eine Klonierung der putativen Promotoren wurden die entsprechenden Promotorsequenzen mit dem Programm BPROM (Softberry) [V. Solovyev, A. Salamov, 2011] identifiziert und deren charakteristische Elemente, wie etwa -35 Box und -10 Box sowie

Bindestellen bekannter Transkriptionsfaktoren, ermittelt. Auf Grundlage dieser Daten konnten die oben erwähnten Promotoren näher eingegrenzt und erfolgreich in einen pSMF2.1 basierten Vektor mit β -Galactosidase (*lacZ*) als Reportergen inseriert werden. Im Verlauf dieser Klonierung wurde der optimierte Xylose induzierbare Promotor [Stammen et al, 2010] im Referenzvektor (pXyl*.lacZ) durch die zu validierenden Promotorsequenzen ersetzt (siehe Abb. 12).

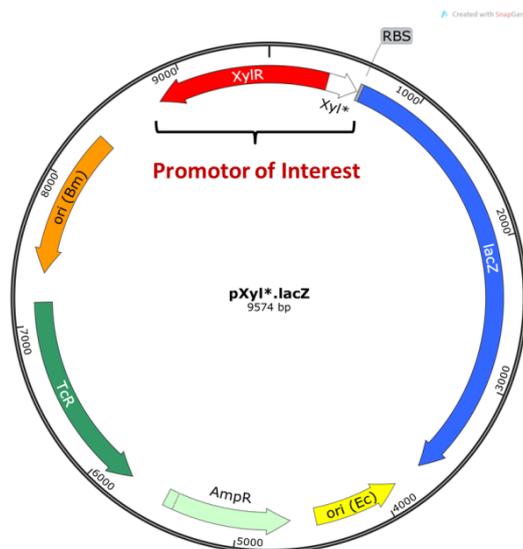


Abbildung 12: Vektorkarte des Referenzvektors pXyl*.lacZ. Xylose Repressor (XylR), optimierter Xylose induzierbarer Promotor (Xyl*); Ribosomale Bindestelle (RBS); β -Galactosidase (*lacZ*); Replikationsursprung für *E. coli* (*ori Ec*); β -Lactamase (*AmpR*); Tetrazyklin Efflux Protein (*TcR*) und Replikationsursprung für *B. megaterium* (*ori Bm*).

Korrelation von Transkriptom und Metabolom

Um eine gezieltere Auswahl an Promotor-Kandidaten zu ermöglichen und vorläufig identifizierte Targets weiter zu verifizieren, wurden die Transkriptom- und Metabolomdaten korreliert. Im ersten Schritt wurden dazu beide Datensätze komplett verwendet. Die MD zur Verfügung stehende Serverleistung reichte jedoch zur Verarbeitung zweier so großer Datensätze nicht aus. Daher wurden in einem zweiten Ansatz nur Gene verwendet, deren eindeutige Bezeichnung später eine Zuordnung zum jeweiligen Metabolit zulässt. Die Ergebnisse lieferten jedoch keine zusätzlichen, interessanten Einblicke, daher wurde die Integration von Transkriptom- und Metabolom-Daten nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten im AP3 durch die genomweiten Expressionsanalysen im *B. megaterium* Stamm zahlreiche Gene identifiziert werden, die in den verschiedenen Phasen

des Bakterienwachstums signifikant differentiell exprimiert wurden bzw. hohe Signalintensitäten aufwiesen. Aus jeder Phase des bakteriellen Wachstums wurden in AP4 (siehe unten) interessante Promotorkandidaten mittels geeignetem Promotor-Screening auf ihre Eignung für die heterologe Proteinexpression in *B. megaterium* analysiert und validiert.

AP 4

Validierung der Promotoren, Induktor-Identifizierung

Bei initialen Versuchen des Promotor-Screenings wurde festgestellt, dass sich eGFP aufgrund niedriger Expressionsraten nicht als Reporter gen eignet. Daraufhin wurde bei sämtlichen bereits klonierten Konstrukten eGFP durch das Reporter gen β -Galaktosidase (LacZ) ersetzt, was maßgeblich zu Verzögerungen beim Promotor-Screening geführt hat. Weiterhin musste das endogene lacZ Gen (BMD_2126) in *B. megaterium* deletiert werden, um störende Hintergrundaktivität beim β -Galaktosidase basierten Promotor-Screening zu vermeiden. Ein entsprechender Knockout-Stamm (GHH9) konnte erfolgreich nach einer Methode von Gerber et al. generiert und entsprechend als β -Galaktosidase defizient charakterisiert werden (siehe Abb. 13) [Gerber et al., 2014].

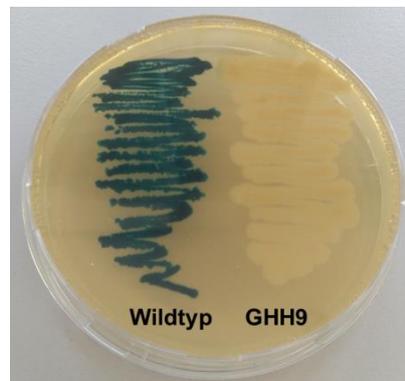


Abbildung 13: Phänotypische Charakterisierung des β -Galaktosidase Knockouts in *B. megaterium*. Wildtypischer und lacZ defizienter Stamm (GHH9) wurden für 18 h auf einer LB-Agarplatte mit (X-Gal) [200 μ g/ml] inkubiert. Der lacZ defiziente Stamm ist nicht mehr in der Lage X-Gal zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo umzusetzen.

Für das anschließende Promotor-Screening wurden Zellen des β -Galaktosidase defizienten *B. megaterium* Stammes (GHH9) mit den entsprechenden Vektoren transformiert und unter geeigneten Bedingungen kultiviert. Eine Induktion des auf den Vektoren kodierten β -Galaktosidase Reporter gens war bei den Promotoren, die aus den Transkriptionsanalysen stammen, nicht notwendig, da hier eine Wachstumsphasen-abhängige Autoinduktion erfolgte. Nach der Kultivierung wurden die Zellen geerntet und auf die optische Dichte normiert. Anschließend wurde ein eigens für *B. megaterium* modifizierter β -Galaktosidase Assay durchgeführt. Dieser beinhaltet unter anderem die Lyse der Zellen durch Behandlung mit heterolog exprimierter und gereinigter Muramidase [Stenger et al. 2017]. Die β -Galaktosidase Aktivität in den Zelllysaten wurde kolorimetrisch nach dem Umsatz von o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) zu o-Nitrophenol bestimmt. Hier ergaben sich die

in **Tabelle 4.1** aufgelisteten β -Galaktosidase Aktivitäten und korrelierenden Promotor Stärken.

Tabelle 4.1: Übersicht über die charakterisierten Promotoren

Promotor	Aktivität	Klasse	β -Galaktosidase Expression [mU]		Spezifität
			TB-Medium	M9CA-Medium	
p2948	sehr schwach	früh stationär	36 \pm 2	37 \pm 3	keine
p0462	sehr schwach	früh stationär	57 \pm 2	62 \pm 3	keine
p0551	sehr schwach	mid-exponentiell	73 \pm 1	60 \pm 2	keine
p2618	schwach	spät exponentiell	768 \pm 2	590 \pm 4	keine
p0123	schwach	früh exponentiell	774 \pm 1	597 \pm 5	keine
p1081	schwach	früh stationär	778 \pm 5	196 \pm 2	TB
p0450	schwach	mid-exponentiell	783 \pm 7	600 \pm 4	keine
p2097	schwach	mid-exponentiell	872 \pm 3	215 \pm 2	TB
p3115	mittel	konstitutiv	1073 \pm 14	710 \pm 5	keine
p1214	mittel	konstitutiv	1790 \pm 2	1008 \pm 10	TB
p4632	mittel	spät exponentiell	1863 \pm 38	265 \pm 1	TB
p4756	stark	früh exponentiell	3892 \pm 80	355 \pm 55	TB
p0706	stark	früh exponentiell	4248 \pm 432	4747 \pm 141	keine
p2386	sehr stark	spät exponentiell	1213 \pm 24	5621 \pm 40	M9CA
p3537	sehr stark	spät exponentiell	6300 \pm 488	4018 \pm 94	TB
pXyl*	stark	Referenz	5190 \pm 227	4662 \pm 379	keine

Die Promotoren, die bei den Transkriptionsanalysen die höchsten Änderungen der Transkriptionslevel (fold changes) aufwiesen, zeigten im β -Galaktosidase Assay sehr schwache bis schwache Promotor Aktivitäten. Insbesondere die basalen LacZ Expressionslevel bei den Promotoren p0462, p0551 und p2948 waren geradezu vernachlässigbar. Schwache Promotor Aktivitäten zwischen 778 mU und 872 mU konnten für die Promotoren p1081 und p2097 beobachtet werden. Wie bereits in AP3 beschrieben, waren die Signalintensitäten im Microarray trotz hoher fold changes relativ gering. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde bei der Analyse weiterer Promotoren auf eine allzu starke Gewichtung des fold changes verzichtet und eher die Signalintensitäten als Kriterium für die Evaluation der Promotoren herangezogen.

Im Unterschied zu den fold change Promotoren war die β -Galaktosidase Expression der Promotoren mit höheren Signalintensitäten wesentlich effizienter. Obwohl es auch hier einige Kandidaten mit schwachen Promotor Aktivitäten gab (p0123, p0450 und p2618), konnten mittelstarke Promotoren identifiziert werden (p3115, p1214 und p4632), deren

LacZ Expressionslevel zwischen 1073 mU und 1863 mU lag. Für den Promotor des putativen Stressproteins (BMD_4632) konnte experimentell gezeigt werden, dass sich eine Erhöhung der Expressionstemperatur auf 42°C positiv auf dessen Aktivität auswirkt. Während die Aktivität des Referenzpromotors pXyl* bei erhöhter Temperatur um nahezu 62 % einbrach, konnte die Aktivität von p4632 hingegen von initial 1863 mU auf 4876 mU β -Galaktosidase gesteigert werden. Bei p4632 handelt es sich folglich um den ersten temperatursensitiven Promotor aus *B. megaterium*

Starke Promotor Aktivitäten mit LacZ Expressionsleveln zwischen 3892 mU und 4747 mU wurden für die Promotoren p4756 und p0706 beobachtet. Die stärksten Vertreter unter den neu identifizierten Promotoren waren allerdings p2386 und p3537. Beide übertrafen zuverlässig die β -Galaktosidase Expressionslevel des bis dato stärksten beschriebenen Promotors -die des optimierten Xylose Promotors (pXyl*)- um 8,3 % und 21,4 %. Interessanterweise konnte die Aktivität des Promotors des putativen Eisentransporters (BMD_3537) durch Supplementation der vierfachen Menge an Eisen im TB-Medium nochmals signifikant auf ca. 7560 mU exprimierter β -Galaktosidase gesteigert werden. Im Vergleich zum optimierten Xylose induzierbaren Promotor (pXyl*) ergab sich somit eine maximale Erhöhung der Promotor Stärke um 45 %.

Unabhängig von den Transkriptomanalysen zur Identifizierung der Wachstumsphasen abhängigen Promotoren wurden auch induzierbare Promotoren ähnlich des Xylose induzierbaren Systems gesucht. Auf Grundlage der charakteristischen Architektur des gut charakterisierten Xylose Promotorsystems, bestehend aus Promotorsequenz samt invers lokalisiertem Repressorgen, konnten weitere Zucker induzierbare Promotorsysteme identifiziert werden. Mittels β -Galaktosidase-Assays konnten die zugehörigen Induktoren und entsprechenden Promotor Stärken identifiziert werden. Die optimale Konzentration aller Induktoren lag bei 5 mg/ml, für Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) bei 1 mM. Eine proportionale Steigerung der β -Galaktosidase Expressionsraten durch weitere Erhöhung der Induktor Konzentration konnte nicht beobachtet werden. Die ermittelten Promotor Stärken wurden in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Übersicht über die induzierbaren Promotor Systeme

Promotor	Stärke	Klasse	β-Galaktosidase Expression [mU]		Inducer
			ohne Inducer	mit Inducer	
pSuc	sehr schwach	nicht induzierbar	187 ± 2	199 ± 9	n.d.
pGal	mittel	induzierbar	439 ± 8	1245 ± 211	(D)-Galaktose
pBga	mittel	induzierbar	292 ± 6	1810 ± 336	IPTG
pAra	stark	induzierbar	233 ± 1	3914 ± 78	(L-)Arabinose
pXyl*	stark	induzierbar	696 ± 5	5190 ± 227	(D)-Xylose

Im Vergleich zum optimierten Xylose induzierbaren Promotor System (pXyl*) zeigte der neu identifizierte Arabinose induzierbare Promotor (pAra) mit nahezu 3900 mU das höchste β-Galaktosidase Expressionslevel bei gleichzeitig dichtester Regulation. Obwohl nicht weiter modifiziert oder optimiert, zeigt das Arabinose induzierbare Promotorsystem eine vergleichbar hohe Aktivität zum bereits optimierten Xylose Promotor und besitzt somit großes Potenzial für die heterologe Proteinexpression in *B. megaterium*. Eine mittelstarke Promotor Aktivität von ca. 1800 mU wurde für den Promotor des endogenen β-Galaktosidase Gens (pBga) beobachtet, jedoch nur bei Zugabe des Laktose Analogons IPTG. Die Aktivität des Galaktose induzierbaren Promotors (pGal) fiel mit 1200 mU eher schwach aus. Für den putativen Saccharose induzierbaren Promotor (pSuc) konnte hingegen keine signifikante Induktion bzw. Aktivität festgestellt werden.

Die besten induzierbaren Promotoren wurden zudem auf ihre Anfälligkeit für die Katabolitrepression getestet. Diese ist insbesondere wichtig für die Entwicklung und die Anpassung von effizienten Expressionsmedien, da beispielsweise die Verwendung von Glukose als Kohlenstoffquelle einen stark inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des wildtypischen Xylose Promotors hat. Die Auswirkung von zahlreichen Zuckern auf die Katabolitrepression der einzelnen Promotoren wurde in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3: Profile der Katabolitrepession für ausgewählte induzierbare Promotoren. Die Daten zeigen die verbleibende Aktivität bei der Anzucht mit dem entsprechenden Zucker

Zucker	pAra	pXyl	pXyl*
M9CA ^{mod}	2,7 ± 0,8	3,2 ± 1,6	5,2 ± 1,4
Arabinose	100	61,1 ± 3,4	85,9 ± 12,1
Xylose	59,7 ± 11,6	100	100
Glycerol	114,9 ± 4,4	120 ± 4,0	166,9 ± 4,88
Glukose	4,2 ± 0,5	8,2 ± 0,5	70 ± 12,4
Galaktose	20,3 ± 4,8	94,8 ± 3,8	86,7 ± 4,2
Fructose	13,7 ± 1,2	26,9 ± 0,4	102,1 ± 7,2
Saccharose	18,4 ± 2,6	85,9 ± 2,2	108,3 ± 7,5

Aus Tabelle 4.3 geht hervor, dass die Aktivität des Arabinose induzierbare Promotors (pAra) durch die Supplementation von Glukose stark inhibiert wird. Ein ähnlich stark reprimierender Effekt wurde für die Zucker Fructose, Saccharose und Galaktose festgestellt. Xylose hingegen hatte einen mittelstark inhibitorischen Effekt. Die Verwendung von Glycerol schien sich sogar positiv auf die Aktivität des Arabinose Promotors auszuwirken. Ein ähnliches Bild ergab sich für die Aktivität des wildtypischen Xylose Promotors (pXyl), wobei neben Glukose lediglich Fructose einen signifikant inhibitorischen Effekt auf die Promotor Aktivität zeigte. Eine Katabolitrepession auf den optimierten Xylose Promotor (pXyl*) konnte nur ansatzweise für die Glukose und Galaktose festgestellt werden.

Als nächstes wurden die neu identifizierten und charakterisierten Promotoren auf ihre Anwendbarkeit für die biotechnologische Produktion von Progesteron, einem zentralen Vorläufer des Glukokortikoids Cortisol, in *B. megaterium* untersucht. Der angestrebte Umsatz von Pregnenolon zu Progesteron sollte durch die heterologe Expression der Cholesteroxidase (BCO2) aus *Brevibacterium sterolicum* realisiert werden. Getestet wurden die stärksten Promotoren pXyl*, pAra, p0706, p4756 und p3537. Der stärkste Umsatz von Pregnenolon zu Progesteron konnte, in Analogie zum β -Galaktosidase-Assay, beim neuen Promotor p3537 beobachtet werden. Innerhalb von 24 h konnten 3.6 mM Progesteron gebildet werden. Bei Verwendung des Promotors p4756 konnten 2,9 mM Progesteron produziert werden. Die Promotoren pAra und p0706 zeigten mit nahezu 3.5 mM Progesteron identische Produktbildungsraten zum optimierten Referenzpromotor pXyl*. Der Umsatz von Pregnenolon zu Progesteron mit dem nicht optimierten Promotor

pXyl lag beispielsweise bei lediglich bei 1,4 mM Progesteron, weshalb das Potenzial der neu identifizierten und noch nicht optimierten Promotoren umso größer einzuschätzen zu ist.

In Erweiterung der angestrebten Identifizierung und Charakterisierung neuer Promotorsysteme für die effiziente heterologe Protein Expression in *B. megaterium*, wurde die Zusammenarbeit mit MD zum gezielten Screening nach Sekundärmetaboliten mit besonderer biotechnologischer Relevanz genutzt. Mit diesen Experimenten konnte die Bedeutung der neu identifizierten Promotoren für vielfältige Reaktionen und die daraus ableitbare breite Einsetzbarkeit dieser Promotoren überzeugend untermauert werden. Im Verlauf dieser Kollaboration konnte das C30 Carotinoid Derivat Diaponeurosporensäure im Metabolom von *B. megaterium* nachgewiesen werden. Dessen unmittelbarer Vorläufer Diaponeurosporen zeichnet sich im Vergleich zu anderen Carotinoiden durch eine erhöhte Stabilität aus und besitzt weiterhin vielversprechende Eigenschaften bezüglich der Prävention und Behandlung inflammatorischer Krankheiten [Liu et al., 2016; Ying et al., 2017]. Um das Potenzial von *B. megaterium* für die effiziente und nachhaltige Produktion von Diaponeurosporen zu optimieren, wurde dessen Syntheseweg im weiteren Verlauf des Projekts näher beleuchtet (siehe Abb. 14). Bioinformatische Analysen ermöglichten die Identifizierung eines Genclusters mit putativen Genen für die C30 Carotinoid Biosynthese. Es handelte sich hierbei um das Gen einer Diapophytoen Synthase (BMD_0659: crtM), welche als Operon mit zwei Diapophytoen Desaturasen (BMD_0657: crtN1 und BMD_0658: crtN2) im Genom von *B. megaterium* vorlag. Die Aktivitäten der einzelnen Enzyme wurden nach heterologer Expression im nicht-carotinogenen Modellorganismus *Escherichia coli* bestimmt.

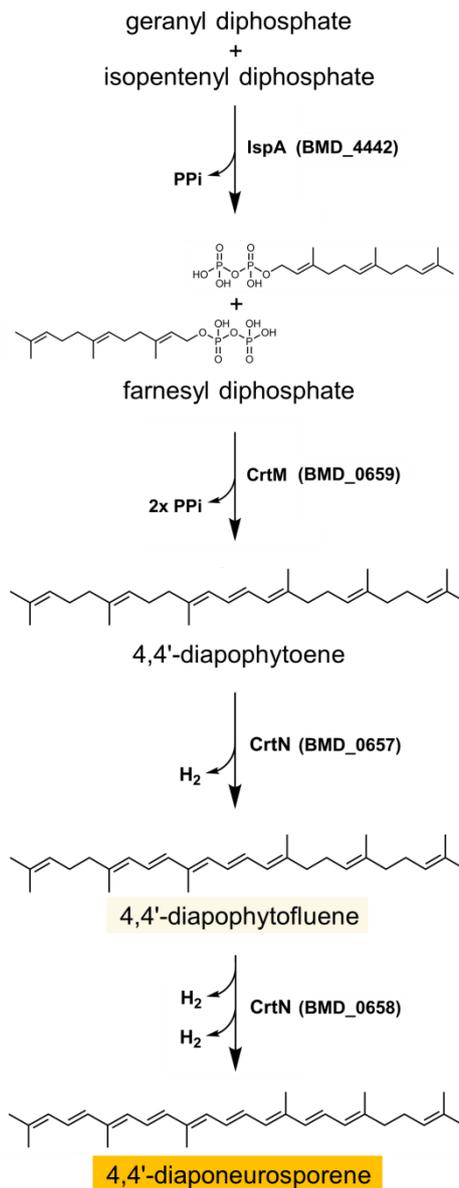


Abbildung 14: Biosyntheseweg für die Produktion von Diaponeurosporen in *B. megaterium*.

Die generierten Daten zeigten, dass der erste Schritt der Carotinoid Biosynthese durch die Kondensation von zwei Molekülen Farnesylpyrophosphat (FPP) initiiert wird. FPP wird in *B. megaterium* hauptsächlich durch die FPP Synthase (BMD_4442: ispA) bereitgestellt, welche ebenfalls im Zuge dieser Studien identifiziert und charakterisiert wurde. Im folgenden Schritt erfolgt die schrittweise Desaturierung von Diapophytoen zu Diaponeurosporen. Im Unterschied zu anderen Pigment bildenden Bakterien sind bei der Desaturierung von Diapophytoen in *B. megaterium* zwei Desaturasen (crtN1 und crtN2) notwendig. Für die gesteigerte Biosynthese von Diaponeurosporen in *B. megaterium* wurden die ORFs der beteiligten Enzyme polycistronisch unter der Kontrolle des optimierten Xylose Promotors pXyl* arrangiert. Initiale Versuche in *E. coli* (pXyl* ist dort auch ohne Induktion mit Xylose

aktiv) lieferten Stamm-abhängige Diaponeurosporen Ausbeuten zwischen 0,4 und 4 mg/L (siehe Abb. 15). Entsprechende Expressionsversuche in *B. megaterium* lieferten vergleichbare Diaponeurosporen Ausbeuten von durchschnittlich 3,8 mg/L Kultur. Durch die Verwendung des neu identifizierten Arabinose Promotors konnte diese Ausbeute in *B. megaterium* um mehr als das Doppelte auf 7,8 mg/L gesteigert werden.

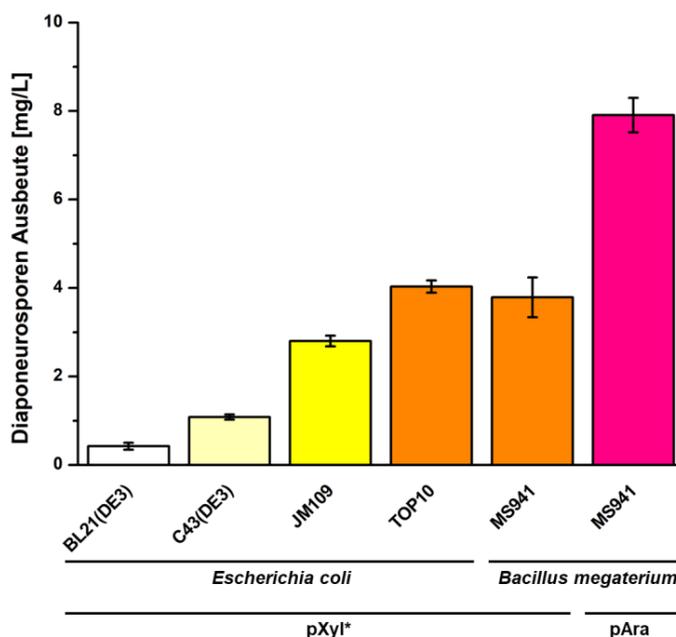


Abbildung 15: Diaponeurosporen Ausbeuten. Absolute Ausbeuten nach heterologer Expression des synthetischen Carotinoid Operons aus *B. megaterium* in unterschiedlichen Organismen und unter Kontrolle unterschiedlicher Promotoren.

Zusammenfassung

Zusammenfassend wurde im AP4 eine Vielzahl unterschiedlicher Promotoren für die heterologe Proteinexpression in *B. megaterium* validiert. Die neuen Promotoren ließen sich den Klassen der induzierbaren, Wachstumsphasen-abhängigen sowie konstitutiven Promotoren zuordnen. Ebenso vielfältig waren auch die ermittelten Promotor Stärken, welche ein sehr dynamisches Proteinexpressions-Profil mit Aktivitäten zwischen 15 % und 145 % im Vergleich zum Referenzpromotor erlaubten. Mithilfe der stärksten Promotoren konnten zusätzlich zur angestrebten Verbesserung der Cortisonproduktion (siehe AP 5) weitere biotechnologisch interessante Anwendungen in *B. megaterium* optimiert werden. Hierbei handelte es sich einerseits um die Umwandlung von Pregnenolon zu Progesteron, einem zentralen Vorläufermolekül bei der Cortisynthese und andererseits um die

Biosynthese des pharmazeutisch vielversprechenden Carotinoids Diaponeurosporen. Das zeigt, dass die neu identifizierten Promotoren ein breites Einsatzgebiet aufweisen und für eine Reihe biotechnologischer Prozesse eine umweltschonendere, die Ökobilanz verbessernde Anwendung garantieren. Die Ergebnisse dieser beiden Studien wurden kürzlich in den Fachjournalen „Metabolic Engineering“ [Hartz et al., 2018] und „Journal of Biotechnology“ [Hartz et al., 2019] veröffentlicht.

Referenzen

Gerber, A., Kleser, M., Biedendieck, R., Bernhardt, R., Hannemann, F., 2015. Functionalized PHB granules provide the basis for the efficient side-chain cleavage of cholesterol and analogs in recombinant *Bacillus megaterium*. *Microb. Cell Fact.* 14, 107.

Hartz, P., Milhim, M., Trenkamp, S., Bernhardt, R., Hannemann, F., 2018. Characterization and engineering of a carotenoid biosynthesis operon from *Bacillus megaterium*. *Metab. Eng.* 49, 47–58.

Hartz, P., Mattes, C., Schad, M., Bernhardt, R., Hannemann, F., 2019. Expanding the promoter toolbox of *Bacillus megaterium*. *Journal of Biotechnology* (ahead of print).

Liu, H., Xu, W., Chang, X., Qin, T., Yin, Y., Yang, Q., 2016. 4,4'-diaponeurosporene, a C30 carotenoid, effectively activates dendritic cells via CD36 and NF- κ B signaling in a ROS independent manner. *Oncotarget* 7, 40978–40991.

Liu, H., Xu, W., Yu, Q., Yang, Q., 2017. 4,4'-diaponeurosporene-producing *Bacillus subtilis* increased mouse resistance against salmonella typhimurium infection in a CD36-dependent manner. *Front. Immunol.* 8, 483.

Stammen, S., Müller, B.K., Korneli, C., Biedendieck, R., Gamer, M., Franco-Lara, E., Jahn, D., 2010. High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4037–4046.

Stenger, B., Gerber, A., Bernhardt, R., Hannemann, F., 2018. Functionalized poly(3-hydroxybutyric acid) bodies as new in vitro biocatalysts. *Biochim. Biophys. Acta* 1866, 52–59.

AP5

Optimierung Cortisonproduktion im Ganzzellsystem

In den folgenden Schritten wurden unterschiedliche Parameter des gesamten Kultivierungsprozesses variiert und angepasst. Das Ziel der Prozessoptimierung bestand im Erreichen der größtmöglichen Effizienz des Ganzzellsystems, um die Voraussetzungen einer Benchmarkreaktion zu erfüllen und die Verbesserungen zur ökologischen Nachhaltigkeit des Systems bestmöglich zu demonstrieren.

5.1 Erhöhung der Substratumsetzung

Hierbei erfolgte eine Optimierung der limitierenden Schritte des Prozesses, welche beispielsweise eine Variation der Umsatzbedingungen beinhalten. In diesem Fall konnte eine Erhöhung der DMSO Konzentration zur wesentlichen Verbesserung der Substratlöslichkeit und -aufnahme beitragen. Eine zeitgleiche Erhöhung der Zelldichte in der Umsatzkultur ermöglichte eine effizientere Substratumsetzung und führte letztendlich zu einer Steigerung der Cortisonproduktion um 42% auf $3,57 \pm 0,20 \text{ g L}^{-1}$.

Da die Produktion der erforderlichen Proteine in diesem System von der Zugabe des Induktors Arabinose abhängig ist, empfahl sich die Ermittlung der optimalen Arabinosekonzentration zur Induktion. Die Bestimmung der effizientesten Proteinproduktion/-aktivität ist erforderlich, da nur auf diesem Weg der finale Vergleich unterschiedlicher Expressionssysteme ermöglicht wird. Hierbei stellte sich ein konzentrationsabhängiger und regulierbarer Charakter des Arabinose - induzierbaren Promotors (P_{ARA}) heraus und durch die Anpassung der Induktorkonzentration konnte eine weitere Erhöhung der Cortisonproduktion von 35% beobachtet werden, was einer Ausbeute von $4,8 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ pro 24 h Reaktionsdauer entspricht.

Erhöhung der Produktselektivität

Die folgenden Optimierungsschritte wurden durchgeführt, um das dargestellte Ganzzellsystem den Bedingungen der Fermentation zur RNA Analyse aus AP1 anzunähern. Zusätzlich sollte hierbei die Produktselektivität erhöht werden, um in Bezug auf ökologische Nachhaltigkeit (z.B. durch Energieeinsparungen und Einsparung des Rohstoffverbrauchs) anschließende Reinigungsprozesse des gewünschten Produktes zu minimieren. Auch die Effizienz bei Wiederverwendung des Kulturmediums zur Durchführung der Umsatzreaktion wurde hierbei überprüft, da der Verzicht auf phosphathaltige Lösungen maßgeblich zur ökologischen Nachhaltigkeit (hinsichtlich einer fördernden Eutrophierung) beiträgt. Zu

diesem Zweck wurden unterschiedliche Kombinationen der Kultivierungsmedien sowohl für Expression als auch des Umsatzes getestet. Ersetzt wurde hierbei das zuvor genannte Vollmedium (TB) zur Expression durch das definiertes modifiziertes Minimalmedium M9CA wie in AP1 beschrieben ersetzt. Zusätzlich wurde das für die Umsatzreaktion verwendete Puffersystem (KPi) durch das bereits in der Expressionskultur genutzte Medium ersetzt und die daraus resultierenden Produktmuster nach 24 h in Bezug auf deren Produktselektivität analysiert (siehe **Tabelle 5.1**). Durch die Ermittlung der jeweiligen Produktselektivität ergab sich der höchste Wert nach Verwendung des Minimalmediums (M9CA) für beide Kultivierungsschritte (Expression und Umsatz) von 96% im Vergleich zu den alternativen Mediumkombinationen, und einer Steigerung um 8 % zum ursprünglich genutzten System (TB/KPi). Zwar ergab sich durch den Ersatz der Kultivierungsmedien eine Umsatzeinbuße von 16%, welche sich aber durch anschließende Justierung der Kultivierungstemperatur von 30 °C auf 37°C für beide Reaktionsschritte vollständig eliminieren ließ und zu einer weiteren Erhöhung der Selektivität auf 98 % führte.

Tabelle 5.1: Dargestellt sind die Mengen an produziertem Cortison, der Hydrocortisonverbrauch und Produktselektivität in Abhängigkeit von den verwendeten Kulturmedien und der Fermentationstemperatur. Eingesetzt wurden 20 mM Hydrocortison im *B. megaterium* Ganzzellumsatz.

*wiederverwendetes Medium aus Expression;

System	Expression [Medium / Temperatur]	Umsatz [Medium / Temperatur]	Cortison- produktion [g L ⁻¹ pro 24 h]	Hydrocortison- verbrauch [g L ⁻¹ pro 24 h]	Produkt- selektivität [%]
11βHSD1	TB / 30°C	KPi / 37°C	4.50 ± 0.06	5.09 ± 0.04	88.40
	TB / 30°C	TB* / 37°C	4.79 ± 0.07	5.14 ± 0.07	93.20
	M9CA / 30°C	KPi / 37°C	2.52 ± 0.05	5.38 ± 0.01	46.78
	M9CA / 30°C	M9CA* / 37°C	3.76 ± 0.09	3.90 ± 0.09	96.38
	M9CA / 37°C	M9CA* / 37°C	4.76 ± 0.21	4.86 ± 0.20	98.08

Die gesteigerte Produktselektivität auf nahezu 100%, durch Einsatz eines wiederverwendbaren Kulturmediums bei gleichzeitigem Verzicht auf zusätzliche phosphathaltige Puffersysteme, ermöglichte somit die Gestaltung eines Prozesses mit maßgeblich erhöhter ökologischer Nachhaltigkeit. Aufgrund dieser Aspekte ist dieses Verfahren durchaus als realistischer biotechnologischer Prozess im industriellen Maßstab in Betracht zu ziehen.

5.2 Validierung des optimierten *B. megaterium* Expressionssystems

Im letzten Schritt dieses Arbeitspaketes erfolgte die Validierung und biotechnologische Anwendung des neu entwickelten Expressionssystems (siehe AP4). Dieses basiert auf dem Einsatz von bisher unbekanntem, hier durch RNA-Analysen ermittelten Promotorsequenzen im *B. megaterium* Ganzzellsystem zur effizienten und nachhaltigen Produktion gewünschter Substanzen, wie beispielsweise steroidaler Arzneimittel. Die hier vorgestellte optimierte Biokatalyse demonstriert die Eignung des Systems zur maßgeblichen Verbesserung bestehender Prozesse von biotechnologischer Relevanz.

Es wurde ein molekularbiologischer Austausch der bisher verwendeten Promotorsequenz (P_{ARA}) durch eine der neu identifizierten putativen Promotorsequenzen (BMD_0706) durchgeführt. Durch den konstitutiven Charakter des alternativen Promotors entfiel hier die Ermittlung der Induktorkonzentration und hatte zusätzlich eine Einsparung des Rohstoffes Arabinose zufolge. Die Durchführung eines Ganzzellumsatzes des zuvor optimierten Systems (Expression reguliert durch P_{ARA}) unter Einsatz von 50 mM Hydrocortison (entspricht einer Verdoppelung der Konzentration vorheriger Versuche) resultierte in einer Cortisonausbeute von $8,01 \pm 0,32 \text{ g L}^{-1}$ was einer weiteren Erhöhung der Cortisonproduktion von 68 % entspricht. Bei der Verwendung des neuen, verbesserten Systems (BMD_0706) wurde dieses dem zuvor analysierten System (enthält P_{ARA}) gegenübergestellt. Der Austausch der Promotorsequenz durch BMD_0706 führte zu einer weiteren, enormen Produktsteigerung auf $13,65 \pm 0,64 \text{ g L}^{-1}$. Dieser Wert entspricht einer 70%igen Erhöhung der bisher maximal erreichten Cortisonausbeute und hebt somit deutlich das Potenzial des neuen Systems (BMD_0706) hervor.

Um die Eignung und Anwendbarkeit des neu entwickelten Systems zusätzlich zu verdeutlichen, wurde zeitgleich ein analoges Xylose-induzierbares System (enthält Promotor P_{XYL}) erstellt und zur Gegenüberstellung genutzt. Expressionssysteme mit Xylose-induzierbarem Promotor wurden bisher häufig erfolgreich in *B. megaterium* Ganzzellsystemen zu Forschungs- und industriellen Zwecken eingesetzt, wie beispielsweise in der biotechnologischen Produktion von Vitamin B12 ¹ und D-Mannitol ^{2,3} als auch zur enzymatischen Seitenkettenspaltung von Cholesterin und weiteren Phytosterolen zur Produktion des Steroidvorläufers Pregnenolon ⁴ [Patent US 2015/0225703 A1, 2015]. Daher kann das Xylose-induzierbare System als „Goldstandard“ zur Proteinexpression in *B. megaterium* bezeichnet werden. Es wurde außerdem ebenfalls im bereits genannten Referenzsystem von Kiss *et al.* zur Expression von CYP106A1 eingesetzt ⁵.

Durch die Gegenüberstellung des xyloseinduzierbaren Systems mit dem optimierten Expressionssystem (BMD_0706) ergibt sich eine Produktsteigerung von 100% und demonstriert somit zusätzlich das Potenzial zur enormen Verbesserung von bereits

etablierten biotechnologischen Prozessen mit *B. megaterium* als Produktionswirt (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Dargestellt ist die Cortisonproduktion in Abhängigkeit des verwendeten Promotors und entsprechenden Induktors zur Proteinproduktion.

Promotor	Induktor	Cortisonproduktion [g L^{-1} pro 24 h]
P_{ARA}	L-Arabinose	8.01 ± 0.32
P_{XYL}	D-Xylose	6.66 ± 0.11
BMD_0706	kein Induktor (konstitutiv)	13.65 ± 0.64

5.3 Zusammenfassung Systemoptimierung

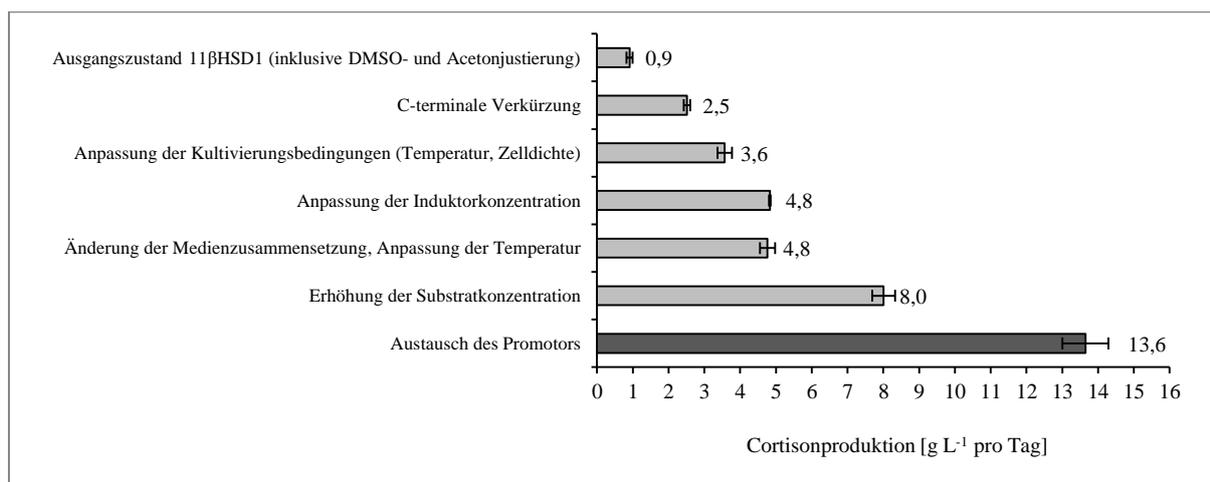


Abbildung 16: Übersicht des Fortschritts im Laufe der Prozessoptimierung. Dargestellt ist die Cortisonproduktion im *B. megaterium* Ganzzellsystem in Abhängigkeit der durchgeführten Optimierungsstufe.

Durch den Umstieg des im Projektantrag vorgestellten CYP106A1 auf ein alternatives System, basierend auf 11 β HSD1, wurde durch die Anpassung einer Reihe von Parametern ein funktioneller biotechnologischer Prozess zur Cortisonproduktion etabliert (Abbildung 16).

Anschließende Optimierungen ermöglichten die Eliminierung von limitierenden Faktoren während des Fermentationsprozesses (Verbesserung der Proteinlöslichkeit, Expressions- und Umsatzbedingungen) und resultierten in einer 5-fachen Steigerung der Cortisonkonzentration von 0,9 auf $4,8 \text{ g L}^{-1}$ pro 24 h. Diese konnte bei zeitgleicher Erhöhung

der Produktselektivität um 9,6 % durch die Änderung der Medienzusammensetzung und Kultivierungsanpassung aufrechterhalten werden und durch Erhöhung der Substratkonzentration sogar noch um weitere 67 % gesteigert werden.

Zur Validierung des neu entwickelten Expressionssystems wurde der zuvor genutzte Promotor (P_{ARA}) durch die im AP 3 und 4 identifizierte und validierte putative Promotorsequenz BMD_0706 aus *B. megaterium* ersetzt und dessen Effizienz im Ganzzellumsatz bestimmt. Es konnte eine zusätzliche 70 %ige Erhöhung der Cortisonausbeute erreicht werden, welche einer finalen Produktmenge von $13,6 \text{ g L}^{-1}$ pro 24 h entspricht. Im Vergleich zum Referenzsystem vor Beginn des Projekts⁵, basierend auf der Aktivität von CYP106A1 entspricht dies einer außergewöhnlichen Produktsteigerung um den Faktor 970.

Somit konnte anhand der etablierten Benchmark Reaktion zur biotechnologischen Arzneimittelherstellung in *B. megaterium* das Potenzial des neu entwickelten Expressionssystems demonstriert werden. Überdies wurde ein ressourcensparendes, nachhaltiges und konkurrenzfähiges System zur Cortisonherstellung etabliert, welches das Potenzial zum industriellen Einsatz besitzt und zur Wertsteigerung des günstig erhältlichen Substrates Hydrocortison fähig ist. In Bezug auf die ökologische Nachhaltigkeit des Prozesses konnten an mehreren Stufen der Produktion Optimierungen erfolgen, wie z.B. die Möglichkeit zur durchgängigen Nutzung desselben Kulturmediums während der gesamten Fermentation, was die Nutzung phosphathaltiger Flüssigkeiten und somit die mögliche Eutrophierung von Gewässern verringert. Zudem ermöglicht eine nahezu 100%ige Produktselektivität einen ausbleibenden oder zumindest verringerten Aufwand zur arbeits- und energieintensiven Produktreinigung.

Anhand dieser Reaktion und dessen ermittelter Ökobilanz (vergl. AP2.3) konnte somit das Potenzial des neu entwickelten Expressionssystems zur Nachhaltigkeit von Fermentationsprozessen und dessen Konkurrenzfähigkeit zu vergleichbaren chemischen Prozessen demonstriert werden.

Die Etablierung und Optimierung des Prozesses zur Cortisonproduktion in der Zeitschrift *Metabolic Engineering* publiziert:

König L, Hartz P, Bernhardt R, Hannemann F, High-yield C11-oxidation of hydrocortisone by establishment of an efficient whole-cell system in *Bacillus megaterium*, *Metab Eng.* 2019 55: 59-67.

Referenzen

1. Moore, S. J., Mayer, M. J., Biedendieck, R., Deery, E. & Warren, M. J. Towards a cell factory for vitamin B12 production in *Bacillus megaterium*: Bypassing of the cobalamin riboswitch control elements. *N. Biotechnol.* **31**, 553–561 (2014).

2. Vary, P. S. *et al.* *Bacillus megaterium*-from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 957–967 (2007).
3. Bäumchen, C. *et al.* D-Mannitol production by resting state whole cell biotransformation of D-fructose by heterologous mannitol and formate dehydrogenase gene expression in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol. J.* **2**, 1408–1416 (2007).
4. Gerber, A., Kleser, M., Biedendieck, R., Bernhardt, R. & Hannemann, F. Functionalized PHB granules provide the basis for the efficient side-chain cleavage of cholesterol and analogs in recombinant *Bacillus megaterium*. *Microb. Cell Fact.* **14**, 1–13 (2015).
5. Kiss, F. M. *et al.* Comparison of CYP106A1 and CYP106A2 from *Bacillus megaterium* – identification of a novel 11-oxidase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 8495–8514 (2015).

AP6

Direct Array Software Modulerweiterungen

A) Normalisierung

- Es sich gezeigt hat, dass die für die Microarray-Analyse typischen globalen Normalisierungsverfahren wie Skalierung und Quantil-Normalisierung Schwächen bei der Analyse der Daten hat. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass bei der genomweiten Genexpressionsanalyse bei Prokaryoten die Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Normalisierungsverfahren oft nicht erfüllt ist, d.h. weniger als 95% der Gene sind in den zu vergleichenden Proben stabil exprimiert.
- Es wurde deshalb ein Analyse-Modul entwickelt, was den Umstand verschiedener Signalverteilungen über die zu vergleichenden Probengruppen ausgleicht. Dabei werden im ersten Schritt stabile Gene definiert oder identifiziert, auf die anschließend normalisiert wird.

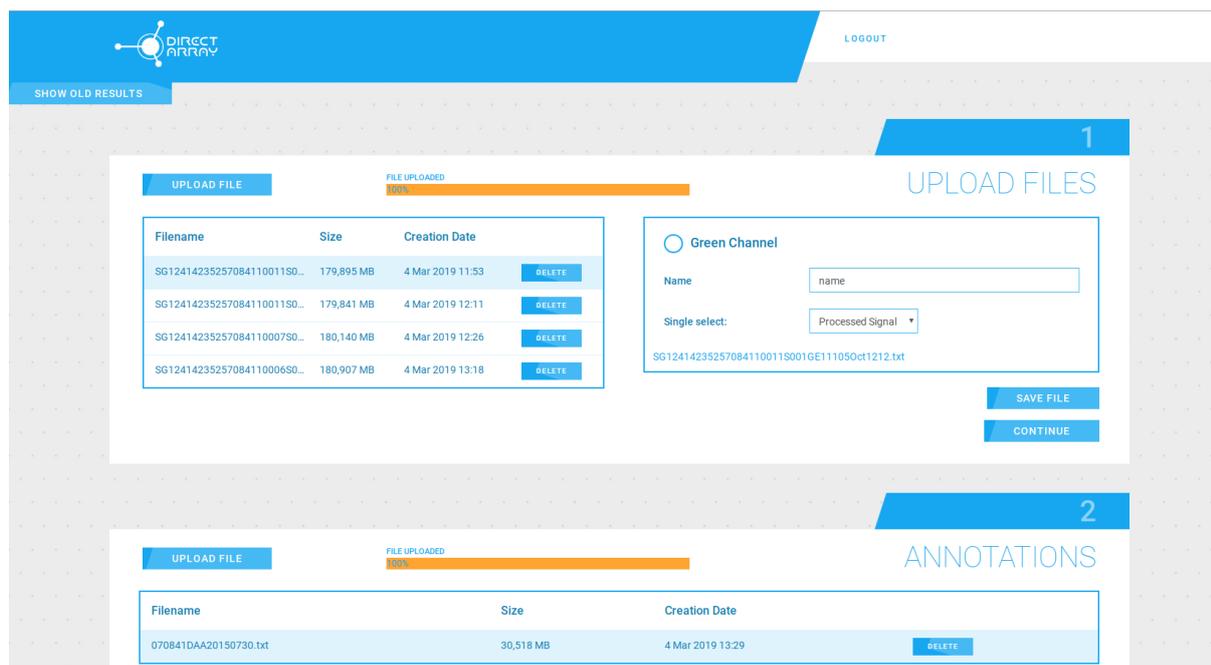


Abbildung 17: Screenshot des DirectArray Moduls zum Upload der Daten für die Analyse der Intergen- und Antisense Expression.

B) Auswertung von Antisense- und Intergen-Expression

Darüber hinaus wurde ein Algorithmus zur Analyse von Intergen- und Antisense-Expression fertig gestellt und in DirectArray implementiert. Die Expression der einzelnen Oligonukleotide wird in DirectArray visualisiert. Die Ergebnisse können in verschiedenen Varianten runtergeladen werden.

Single select:

Inter Genes Analysis

Oligo start coordinate: 1528

Oligo end coordinate: 1588

Analysis name: My Analysis

COMPUTE

Abbildung 18: Screenshot des DirectArray-Moduls: Zuweisung der für die Auswertung relevanten Spalten in den Rohdaten.

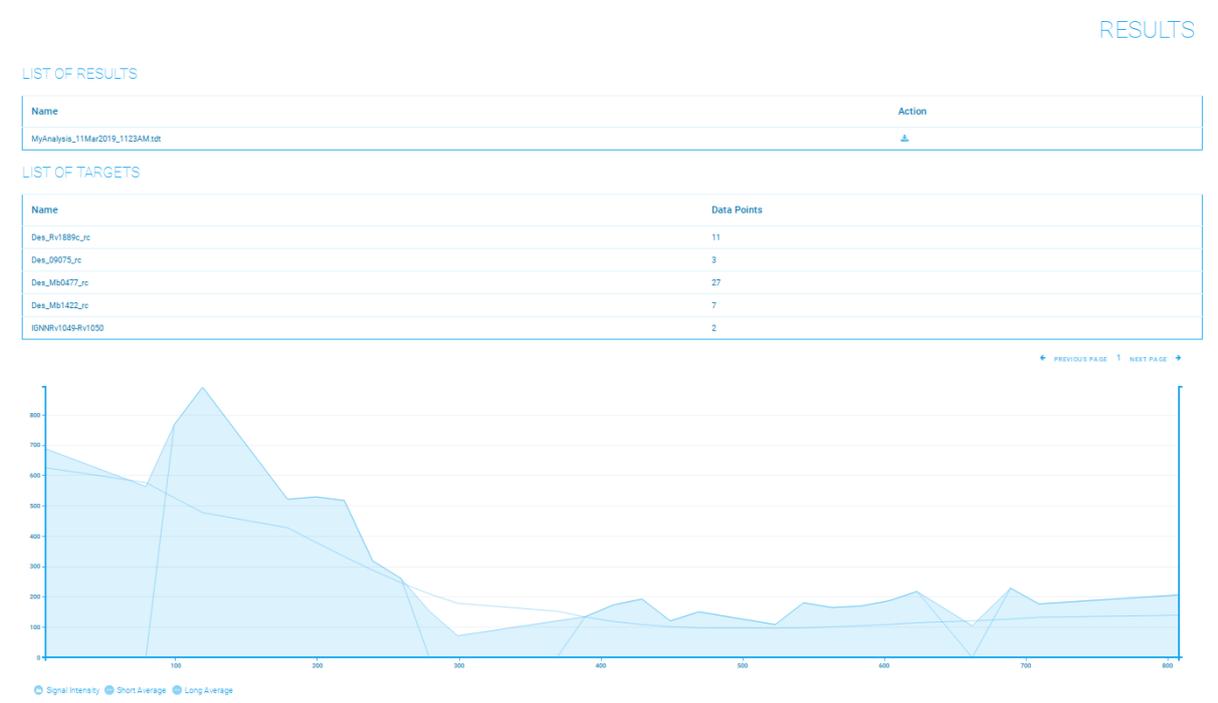


Abbildung 19: Visualisierung der Expression eines exemplarischen Intergens in DirectArray.