HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Lichtregulierte Genexpression mittels photolabil geschützter Effektormoleküle in *Saccharomyces cerevisiae*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Peter Martin Kusen

aus Köln

Düsseldorf, 05.01.2018

aus dem Institut für Bioorganische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Jörg Pietruszka
2. Prof. Dr. Karl -Erich Jaeger

Tag der mündlichen Prüfung:
16.02.2018

Auszug aus „An die Freunde“

Aus der Wahrheit Feuerspiegel
Lächelt sie den Forscher an;
Zu der Tugend steilem Hügel
Leitet sie des Dulders Bahn.

- Dr. Johann Christoph Friedrich von Schiller

Publikationen / Konferenzbeiträge **6**

Zusammenfassung **7**

Abstract **8**

1 Einleitung / Kenntnisstand **9**

1.1 Zellen als Fabriken der Zukunft **9**

1.2 Biotechnologische Relevanz von *S. cerevisiae* **13**

1.3 Potential optisch-regulierter Expressionssysteme **18**

1.4 *Caged compounds* **20**

1.5 Genregulation mittels *caged compounds* **24**

1.6 Ziele dieser Arbeit **34**

2 Ergebnisse und Diskussion **36**

2.1 Lichtregulation mittels *caged*-Galaktose **36**

2.1.1 *Das pGAL1*-basierte Expressionssystem 36

2.1.2 Charakterisierung von *S. cerevisiae -ΔGAL1 -pGAL1-YFP* 37

2.1.3 Charakterisierung und Anwendung von NPip-Gal (*caged*-Gal) 42

2.2 Lichtregulation (Induktion) mittels *caged*-Cu^{2+} **50**

2.2.1 *Das pCUP1*-basierte Expressionssystem 52

2.2.2 Charakterisierung von *S.c.-pCUP1-YFP* 54

2.2.3 Charakterisierung von DMNP-EDTA-Cu^{2+} (*caged*-Cu^{2+}) 57

2.2.4 Optische Expressionsregulation mittels DMNP-EDTA-Cu^{2+} (*caged*-Cu^{2+}) 63

2.2.5 *Screening* des Induktionszeitpunkts mittels optischer Regulation 68

2.2.6 Alternatives *caged*-Cu^{2+} (3Gcage-Cu^{2+}) 70

2.3 Zwei-Wellenlängen-Regulation mittels *caged*-EDTA **77**

2.3.1 Reversible Regulation mittels EDTA 79

2.3.2 Synthese und Charakterisierung von DEACM-EDTA (*caged*-EDTA) 80

2.3.3 Einsatz von DEACM-EDTA in biologischen Systemen 86

2.4 Lichtregulation (Repression) mittels *caged*-Methionin **90**

2.4.1 *Das pMET17*-basierte Expressionssystem 91

2.4.2 Charakterisierung von *S.c.-pMET17-YFP* 93

2.4.3 Synthese und Charakterisierung von NVOC-Met (*caged*-Met) 99

2.4.4 Untersuchungen zu möglichen Toxizitäten 104

2.4.5 Optische Repression der *pMET17*-regulierten Genexpression 105

3 Zusammenfassung **117**

3.1 Lichtregulation mittels *caged*-Galaktose **121**

3.2 Lichtregulation mittels *caged*-Cu^{2+} **123**

3.3 Lichtregulation mittels *caged*-EDTA **126**

3.4 Lichtregulation mittels c*aged*-Met **129**

4 Ausblick **134**

5 Material und Methoden 143

5.1 Verwendete Materialien 143
5.1.1 Geräte und Software 143
5.1.2 Chemikalien, Enzyme und Lösungen 144

5.2 Molekularbiologische Methoden 146
5.2.1 Isolation von Plasmid-DNA 146
5.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 146
5.2.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren 147
5.2.4 *In vitro* Rekombination und Sequenzierung von Nukleinsäuren 147
5.2.5 Verwendete Plasmide und Nukleinsäuren 147
5.2.6 Sequenzen der Expressionskassetten 149
5.2.7 Konstruktion der Reporterstämme 151

5.3 Mikrobiologische Methoden 152
5.3.1 Verwendete Mikroorganismen 152
5.3.2 Kultivierung von Mikroorganismen 153
5.3.3 Mikrofluidische Kultivierung 153
5.3.4 Kultivierung und Belichtung im BioLector *Setup* 154
5.3.5 Lagerung von Mikroorganismen 155
5.3.6 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen 155

5.4 Spektroskopische Methoden 157
5.4.1 Absorptionsmessungen 157
5.4.2 Fluoreszenzmessungen 157

5.5 Photolyse von *caged compounds* 158
5.5.1 Bestimmung der Photolyse-Quantenausbeuten 160
5.5.2 Bestimmung der Zeit für die halbmaximale photolytische Spaltung 162

5.6 Synthesen der *caged compounds* 164
5.6.1 Erste Strategie zur Synthese von 3Gcage (41) 164
5.6.2 Zweite Strategie zur Synthese von 3Gcage (41) 165
5.6.3 Dritte Strategie zur Synthese von 3Gcage (41) 166
5.6.4 Synthese von DEACM-EDTA (*caged*-EDTA, 58) 170
5.6.5 Synthesen von NVOC-Met (*caged*-Met, 61) 172

Abkürzungsverzeichnis 174

Literaturverzeichnis 177

Danksagung 195

Anhang 196

Anteil am Manuskript eigener Publikationen 208

Erklärung 210

Publikationen / Konferenzbeiträge

Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden, meiner 2013 der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegten Masterarbeit „Lichtabhängige Proteinexpression in Hefen“ sind in diese Arbeit eingegangen. Teile dieser Dissertation wurden bereits publiziert.

Publikationen:

„Optische Genregulation in Mikrobioreaktoren“, P. M. Kusen, K. Hoffmann, G. Wandrey, J. Büchs, J. Pietruszka, *BioSpektrum*, **2017**, *23*, 643-645

„Light-controlled gene expression in yeast using photocaged Cu^{2+}“, P. M. Kusen, G. Wandrey, V. Krewald, M. Holz, S. Meyer zu Berstenhorst, J. Büchs, J. Pietruszka, *J. Biotechnol.* **2017**, *258*, 117-125.

„Optogenetic Regulation of Tunable Gene Expression in Yeast Using Photo-Labile Caged Methionine”, P. M. Kusen, G. Wandrey, C. Probst, A. Grünberger, M. Holz, S. Meyer zu Berstenhorst, D. Kohlheyer, J. Büchs, J. Pietruszka, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2915–2922.

„Light-Mediated Gene Regulation for Complex Expression Procedures in Yeast“, P. Kusen, G. Wandrey, C. Probst, A. Grünberger, M. Holz, S. Meyer zu Berstenhorst, D. Kohlheyer, J. Büchs, J. Pietruszka, *New Biotechnology* **2016**, *33*, Supplement, S189.

Vortrag:

18th International Conference on Photochemistry (Paris, Frankreich), 2016, Peter. M. Kusen, Georg Wandrey, Christopher Probst, Dietrich Kohlheyer, Jochen Büchs, Jörg Pietruszka; “Light-Controlled Gene Expression in Yeast”

Poster-Präsentationen:

17th European Congress on Biotechnology (Krakau, Polen), 2016, P. M. Kusen, G. Wandrey, C. Probst, S. Meyer zu Berstenhorst, D. Kohlheyer, J. Büchs und J. Pietruszka; “Light-mediated Gene Regulation for Complex Expression Procedures in Yeast”

16th Congress of the European Society for Photobiology (Aveiro, Portugal), 2015, P. M. Kusen, G. Wandrey, C. Probst, S. Meyer zu Berstenhorst, D. Kohlheyer, J. Büchs und J. Pietruszka

Zusammenfassung

Die Ausweitung der Forschung in den letzten Jahrzehnten zur optischen Regulation von zellulären Funktionen führte zur Etablierung der Oberbezeichnung „Optogenetik“. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem Teilgebiet dieser Forschung, welche auf die Regulation von genetischen Expressionssystemen zielt. Dazu wurden lichtregulierte Expressionssysteme in *S. cerevisiae* entwickelt, die auf dem Einsatz von photolabil geschützten Effektormolekülen, sogenannten *caged compounds,* beruhen. Diese photolabilen Verbindungen zerfallen bei Belichtung und setzen ein spezifisches Effektormolekül zur Regulation des jeweiligen Expressionssystems frei. Die angewendeten Expressionssysteme beruhen auf den in *S. cerevisiae* häufig angewendeten Promotoren *pGAL1*, *pCUP1* und *pMET17*. Unter Anwendung einer *caged*-Cu^{2+} Verbindung konnte die Induktion von *pCUP1*-Promotor-kontrollierten Genen mittels UVA-Belichtung durch Anpassung der Belichtungszeit graduell reguliert werden. Auf diesem Wege konnte der Einfluss des Induktionszeitpunktes auf die Expression von *pCUP1*-kontrollierten Genen charakterisiert werden. Die lichtregulierte Genexpression zeichnete sich dabei durch eine nichtinvasive Freisetzung des Effektors aus, wodurch eine Aufrechterhaltung der Sterilbarriere, gleichbleibende atmosphärische Bedingungen, ein konstanter Gastransfer und eine Minimierung von Verdunstung und Verdünnung gewährleistet werden konnte. Darüber hinaus wurde die optische Repression von *pMET17*-Promotor-kontrollierten Genen durch Einsatz einer *caged*-Methionin Verbindung demonstriert. Komplexe Schaltungen bis hin zu einer automatisierten Belichtungsregulation wurden durch die Kombination von optischer Methionin-Freisetzung und zellulären Methionin-Abbau erzeugt. Sie ermöglichten die optische Regulation von Expressions-Start, -Stopp, -Pause und -Rate. Dabei konnte eine hohe Regulationsfrequenz, eine gute Dosierbarkeit der Effektor-Freisetzung sowie eine leichte Automatisierbarkeit unter Reduzierung des mechanischen Aufwandes demonstriert werden.

Des Weiteren konnten Vorarbeiten zur lichtregulierten Induktion des *pGAL1*- und zur Repression des *pCUP1*-Promotors durchgeführt werden. Hierzu wurden die entsprechenden Reporterstämme charakterisiert und erste *caged*-Galaktose und *caged*-EDTA Verbindungen getestet. Dabei konnten die photolytische Zerfallsgeschwindigkeit von *caged*-Galaktose bzw. die Maskierung der Cu^{2+}-Affinität von *caged*-EDTA als limitierende Faktoren und somit als Ansatzpunkte für weiterführende Arbeiten identifiziert werden.

Abstract

In recent decades, the optical regulation of cellular functions has become a fast developing field of research. This led to the establishment of "Optogenetic" as generic term. One part of this research field is the regulation of genetic expression systems. In this thesis, light-regulated expression systems in *S. cerevisiae* have been developed, which are based on the use of photolabile protected effector molecules, so-called caged compounds. These photolabile compounds release upon illumination a specific effector molecule that regulates a respective expression system. The expression systems applied were based on the p*GAL1*, p*CUP1* and p*MET17* promoters commonly used in *S. cerevisiae*.

By means of a caged-Cu^{2+} compound, the induction of p*CUP1*-promoter-controlled genes could be gradually regulated by adjusting the UVA exposure time. In this way, the influence of the induction time on the expression of p*CUP1*-controlled genes could be studied. Thereby, light-regulated gene expression was characterized by a non-invasive release of the effector, which ensured permanent sterility, constant atmospheric conditions, constant gas transfer and a minimization of evaporation and dilution.

In addition, the optical repression of p*MET17* promoter-controlled genes was demonstrated by using a caged-methionine compound. Complex circuits up to automated exposure regulation were generated by the combination of optical methionine release and cellular methionine degradation. They enabled the optical regulation of expression start, stop, pause, and rate. Thus, a high regulation frequency, a good dosage of the effector release as well as an easy automation and a reduction of the mechanical effort could be demonstrated.

Furthermore, preliminary studies were carried out on the induction of the p*GAL1* and on the repression of the p*CUP1* promoter *via* light-regulation. For this purpose, the corresponding reporter strains were characterized and first caged-galactose and caged-EDTA compounds were tested. The photolytic decay rate of caged-galactose and the masking of the Cu^{2+} affinity of caged-EDTA were identified as limiting factors and thus as starting points for further work.

1 Einleitung / Kenntnisstand

1.1 Zellen als Fabriken der Zukunft

Die folgende Dissertation beschäftigt sich mit der Entwicklung neuartiger biochemischer Werkzeuge zur optischen Regulation von genetischen Aktivitäten. Diese dienen dazu, die Konzepte zur Regulation von zellulären Funktionen zukünftig zu erweitern. Die Anwendung dieser optischen Werkzeuge soll also dazu beitragen, eine differenziertere Kontrolle von zellulären Produktionsorganismen zu fördern. Sie steht somit im Kontext der gegenwärtigen biotechnologischen Entwicklung, weshalb deren Bedeutung im Folgenden kurz erläutert wird.

Die industrielle Biotechnologie wendet eine Kombination von biochemischen Prozessen mit technischen Verfahren zur Herstellung bzw. Umwandlung von chemischen Erzeugnissen an. Die möglichen Produkte reichen von Energieträgern sowie Grund- und Feinchemikalien über Lebensmittelzusatzstoffe bis hin zu Agrar- und Pharmaprodukte. Häufig angewendet werden dabei Mikroorganismen und Zellkulturen, welche für den jeweiligen Einsatz gentechnisch optimiert wurden. Die Erkenntnisse, die zu den jeweiligen Anpassungen führen, stammen meist aus den Forschungsbereichen Systembiologie und synthetischer Biologie.[1,2] Diese beiden Disziplinen beschäftigen sich mit der Aufklärung und Manipulation von biochemischen Prozessen innerhalb von Zellen und deren Regulationsnetzwerken. Deren Erkenntnisse werden genutzt, um die zelluläre Produktion einer gewünschten Chemikalie durch gezielte genetische Veränderung eines sogenannten Wirts- oder Produktionsorganismus zu erreicht.

Methodisch können dabei zwei generelle Strategien verfolgt werden, die den Metabolismus der Wirtszellen genetisch anpassen und daher als *metabolic engineering* zusammengefasst werden. Einerseits ist die Anreicherung von zelleigenen Metaboliten zu erwähnen. Dies kann etwa durch die Unterbrechung eines Biosyntheseweges erreicht werden, wodurch die weitere Umwandlung eines Zwischenproduktes unterbunden wird. In *E. coli* konnte dadurch beispielsweise Acetat mittels Unterbindung der oxidativen Phosphorylierung und der zyklischen Funktion des Citratzyklus produziert werden.[3] Zusätzlich kann die Produktion von limitierenden Ausgangsstoffen und Vorstufen verstärkt werden, um die Anreicherung des Zielproduktes zu verstärken. Mit dieser Methode wurde

unter anderem die Bereitstellung der Vorstufe Oxalacetat stimuliert, um die Produktion von Succinylsäure in *E. coli* zu verstärken.[3]

Andererseits ist es auch möglich, artifizielle Biosynthesewege zu generieren, indem biochemische Prozesse von unterschiedlichen Organismen in einem Produktionsstamm neu kombiniert werden. In Verbindung mit der gezielten Anpassung einzelner Schlüsselgene kann somit die Vielfalt der möglichen Produkte vergrößert werden. Die Biotechnologie birgt somit das Potential, die klassische chemische Industrie in vielen Bereichen zu ergänzen oder sogar zu ersetzen. Dabei ermöglicht sie die nachhaltige Produktion von chemischen Erzeugnissen auf Basis nachwachsender Rohstoffe und unter erheblicher Reduktion des Bedarfs von fossilen Ressourcen. Daher kommt ihr eine besondere gesellschaftliche Aufgabe zu, welche insbesondere in einem Wandel der industriellen Wertschöpfungskette liegt. Die Biotechnologie ermöglicht damit einen Strukturwechsel von einer Erdöl-basierten zu einer nachhaltigen auf nachwachsenden Rohstoffen aufbauenden Industrie.

Daneben stellt die Biotechnologie aber auch einen ökonomischen Faktor dar, welcher durch Senkung des Energiebedarfs, des Rohstoffeinsatzes und der Prozessstufen eine relevante Kostensenkung verspricht. Auch deshalb hat sich die Biotechnologie zu einer Zukunftstechnologie entwickelt, welche in den letzten Jahrzehnten rasant gewachsen ist. Allein im Zeitraum von 2011-2016 stieg der Umsatz deutscher Biotechnologieunternehmen um 35 % auf einen Wert von 3,5 Mrd. im Jahr 2016. [4] Dabei nahm die Beschäftigungszahl in Deutschland im selben Zeitraum um 25 % zu und erreichte ca. 22.000 Mitarbeitern im Jahr 2016.[4] Diese ökonomischen Kennzahlen lassen bereits das Potential der Biotechnologie für die Wirtschaft und den Arbeitsmarkt erkennen. Ergänzend dazu existiert bereits eine Vielzahl von pharmazeutischen Produkten, welche durch gezieltes *metabolic engineering* von Mikroorganismen produziert werden. Dazu zählen unter anderem Antibiotika, Virostatika, Zytostatika, Antioxidantien, Antiparasitika, kardiovaskuläre Medikamente, Hormone und immunologische Präparate.[5] Noch deutlicher wird die wirtschaftliche Bedeutung, wenn man die Top-50 Medikamente mit dem höchsten Umsatz in der Pharmaindustrie betrachtet.[6] Davon wurden im Jahr 2015 bereits 25 % mittels mikrobiologischer Methoden hergestellt (s. Tabelle 1), darunter Antikörper, Proteine, Glykokonjugate, Fusionsproteine, und zyklische Peptide. Diese wurden in unterschiedlichen Produktionsstämmen, welche von einfachen Prokaryoten (z. B. *E. coli*) über eukaryotische Mikroorganismen (z. B. *S. cerevisiae*) bis hin zu Säugetier-Zelllinien [z. B. *chinese hamster ovary* (CHO -Zellen)] reichen, hergestellt.

Tabelle 1: Biotechnologisch hergestellte Vertreter der Top-50 Medikamente mit dem höchsten Umsatz in der Pharmaindustrie.[6]

Produktbezeichnung	**Wirkstoff**	**produziert mit**	**Anwendung**	**Typ**
Humira	Adalimumab	CHO-Zellen	Entzündungskrankheiten	Antikörper
Enbrel	TNF-Rezeptors-2 / Fc-Domäne des humanen IgG1	CHO-Zellen	Schuppenflechte, Arthritis	Antikörper-Fusionsprotein
Lantus Solostar	Insulin	*Escherichia coli*	Diabetes	Protein
Novolog Flexpen	Insulin	*Saccharomyces cerevisiae*	Diabetes	Protein
Stelara	Ustekinumab	Maus	Schuppenflechte	Antikörper
Prevnar	Glycoconjugate	*Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli*	Impfstoff gegen *Streptococcus pneumoniae*	Glycoconjugat
Humalog Kwikpen	Insulin	*Escherichia coli*	Diabetes	Protein
Restasis	Ciclosporin	*Tolypocladium inflatum*	Immunsuppressiva	Cyklisches Peptid, nichtribisomal
Orencia	Abatacept	CHO-Zellen	Arthritis	Fusionsprotein
Cimzia	Certolizumab	*Escherichia coli*	Arthritis	Antikörper-PEG-Konjugat
Levemir	Insulin	*Saccharomyces cerevisiae*	Diabetes	Protein
Prolia	Denosumab	CHO-Zellen	Osteoporose	Antikörper
Gardasil	rekombinate HPV Proteine	*Saccharomyces cerevisiae*	HPV Impfstoff	HPV Protein
Simponi	Golimumab	Maus	Arthritis, Entzündungskrankheiten	Antikörper

CHO: *Chinese Hamster Ovary*
HPV: Humane Papillomviren

Die mikrobiologische Produktion beschränkt sich jedoch nicht nur auf das hochpreisige Segment der pharmazeutischen Präparate. Auch chemische Massenprodukte können bereits hergestellt werden.[7] Genannt werden können dafür etwa Basischemikalien der chemischen Industrie, insbesondere monomere Grundbausteine für Polymere, darunter Säuren wie Milchsäure (**1**), Succinylsäure (**2**), Fumarsäure (**3**), Apfelsäure (**4**), Itaconsäure (**5**), Glucarsäure (**6)** und 3-Carboxy-*cis*,*cis*-muconsäure [**7**; (*1E*,3*Z*)-Buta-1,3-dien-1,2,4--tricarboxylsäure] (s. Abbildung 1).[7]

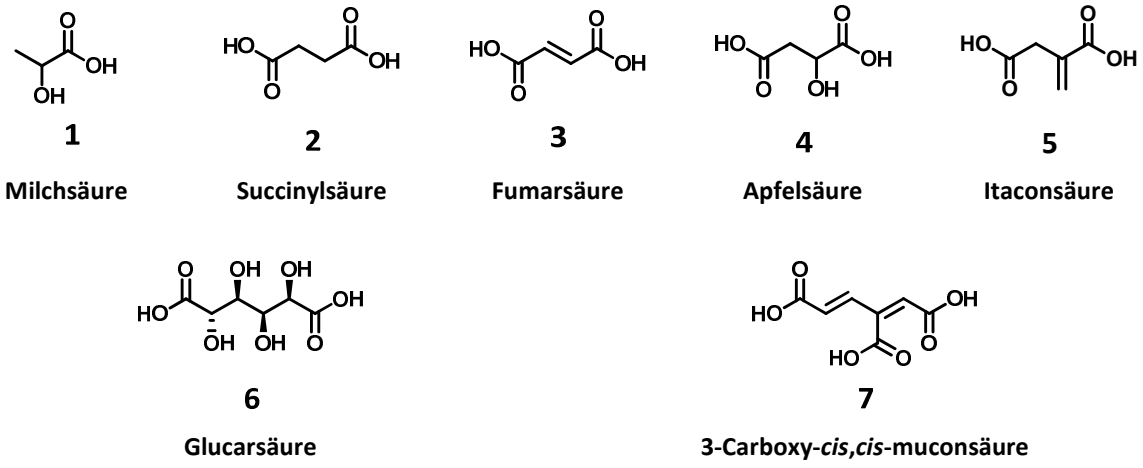


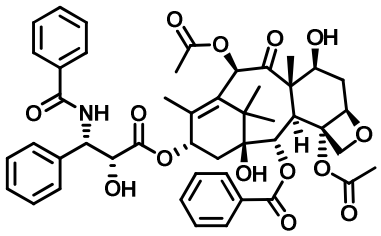
Abbildung 1: Beispiele für mikrobiologisch produzierte organische Säuren.[7]

Die Produktionsverfahren wurden dafür in den letzten Jahren stets weiterentwickelt. Succinylsäure etwa konnte mit Titern von 146 g/L, einer Produktivität von 3,20 g/L/h und einer Ausbeute von 0,9 g Produkt / g Zelltrockenmasse in *Corynebacterium glutamicum* produziert werden.[8] Ähnliches gilt auch für Diamine wie 1,4-Diaminobutan (Putrescin) und 1,5-Diaminopentan (Cadaverin), welche mit Titern von ca. 25 g/L bzw. 103 g/L hergestellt werden konnten.[9,10] Andere Beispiel stellen Polymere dar, wie Polyhydroxyalkanoate (PHA) und Polymilchsäuren (PLA von *polylactic acids*). Letztere konnten mit bis zu 11 % PLA Homopolymer pro Gramm Zelltrockenmasse produziert werden.[11] Die massenhafte Produktion wird besonders am Beispiel der Aminosäuren deutlich, welche unter anderem durch Fermentation von *Corynebacterium glutamicum* hergestellt werden. Dabei wurden bereits 2,5 Mio. Tonnen L-Glutamat pro Jahr hergestellt mit einem berichteten Titer von 120 g/L und Produktivität von 5 g/L/h. Zusätzlich wurden 1,5 Mio. Tonnen L-Lysin pro Jahr gewonnen, wobei Titer von 120 g/L und Produktivität von 4 g/L/h erzielt werden konnten.[12-14]

1.2 Biotechnologische Relevanz von *S. cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ist einer der meist verwendeten Produktionsorganismen der Biotechnologie.[15] Als ein Hauptanwendungsgebiet ist die Herstellung von Bioethanol und Biodiesel auf Basis von Raps- und Sojabohnenöl mit Produktionsvolumen von 84,6 Mrd. Liter bzw. 19,0 Mrd. Liter (2011) zu nennen. Hauptsächliche Verwendung finden diese Produkte als Kraftstoffzusätze. Somit konnten bereits 2,7% der globalen Transport-Energie durch nachhaltige Produktionsverfahren erzeugt werden.[16] Dies verdeutlicht nicht nur den ökologischen Aspekt, sondern zeigt auch das Potenzial der Biotechnologie als alternative Produktionsmethode für Treibstoffe. Diese sind notwendig, da das weltweit geförderte Rohöl als Quelle für essentiell Synthesebausteine der Chemie und Pharmaindustrie gilt, und dennoch zu 57 % (Stand 2017) nur zur Produktion von Treibstoffen verwendet wird.[16]

Die weltweite Produktion von Bioethanol findet dabei überwiegend in den USA (62 %; 52,7 Mrd. Liter) und Brasilien (25 %; 21,1 Mrd. Liter) statt. Als Grundlage dient dafür in den USA hauptsächlich Getreide und in Brasilien Zuckerrohr. Aufgrund dessen werden diese Herstellungsprozesse auch als *first generation bioethanol* bezeichnet. Dabei werden jedoch potenzielle Nahrungsressourcen für die Treibstoffproduktion verwendet. In Anbetracht einer wachsenden Weltbevölkerung und dem damit einhergehenden Nahrungsmittelbedarf sieht sich diese Methode allerdings einer wachsenden Kritik ausgesetzt.[17] Um dem entgegenzutreten wird jedoch schon an einem weiteren Herstellungsprozess, dem *second generation bioethanol* geforscht. Dieser greift auf Lignocellulose als Rohstoff zurück und könnte damit überschüssiges Pflanzenmaterial nutzbar machen, welches bei der Landwirtschaft massenhaft anfällt.[18,19] Neben der Ethanol- und Biodieselproduktion konnte durch weitere gentechnische Modifikationen von *S. cerevisiae* auch die Produktion von fortschrittlicheren Biokraftstoffen erreicht werden.[20] Dazu zählen 1-Butanol,[21]Isobutanol,[22–24] Farnesene,[25,26] Bisabolene,[27] Fettsäureethylester (Biodiesel).[28] Diese bergen als alternative Treibstoffe einige Vorteile gegenüber Ethanol wie beispielsweise eine höhere Oktanzahl, eine höhere Energiedichte oder eine verringerte Hygroskopie.[23]



8

Abbildung 2: Taxol (Paclitaxel)

Akademische Studien habe gezeigt, dass neben den Treibstoffen auch hochpreisige Pharmaprodukte mittels *S. cerevisiae* hergestellt werden können.[5] Eine Übersicht der niedermolekularen Produkte mit pharmazeutischem Hintergrund sind in Tabelle 2 dargestellt. Darunter findet sich beispielsweise Taxadien-5a-acetoxy-10b-ol, eine Vorstufe des bedeutenden Zytostatikums Paclitaxel (**8**, Taxol), welches besonders zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird.[5,29] Die Herstellungsmengen in *S. cerevisiae* Kulturen sind für industrielle Anwendungen allerdings noch zu gering. Dagegen stellt die Verwendung von pflanzlichen Eiben-Zellkulturen (*Taxus brevifolia*) zur Gewinnung von Paclitaxel eine bereits etablierte biotechnologische Produktion im großtechnischen Maßstab dar.[30] In *S. cerevisiae* wurden bereits ein Virostatikum, ein Antiparasitikum, ein Antihypertonikum und diverse Antibiotika erfolgreich hergestellt.

Tabelle 2: Herstellung von niedermolekulare Medikamenten oder deren Vorstufen in S. cerevisiae. Einträge entnommen aus Lee et al.[5]

Wirkstoff / Vorstufe	**Anwendung**	**Referenz**
Magnoflorin	Antibiotikum	Minami *et al.* (2008) [31]
(*S*)-Scoulerin	Antibiotikum	Minami *et al.* (2008) [31]
Valencen	Krebsmedikament	Asadollahi *et al.* (2008) [32]
Cubebol	Virostatikum	Asadollahi *et al.* (2008) [32]
Patchoulol	Antimikrobiotikum	Asadollahi *et al.* (2008) [32]
Artemisininsäure (Vorstufe von Artemisinin)	Vorstufe Antiparasitikum (Malaria)	Ro *et al.* (2006) [33]
Taxadien-5a-acetoxy-10b-ol (Vorstufe von Taxol)	Vorstufe Krebsmedikament	Dejong *et al.* (2006) [34]
Nicotianamin (sic!)	Herz-Kreislauf-Medikament: Antihypertonikum	Wada *et al.* (2006) [35]

Ein Beispiel von industrieller Bedeutung ist Artemisinin, ein Anti-Malaria Medikament, welches semisynthetisch hergestellt werden kann. Dabei kann Artemisininsäure fermentativ in Hefen wie *S. cerevisiae* hergestellt werden.[33] Anschließend erfolgt eine oxidative Zyklisierung, wobei der benötigte Singulett-Sauerstoff photochemisch[36] oder metallkatalytisch[37] gewonnen werden kann. Eine erste Pilotanlage zur großtechnischen Produktion nach diesem Verfahren wurde bereits 2013 von der Firma Sanofi geplant und soll die Bereitstellung von bis zu 100 t kristalliner Artemisininsäure pro Jahr als Rohstoff des Anti-Malaria Medikaments erlauben.[38]

Neben niedermolekularen Verbindungen werden in *S. cerevisiae* besonders eukaryotische Proteine und Peptide für den pharmazeutischen Markt hergestellt. Eine Zusammenfassung über die in der europäischen Union zugelassenen gentechnisch hergestellten Arzneimittel, welche mit Hilfe von *S. cerevisiae* produziert werden, findet sich in Tabelle 3. Dabei bildet die Behandlung von Diabetes das größte Anwendungsspektrum, wofür Peptidhormone und ein Fusionsprotein hergestellt werden. Des Weiteren beilhalten diverse Impfstoffe gegen Hepatitis A, Hepatitis B und humane Papillom-Viren rekombinante Proteine, welche heterolog in *S. cerevisiae* produziert werden. Außerdem können Peptidhormone und Gerinnungsfaktoren zur Behandlung von genetisch bedingten Wachstumsstörungen und Bluterkrankheiten gewonnen werden.

Tabelle 3: In der Europäischen Union zugelassene gentechnische Arzneimittel, biotechnologisch hergestellt mittels S. cerevisiae.[39]

Wirkstoff / Vorstufe	**Anwendung**	**Firma**	**Typ**
Albiglutid	Diabetes	GlaxoSmithKline	Fusionsprotein
Insulin human	Diabetes	Novo Nordisk	Peptidhormon
Isulin Aspart	Diabetes	Novo Nordisk	Peptidhormon
Insulin degludec	Diabetes	Novo Nordisk	Peptidhormon
Insulin detemir	Diabetes	Novo Nordisk	Peptidhormon
Liraglutid	Diabetes	Novo Nordisk	verzweigtes Peptid
Glucagon	Diabetes	Novo Nordisk	Peptidhormon
Impfstoff Hepatitis A/B	Hepatitis A/B Prävention	GlaxoSmithKline Sanofi Pasteur MSD MCM Vaccine	Proteine
Impfstoff humane Papillom-Viren (HPV)	HPV-Infektionen Prävention	MSD Sharp & Dohme Sanofi Pasteur MSD Chiesi Farmaceutici	Proteine
Somatropin	genetisch bedingte Wachstumsstörung	BioPartners	Peptidhormon
Catridecacog	genetisch bedingte Bluterkrankung	Novo Nordisk	Gerinnungsfaktor-Protein

Die weitere Stammentwicklung mittels *metabolic engineering* hat zudem gezeigt, dass *S. cerevisiae* ebenfalls geeignet ist, neben pharmazeutisch relevanten Produkten eine Vielzahl weiterer Chemikalien zu produzieren. Eine Auswahl ist in Tabelle 4 dargestellt. Diese umfassen ein breites Spektrum an Substanzklassen, das unter anderem kleine Amino- bzw. Hydroxysäuren, Fettsäuren, Zucker(-Alkohole), Terpene, Polyphenole und polyzyklische Verbindungen beinhaltet.

Tabelle 4: Beispiele von fermentativ produzierten Chemikalien in S. cerevisiae. Einträge entnommen aus Hong und Nielsen 2012.[40]

Chemikalie	**Referenz**
1,2 Propandiol	Lee und Da Silva (2006)[41]
D-Ribose	Toivari *et al.* (2010)[42]
Ribitol	Toivari *et al.* (2010)[42]
L-Milchsäure	Zhao *et al.* (2011)[43]
Pyruvat	Maris *et al.* (2004)[44]
Succinylsäure	Raab *et al.* (2010)[45]
beta-Amyrin	Madsen *et al.* (2011)[46]
beta-Carotin	Verwaal *et al.* (2007)[47]
Amorpha-4,11-dien	Westfall *et al.* (2012)[48]
Casbene	Kirby *et al.* (2010)[49]
Zimtsäure-Anthranilsäureamid	Eudes *et al.* (2011)[50]
Eicosapentaensäure	Tavares *et al.* (2011)[51]
Geranylgeraniol	Millis *et al.* (2003)[52]
Ascorbinsäure	Sauer *et al.* (2004)[53]
Linalool	Rico *et al.* (2010)[54]
Methylmalonyl-CoA	Mutka *et al.* (2006)[55]
Resveratrol	Becker *et al.* (2003)[56]
Vanillin	Brochado *et al.* (2010)[57]
Methylselenocystein	Mapelli *et al.* (2011)[58]

Die Vorstellung dieser vielfältigen Anwendungen macht die Bedeutung von *S. cerevisiae* für die Biotechnologie deutlich. Eine Vielzahl von chemischen Erzeugnissen wird bereits heute mit diesem Organismus produziert, wobei zahlreiche wissenschaftliche Publikationen das Potential zur Erweiterung der Produktpalette bereits aufzeigen. Aus diesem Grund wurde *Saccharomyces cerevisiae* als Zielorganismus für die Entwicklung neuartiger biochemischer Werkzeuge zur optischen Regulation von genetischen Aktivitäten ausgewählt.

1.3 Potential optisch-regulierter Expressionssysteme

Expressionssysteme sind wesentliche Bestandteile rekombinanter Mikroorganismen der modernen Biotechnologie und ermöglichen die gezielte Regulation bestimmter Genaktivitäten. Die meisten häufig verwendeten Expressionssysteme scheinen in ihrer Komplexität jedoch recht eingeschränkt zu sein. Sie zeichnen sich meist durch eine hohe Robustheit aus, da sie durch wenige Faktoren beeinträchtigt werden. Dadurch reduziert sich ihre Anfälligkeit gegen störende Einflüsse und die Reproduzierbarkeit der Genexpression wird gesteigert. Als Beispiele für prokaryotische Expressionselemente sind zum einen der synthetische *tac*-Promotor,[59] das *pBAD* [60,61] System und das *pET*-System (Merck, USA) zu nennen. Zum anderen die etablierten Expressionssysteme *Tet-ON/OFF,*[5,14] *GAL4-ER-VP16,*[62] sowie die Promotoren *pGAL1* [63–65] und *pADH2* [66,67] für eukaryotische Zellen. Die Robustheit dieser Expressionssysteme bedeutet meist jedoch auch eine sehr geringe Flexibilität. Die Aktivität von Genen kann je nach ausgewähltem System lediglich einmalig ein- oder ausgeschaltet werden. Die reversible oder gar multiple Steuerung der Genexpression ist mit solchen Systemen daher äußerst eingeschränkt bis unmöglich. Auch die Regulation der Expressionsstärke ist bei den meisten Expressionssystemen nicht möglich. Zudem erfolgt die Regulation der Genexpression meist über die „manuelle“ Zugabe von Induktoren, wodurch die Sterilität und die Regulationsfrequenz aufgrund von mechanischen Operationen eingeschränkt werden.

Der Bedarf von flexibleren Expressionssystemen ist jedoch vielfach gegeben und bezieht sich neben der klassischen Biotechnologie auch im Besonderen auf die Bereiche der funktionellen Genomik (*functional genomics*), der synthetischen Biologie (*synthetic biology*) und der Metabolismusoptimierung (*metabolic engineering*).[68–71] Die flexible Regulation und Dosierung der Genexpression könnte zu einem bei Produktionsverfahren konkret genutzt werden, beispielsweise zur Koordinierung der Enzymaktivitäten bei *in vivo* Enzymkaskaden, zur Regulation der Wachstumsraten bei Co-Kultivierungen unterschiedlicher Mikroorganismen, oder zur Optimierung der Expression von toxischen oder langsam faltenden Proteinen. Zum anderen ist ein forschungsbasierter Einsatz zur Aufklärung von zellulären Regulationsnetzwerken möglich, um Wirkbeziehung von zellulären Regulatoren und deren Schwellenwert besser zu verstehen. Daraus gewonnene Erkenntnisse könnten wiederum produktionstechnisch angewendet werden. Beispielweise wäre eine variable, an die jeweilige Produktionssituation angepasste, Optimierung des Metabolitflusses (*metabolic*

flux) in mikrobiellen Produktionsstämmen möglich. Darüber hinaus könnten die gewonnenen Einsichten in intrazelluläre Regulationen die Entwicklung neuer artifizieller Regulationsnetzwerke vorantreiben, welche für die synthetische Biologie von größtem Interesse sind.

Die Optogenetik stellt dabei eine äußerst vielversprechende Technologie dar, um dieses Ziel zu erreichen. Dies wurde bereits durch die Entwicklung einiger lichtregulierter Regulationssysteme demonstriert. Ein *caged*-Tetracyclin Derivat wurde in Säugetierzellen verwendet, um eine automatisierte Regulation der Genexpression zu gewährlisten. Mit diesem Werkzeug wurden oszillierende Expressionsstärken ermöglicht, um unterschiedliche, annähernd konstante, Expressionslevel einzustellen.[72] Des Weiteren wurde ein lichtsensitiver Transkriptionsfaktor in *S. cerevisiae* angewendet, um durch unterschiedliche Lichtfarben (rot und infrarot) die Genexpression reversibel ein- bzw. auszuschalten.[73]

Die Optogenetik ist für die flexible Regulation und Dosierung der Genexpression besonders vielversprechend, da sie einige Vorteile bietet. Ein hohes Maß an Flexibilität und Komplexität führt zwangsläufig zu einer großen Anzahl von regulatorischen Schritten. Anders ausgedrückt, je häufiger die Genexpression einer Kultivierung angepasst werden soll, desto häufiger muss auf die Kultivierung eingewirkt werden. Dies beinhaltet bei klassischen Expressionssystemen eine wiederholte mechanische Zugabe von Effektor-Substanzen, was zu deutlichen Nachteilen führen kann. Licht als Regulator ermöglicht hingegen die nichtinvasive Steuerung in strikt geschlossenen Kultivierungssystemen ohne mechanische Beeinflussung. Dadurch kann einerseits eine optimale Sterilität und strikte Kontrolle der Atmosphäre gewährleistet werden, wodurch selbst komplexe Fermentationen unter fest definierten Gasbedingungen durchgeführt werden könnten. Zum anderen ermöglicht es eine streng kontinuierliche Durchmischung, welche für eine homogene Gas-, Konzentrations- und Temperaturverteilung von besonderer Bedeutung ist.

1.4 *Caged compounds*

Die optische Regulation von zellulären Funktionen entwickelte sich in den letzten Jahrzehnten immer mehr zum Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung. Dies führte zur Etablierung des Begriffs „Optogenetik“ als zusammenfassende Oberbezeichnung. Ein Teilgebiet dieser Forschung stellt die Regulation von genetischen Expressionssystemen dar.

Bei lichtregulierten Expressionssystemen spielen insbesondere *caged compounds* als lichtsenstive Verbindungen eine wichtige Rolle. *Caged compounds* sind maßgeschneiderte chemische Verbindungen, deren biologische Aktivität mithilfe von Licht kontrolliert werden kann. Meistens handelt es sich dabei um Effektormoleküle, deren biologische Aktivität durch chemische Modifizierung maskiert wird (s. Abbildung 3). Bildlich gesprochen befindet sich der Effektor also in einem Käfig (*cage*) und kann keine Reaktion auslösen. Die Bestrahlung mit Licht führt dann in der Regel zur Freisetzung des ursprünglichen Effektormoleküls, wodurch es seine biologische Aktivität zurückgewinnt.[74]

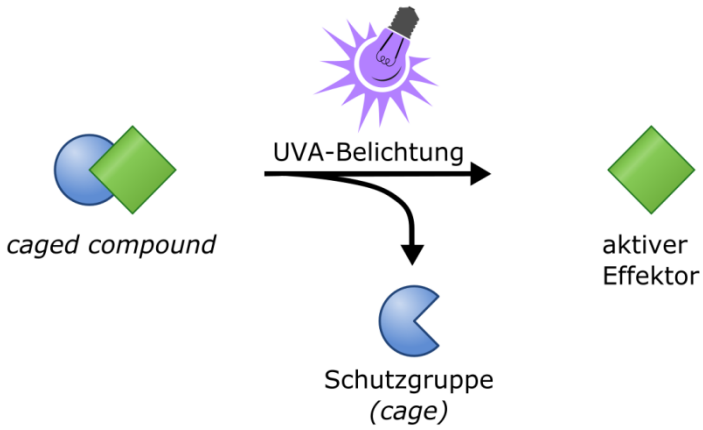


Abbildung 3:Allgemeines Schema zur Funktionsweise von caged compounds.

Der Begriff „*caged*“ ist dabei jedoch leicht irreführend, da das Effektormolekül in den meisten Fällen nicht tatsächlichen in eine andere Verbindung eingeschlossen wird. Obwohl diese Vorgehensweise prinzipiell möglich ist,[75,76] besteht die Maskierung des Effektors meisten aus einer simplen kovalenten Verknüpfung zu einer photolabilen Schutzgruppe. Diese strukturelle Veränderung ist häufig ausreichend, um eine Erkennung durch den zellulären Sensor (in der Regel ein Protein) zu verhindern. Die Bestrahlung bewirkt dann eine photolytische Abspaltung der Schutzgruppe, wodurch der Effektor freigesetzt wird. Erste Arbeiten zu diesem Prinzip wurden von Kaplan *et al.* (1978) durchgeführt. Dabei verwendeten sie ein *caged*-Adenosintriphosphat (**9**), um durch die photolytische Freisetzung

von Adenosintriphosphat (**10**) (ATP) (Abbildung 4, A) Erkenntnisse über die mechanistischen Abläufe der Na/K-Pumpe zu erlangen. Als Nebenprodukt wird Nitroso-Verbindung **11** gebildet, für das in den verwendetetn Konzentrationen keine toxischen Effekte nachgeiwesen werden konnte.[77]

Eine alternative Strategie wird bei der photosensitiven Maskierung von Metallionen verwendet und ist in Abbildung 4, B dargestellt. Dabei kommen klassische Chelatoren wie EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) zur Anwendung. Diese bilden mehrere koordinative Bindungen zu Metallionen aus und erzeugen dadurch, wie bei Verbindung **12** gezeigt, stabile Komplexe, was zur Maskierung der Metallionen führt. Zur photochemischen Regulation wird das Rückgrat des Chelators an einer bestimmten Stelle mit einer photosensitiven Gruppe versehen. Dadurch kommt es bei der Bestrahlung nicht zur Abspaltung der photosensitiven Gruppe, sondern zur Spaltung des gesamten Chelatormoleküls, wodurch die Metallionen freigesetzt werden. Beim gezeigten Beispiel **12** in Abbildung 8 kommt durch die Spaltung des EDTA-Rückgrates zur Bildung der Nitroso-Verbindung **13** und Immimodiessigsäure (**14**). Nähere mechanistische Erläuterungen dazu sind in Kapitel 2.2.3 zu finden.

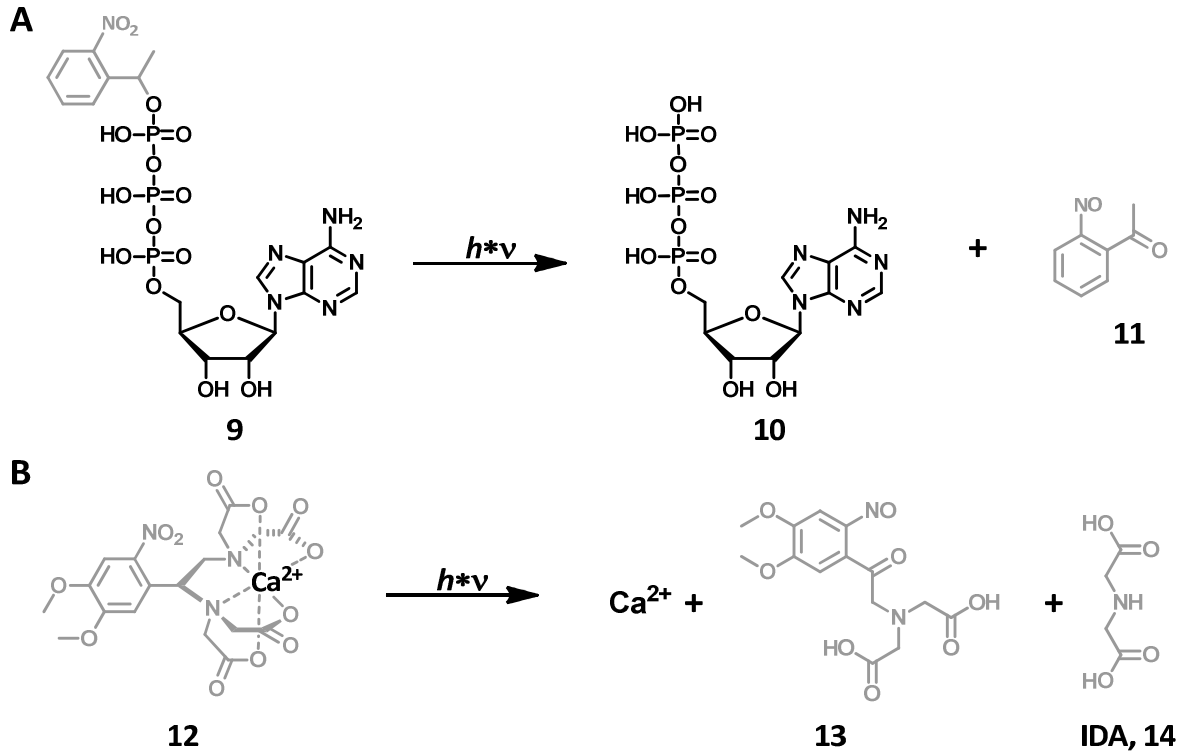


Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung von caged compounds zur Veranschaulichung der Maskierungsstrategien. (A) Maskierung des ATP durch kovalente Bindung an eine photolabile Schutzgruppe (Nitrophenyl-Gruppe, grau) und Abspaltung der Schutzgruppe durch Bestrahlung.[77] (B) Maskierung von Ca^{2+}-Ionen durch Koordination mit der Chelatoruntereinheit des DM-Nitrophens (EDTA, grau). Bestrahlung bewirkt die Spaltung des Chelatormoleküls, wodurch die Ca^{2+}-Ionen freigesetzt werden.[78–80]

Besonders zu erwähnen sind in diesem Bezug die Arbeiten von Kaplan *et al.* und Ellis-Davies.[78,79] Sie entwickelten auf EDTA bzw. EGTA [Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N*,*N*,*N*,*N*-tetraessigsäure] basierende photosensitive Chelatoren zur Komplexierung von Calcium- und Magnesiumionen wie beispielsweise 1-(2-Nitro-4,5-dimethoxyphenyl)-1,2-diaminoethane-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetraessigsäure (**12**), das unter dem Handelsnamen DM-Nitrophen vertrieben wird.[78,79] Mit Hilfe dieser Verbindungen konnten zahlreiche Studien zur Untersuchung der synaptischen Signaltransduktion unternommen werden.[81]

Die Erfahrungen der letzten Jahrzehnte mit DM-Nitrophen und anderen *caged compounds* haben einige Anforderungen aufgezeigt, damit diese erfolgreich eingesetzt werden können. Zunächst einmal sollten die Verbindungen unter den verwendeten Bedingungen stabil sein, um eine unkontrollierte Freisetzung des Effektors zu vermeiden. Dabei sind einerseits physiologische Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Salzkonzentrationen zu beachten. Andererseits sind auch enzymatische Reaktionen denkbar, welche zur frühzeitigen Spaltung oder Modifikation der *caged compound* Verbindung führen kann. Daher ist die Anwendbarkeit in jedem Organismus spezifisch zu testen. Eine ausreichende Löslichkeit der *caged compounds* in wässrigen Bedingungen des gewünschten pH-Wertes sollte ebenfalls vorhanden sein. Dabei wirken sich besonders die verwendeten photosensitiven Gruppen aus. Diese bestehen meist aus (poly)zyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und besitzen daher oft eine geringe Hydrophilie, was die Löslichkeit der ursprünglichen Effektoren stark herabsetzen kann.

Die optischen Eigenschaften sind der nächste wichtige Aspekt. Die photolytische Freisetzung des Effektors sollte bei einer biologisch vertretbaren Wellenlänge (UVA, >315 nm) möglich sein. Dennoch können bei der Photolyse der *caged compounds* diverse Photoprodukte entstehen. Daher sollte der Einfluss der UVA-Bestrahlung untersucht werden, da neben der direkten Bestrahlung auch die Photoprodukte einen toxischen Effekt aufweisen können. Zusätzlich sollte die photolytische Effektorfreisetzung möglichst schnell und vollständig erfolgen, um Photoschädigungen zu minimieren und kurze Regulationsschritte zu ermöglichen. Dazu ist eine möglichst hohe Absorption bei der gewünschten Wellenlänge von Vorteil, was durch einen hohen Extinktionskoeffizienten ε ausgedrückt wird. Dieser sollte jedoch zudem einhergehen mit einer möglichst großen Quantenausbeute ϕ, was bedeutet, dass ein hoher Anteil des absorbierten Lichtes auch

tatsächlich zur einer photolytischen Spaltung führt.[82,83] Nähere Informationen zur Bestimmung dieser optischen Eigenschaften sind im Kapitel 5.4.1 und 5.5.1 enthalten.

1.5 Genregulation mittels *caged compounds*

Die Entwicklung und biologischen Anwendung von *caged compounds* wurde in den letzten zehn Jahren in diversen Übersichtsartikeln beschrieben.[84–89] Besonders umfangreich sind dabei die Ausführungen von Mayer und Heckel (2006)[89,90] sowie Brieke *et al.* (2012).[82,83] Die *caging*-Strategie wurde sowohl für kleine Molekülen, als auch für höhermolekulare Verbindungen wie Proteine, Peptide und Nukleotide angewendet. Deren Anwendungen ermöglichte es in den vergangenen Jahrzenten, ein breites Spektrum von biologischen Funktionen zu untersuchen. Dazu zählen unter anderem neuronale Prozesse, Signaltransduktionswege, hormonelle Funktionen, (De-)Aktivierung von Proteinen, Peptiden, Oligonucleotiden und Aptameren sowie Proteinsplicing.[83] Auch zur Regulation der Genexpression wurden diese photolabil geschützten Makromoleküle verwendet*et*.[91]

Die Etablierung von *caged compounds* zur lichtvermittelten Regulation der Genexpression beruht auf der Verwendung von spezifischen Expressionssystemen, welche durch die Zugabe von kleinen Effektormolekülen reguliert werden können. Dabei kommt es zu einer spezifischen Bindung der Effektoren durch zelluläre Biosensoren. Diese regulieren anschießend die Expression von spezifischen Genen durch direkte Interaktion mit der Promotor-DNA oder durch Aktivierung einer zwischengeschalteten Regulationskaskade. Einige lichtregulierte Expressionssysteme wurden bereits erfolgreich in der Literatur beschrieben und sind in Tabelle 5 aufgelistet. Sie werden im Folgenden näher erläutert, wobei sich die Einteilung anhand der Stoffklassen der *caged compound* orientiert.

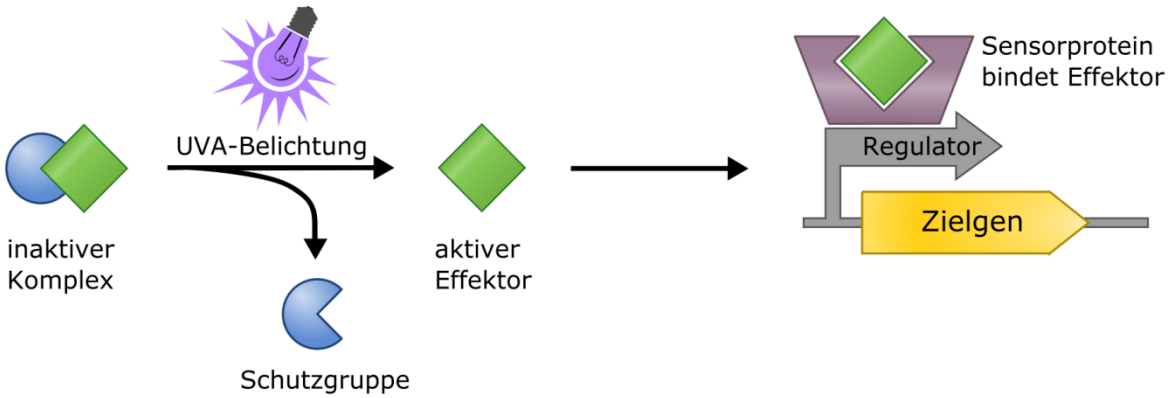


Abbildung 5: Allgemeines Schema zur lichtvermittelten Regulation der Genexpression mittels caged compounds. Modifiziert nach Kusen et al.[92]

Tabelle 5:Bereits publizierte caged compounds zur Anwendung der lichtregulierten Genexpression.

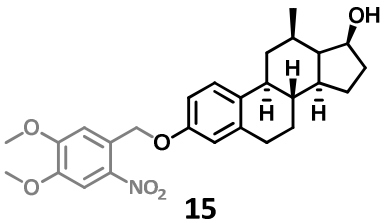
Caged compound	**Effektor**	**Expressions-system**	**Wirtszellen**	**Ref.**
NV-Estradiol	Estradiol	ER-HRE	HEK293T Zellen	[93]
NPEOC -Estradiol	Estradiol	ER-HRE	*Arabidopsis thaliana* Wurzel	[94]
NPEOC -Dexamethason	Dexamethason	ER-HRE	*Arabidopsis thaliana* Wurzel	[94]
NV-β-Ecdyson	β-Ecdyson	EcR-RXR-EcREs	HEK293T Zellen	[95]
NV-4-Hydroxytamoxifen	4-Hydroxytamoxifen	ER-HRE	HeLa Zellen	[96]
NVOC-Guanidin-Tamoxifen	Guanidin-Tamoxifen	ER-HRE	HeLa Zellen	[96]
DMNPE-Doxycyclin	Doxycyclin	Tet-ON	CHO Zellen, Maus, *Xenopus laevis*-Kaulquappen	[97,98]
NVOC-Doxycyclin	Doxycyclin	Tet-ON	3T3 Zellen	[99]
NV-RAR-Antagonist	RAR/Antagonist	DR4-HRE	HeLa Zellen	[100]
NV-TR-Antagonist	TR/Antagonist	DR4-HRE	HeLa Zellen	[100]
ONB-Toyocamycin	Toyocamycin	*Hammerhead-Riboswitch*	HEK293T Zellen	[101]
NPPOC-GlcN6P	GlcN6P	glmS-*Riboswitch*	Retikulozyten-Lysat	[102]
NPip-IPTG	IPTG	Lac-Operator p7lac/LacI	*E. coli*, *C. glutamicum*	[103–106]
NPip- Glukose	Glukose	pT7lac/LacI	*E. coli*	[106]
NPip-Galaktose	Galaktose	pT7lac/LacI	*E. coli*	[106]
NPip-Arabinose NPipMe-Arabinose	Arabinose	pBAD/AraC	*E. coli*	[106]
NPip-Rhamnose NPipMe-Rhamnose	Rhamnose	pRhaBAD/RhaRS	*E. coli*	[106]
Bhc-Anisomycin NV-Anisomycin	Anisomycin	Inhibierung des Ribosoms	HEK293, Hippocampus-Neuronen (*Rattus*)	[107]

3T3 Zellen: Standard Fibroblasten-Zelllinie
Bhc: 6-Bromo-7-hydroxy-4-(hydoxymethyl) coumarin
CHO: *Chinese Hamster Ovary*
DMNPE: 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl
HEK293T Zellen: *human embryonic kidney*-Zellen, menschliche embryonale Nierenzellen
HeLa Zellen: (Henrietta Lacks) menschliche Zervixkarzinom-Epithelzelllinie
NPEOC: 1(2-Nitrophenyl)ethyloxycarbonyl
NPip-IPTG: Nitropiperonyl-Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
NPipMe: 1-(Nitropiperonyl)ethyl
NPPOC-GlcN6P: 1-(Nitropropyl)ethyloxycarbonyl-glukosamin-6-phoshat
NV: Nitroveratryl
NVOC: Nitroveratryloxycarbonyl
ONB: Ortho-nitrobenzyl

Eine große Gruppe von publizierten *caged compounds* zur Regulation der Genexpression lässt sich den Hormonen, also den biochemischen Botenstoffen, zuordnen und ist in Abbildung 6 dargestellt. Diese Verbindungen wurden ausschließlich in Zellkulturen, Pflanzen- und Säugetieren angewendet. Die Expressionssysteme sind dabei alle ähnlich aufgebaut. Sie bestehen aus einem entsprechenden Hormon-Rezeptor, der nach Bindung des Hormons als Transkriptionsaktivator dient. Er bindet die DNA an einem sogenannten *hormone response element* (HRE), einer spezifischen Sequenz des Promotors, und aktiviert damit die Transkription der nachgeschalteten Gene.

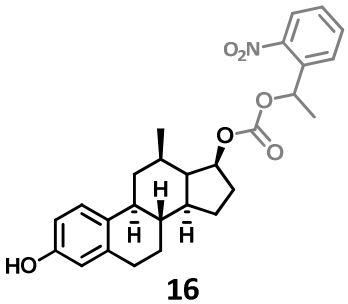
Die Gruppe der Hormone lässt sich weiter untergliedern und beginnt im Folgenden mit den sogenannten Steroiden. Das erste beschriebene System basierte auf einem Nitroveratryl-Estradiol-Ether (NV-Estradiol, **15**). Mit dessen Hilfe gelang es Cruz *et al.* bereits im Jahr 2000, die Genexpression in menschlichen HEK293 Zelllinien durch Belichtung zu aktivieren.[93] Dabei wurde die Expression eines Luciferase-Reportergens reguliert, das unter der Kontrolle einer entsprechenden *Estrogen receptor - hormone response element* Kombination (ER-HRE) stand. Das System wurde später durch Hayashi *et al.* auf die Expression des Luciferasegens in *Arabidopsis thaliana* übertragen und weiterentwickelt.[94] Im Zuge dessen wurde 1(2-Nitrophenyl)ethyloxycarbonyl-Estradiol-Ether (NPEOC-Estradiol, **16**) als alternatives *caged*-Estradiol etabliert.

Dies bedeutet eine Verlagerung der photolabilen Schutzgruppe vom 3-OH auf das 17-OH des Steroids. Durch Einsatz von NPEOC-Estradiol (**16**) konnte die Expression mittels *caged compounds* räumlich begrenzt werden. Das Luciferase-Reportergen wurde demnach nur in dem belichteten Teilabschnitt der *Arabidopsis thaliana* Wurzel exprimiert. Durch Verwendung eines ähnlichen Steroids gelang es zudem, eine Anwendung über die Expression eines Reportergens hinaus zu demonstrieren. Dabei ermöglichte die Verwendung von 1(2-Nitrophenyl)ethyloxycarbonyl-dexamethason (NPEOC–Dexamethason, **17**) in Kombination mit einer gerichteten Belichtung, das Wachstum der Wurzelhaare von *Arabidopsis thaliana* auf einen kleinen Bereich zu begrenzen. Eine noch bessere räumliche Auflösung der lichtvermittelten Genexpression wurde durch Lin *et al.* unter der Verwendung eines *caged*-Ecdyson Derivats beschrieben.[95] Hierbei konnte mit Hilfe von Nitroveratryl-β-Ecdyson-Ether (NV-β-Ecdyson-Ether, **18**) die Genexpression in einer menschlichen HEK293T Zellkultur auf einen Bereich von 0,25 mm² eingegrenzt werden.



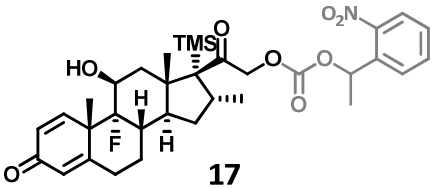
15

NV-Estradiol-Ether[93]



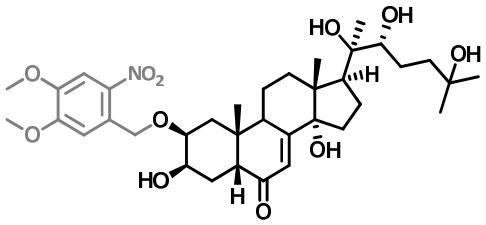
16

NPEOC-Estradiol[94]



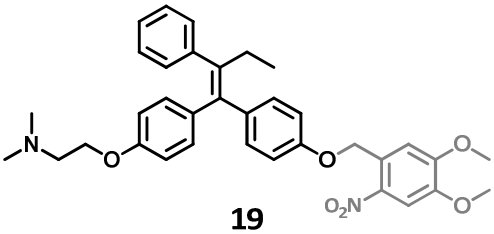
17

NPEOC-Dexamethason[94]



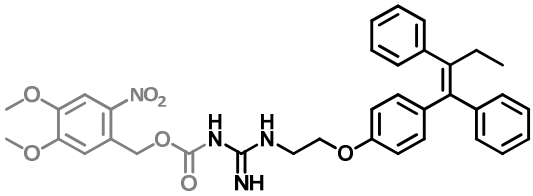
18

NV-β-Ecdyson[95]



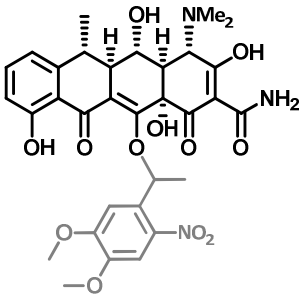
19

NV-4-Hydroxytamoxifen[96]



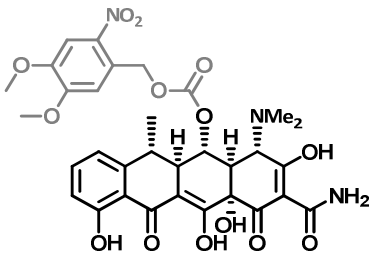
20

NVOC-Guanidin-Tamoxifen[96]



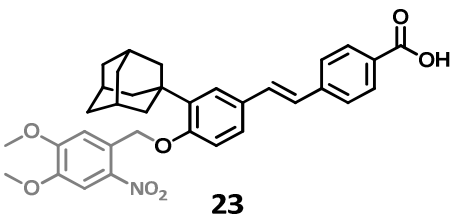
21

DMNPE-Doxycyclin[97,98]



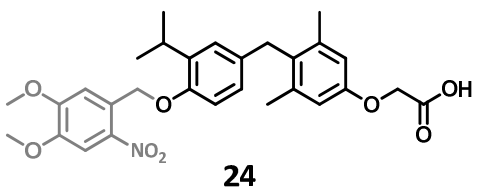
22

NVOC-Doxycyclin[99]



23

NV-RAR-Antagonist[100]



24

NV-TR-Antagonist[100]

Abbildung 6: Hormon-basierte caged compounds (photolabile Schutzgruppe grau markiert) zur lichtvermittelten Regulation der Genexpression in Zellkulturen, Pflanzen- und Säugetieren.

Neben den Steroiden konnten auch andere Hormone erfolgreich eingesetzt werden, wie beispielsweise photolabil geschützte Derivate von Tamoxifen. Dieser Estrogenrezeptor-modulator (SERM von s*elective estrogen receptor modulator*) wurde zur Therapie von Brustkrebs entwickelt, kann jedoch ebenfalls zur Aktivierung von anderen Hormon-Rezeptoren eingesetzt werden. Shi und Koh gelang es unter Verwendung von Nitroveratryl-4-Hydroxytamoxifen-Ether (NV-4-Hydroxytamoxifen, **19**) die Genexpression eines Luciferase-Reportergens in HeLa Zellkulturen mittels Belichtung zu induzieren.[96] Eine Optimierung der *caged compounds* führte zur Entwicklung von Nitroveratryloxycarbonyl-Guanidin-Tamoxifen (NVOC-Guanidin-Tamoxifen, **20**) mit einer höheren Induktionsstärke. Dazu wurde die tertiäre Aminogruppe gegen eine Guanidin-Gruppe ausgetauscht, um die Basizität nach der Photolyse zu erhöhen. Dadurch konnte die Diffusion des Effektors aus den Zellen vermutlich verringert werden, was zu einer stärkeren Expression der Luciferase-Reportergens führte.

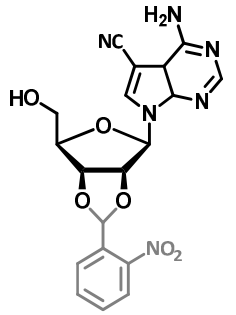
Eine weitere Gruppe von Hormonen, welche zur lichtvermittelten Regulation der Genexpression eingesetzt wurden, sind Tetracycline. Sie wurden in Kombination mit dem Tet-ON System, einem der weitverbreitetsten induzierbaren Expressionssystem der eukaryotischen Zellbiologie, eingesetzt.[108] Die Anwendung von 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl-Doxycyclin-Ether (DMNPE-Doxycyclin, **21**) ermöglichte es, die Expression von Fluoreszenz-Reporterproteinen in CHO Zelllinien, in Maus-Embryonen und -Hippocampus-Querschnitten sowie *Xenopus laevis*-Kaulquappen mittels UVA-Bestrahlung gezielt zu induzieren. Dabei konnte eine Aktivierung der Genexpression mit einer räumlichen Auflösung auf Einzelzellebene erreicht werden.[97,98] Dazu wurde eine als Zweiphotonenaktivierung bezeichnete Methode angewendet. Dabei wird die Probe mit gebündeltem Licht, dessen Energie bei einfacher Bestrahlung zu gering ist um eine Photospaltung zu bewirken, aus zwei unterschiedlichen Richtungen bestrahlt. Am Kreuzungspunkt der beiden Lichtstahlen ensteht allerding ein sehr kleines Volumen in dem die nötige Energie zur Photospaltung des DMNPE-Doxycyclin (**21)** durch das gleichzeitige Auftreffen von zwei Photonen erreicht werden kann.

Weiterentwickelt werden konnte dies durch Sauers *et al.* unter Verwendung eines ähnlichen Expressionssystems. Sie synthetisierten Nitroveratryloxycarbonyl-Doxycycline (NVOC-Doxycyclin, **22**), wobei die photolabile Schutzgruppe im Gegensatz zu DMNPE-Doxycyclin nicht am 12-OH, sondern am 5-OH lokalisiert wurde. Sie verwendeten dies, um die Produktion von Ephrin A5 in 3T3 Zelllinien mittels lichtvermittelter Genexpression zu

regulieren. Dadurch war es möglich, die Adhäsion von EphA7 Rezeptor-exprimierenden HEK293T Zellen mittels Bestrahlung örtlich zu regulieren.[99]

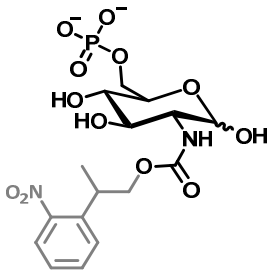
Das letzte Beispiel aus der Gruppe der Hormone ist das HRE-System (*hormone response element*) in Kombination mit einem Retinsäurerezeptor (RAR) und einem Schilddrüsenrezeptor (TR, *thyroid receptor*). In einer Studie von Link *et al.* wurden dazu bekannte Liganden von RAR und TR mit photolabilen Schutzgruppen versehen, um eine lichtvermittelte Induktion der Genexpression zu ermöglichen.[100] Dies modifizierten Ligangen **23** und **24** wurde genutzt, um die Dauer der Genexpression eines Luciferase-Reportergens in HeLa Zellen nach Induktion zu untersuchen. Dabei konnte eine aktive Genexpression beim TR-System bis zu 35 h, beim RAR-System aber nur bis zu 5 h nach Ligandenfreisetzung beobachtet werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Dauer der Expressionsantwort von HRE-Expressionssystemen nicht nur von der Diffusion des Liganden aus der Zelle abhängt. Stattdessen müssen noch andere Faktoren wie beispielweise die Stabilität der Liganden-induzierten Transkription eine Rolle spielen.

Neben den Hormonrezeptor-HRE Systemen wurden *Riboswitch*-kontrollierte Expressionssysteme beschrieben, welche die Genexpression mittels Bestrahlung von *caged compounds* ermöglichen. *Riboswitches* sind kleine strukturbildende Segmente der mRNA, welche niedermolekulare Verbindungen mit einer sehr hohen Spezifität binden, wodurch die Proteinproduktion beeinflusst wird. In einer Studie von Young *et al.* wurde ein Toyocamycin-spezifischer *Hammerhead-Riboswitch* verwendet.[101] Dieser bewirkt nach Bindung des Antagonisten eine autokatalytische Spaltung der mRNA, wodurch die 5'CAP-Struktur entfernt wird. Infolgedessen wird die gesamte mRNA abgebaut, was ihre Translation verhindert. Der *Hammerhead-Riboswitch* wurde in das Gen und damit auch in die mRNA eines Fluoreszenz-Reporterproteins integriert. Anschießend konnte dessen Translation mit Hilfe eines photolabil geschützten ortho-Nitrobenzyl-Toyocamycin (**25**, Abbildung 7) in einer HEK293T Zellkultur durch gerichtete Belichtung lokal gehemmt werden. Eine ähnliche Strategie verfolgten Wulffen *et al.* unter Verwendung des glmS-*Riboswitches* und eines Nitropropylethyl-geschützten Glukosamin-6-Phosphates (NPPOC-GlcN6P, **26**, Abbildung 7).[102] Die Hemmung der Translation nach Bindung des photolytisch freigesetzten Glukosamin-6-Phosphates durch den *Riboswitch* konnte erfolgreich demonstriert werden, allerdings ausschließlich in Zelllysaten, was vermutlich auf eine geringe Zellpermeabilität des NPPOC-GlcN6P zurückzuführen ist.



25

ONB-Toyocamycin[101]

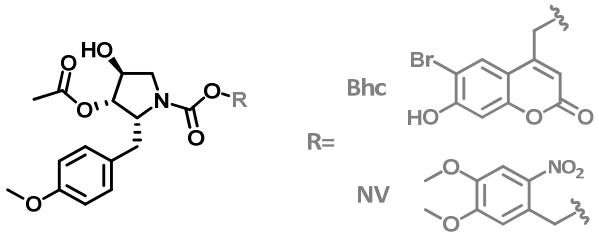


26

NPPOC-GlcN6P[102]

Abbildung 7: Caged compounds (photolabile Schutzgruppe grau markiert) zur lichtvermittelten Regulation der Genexpression mittels Riboswitches.

Ein weniger selektiver Ansatz zur optischen Regulation der Genexpression mittels *caged compounds* wurde von Goard *et al.* beschrieben.[107] Dabei setzten sie zwei unterschiedliche Varianten eines photolabil geschützten Anisomycin (**Bhc-27**, **NV-27**) ein, welche in Abbildung 8 dargestellt sind. Anisomycin ist ein von *Streptomyces griseolus* produziertes Antibiotikum, das die allgemeine Proteinbiosynthese in Eukaryoten inhibiert.[109] Dazu blockiert es die Translation der mRNA, indem es die Peptidyltransferase-Aktivität des 80S Ribosoms hemmt. Eine selektive Repression eines spezifischen Expressionssystems konnte somit nicht realisiert werden. Allerdings konnte mit Hilfe von Bhc-Anisomycin (**Bhc-27**) und NV-Anisomycin (**NV-27**) die Proteinbiosynthese in HEK293 Zelllinien und in Hippocampus-Neuronen der Ratte erfolgreich durch Bestrahlung unterdrückt werden. Hierbei konnte eine räumliche Auflösung erreicht werden, die es erlaubte, die neuronale Proteinbiosynthese in einem Bereich zu inhibieren, ohne dabei anderen Neuronen mit einem Abstand von ca. 200 - 500 µM zu beeinflussen.



Bhc-27
NV-27

Bhc-Anisomycin bzw. NV-Anisomycin[107]

Abbildung 8: Caged compounds zur lichtvermittelten Inhibierung der eukaryotischen Proteinbiosynthese mittels Hemmung des Ribosoms (photolabile Schutzgruppe grau markiert).

Neben den Hormonen stellen die Saccharide eine größere Gruppe von Verbindungen dar, welche zur lichtvermittelten Regulation der Genexpression eingesetzt wurden. Eine Übersicht über die einzelnen *caged compounds* ist in Abbildung 9 dargestellt. Innerhalb der Saccharide stellt Nitropiperonyl-Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (NPip-IPTG, **28**) dabei die meist verwendete Verbindung aus dieser Gruppe dar. Erstmals etabliert wurde es von Young und Deiters im Jahr 2007 unter Verwendung des Lac-Operators zur Expressionsregulation.[103] Dieser beruht auf der Repression des Lac-Promotors durch einen entsprechenden Lac-Repressor, welcher in Anwesenheit von Laktose oder dessen stoffwechselresistenten IPTG-Analogon aufgehoben wird. Die Studie konnte zeigen, dass mittels NPip-IPTG die Genexpression eines Fluoreszenz-Reportergens in *E. coli* durch UVA-Bestrahlung induziert werden konnte.

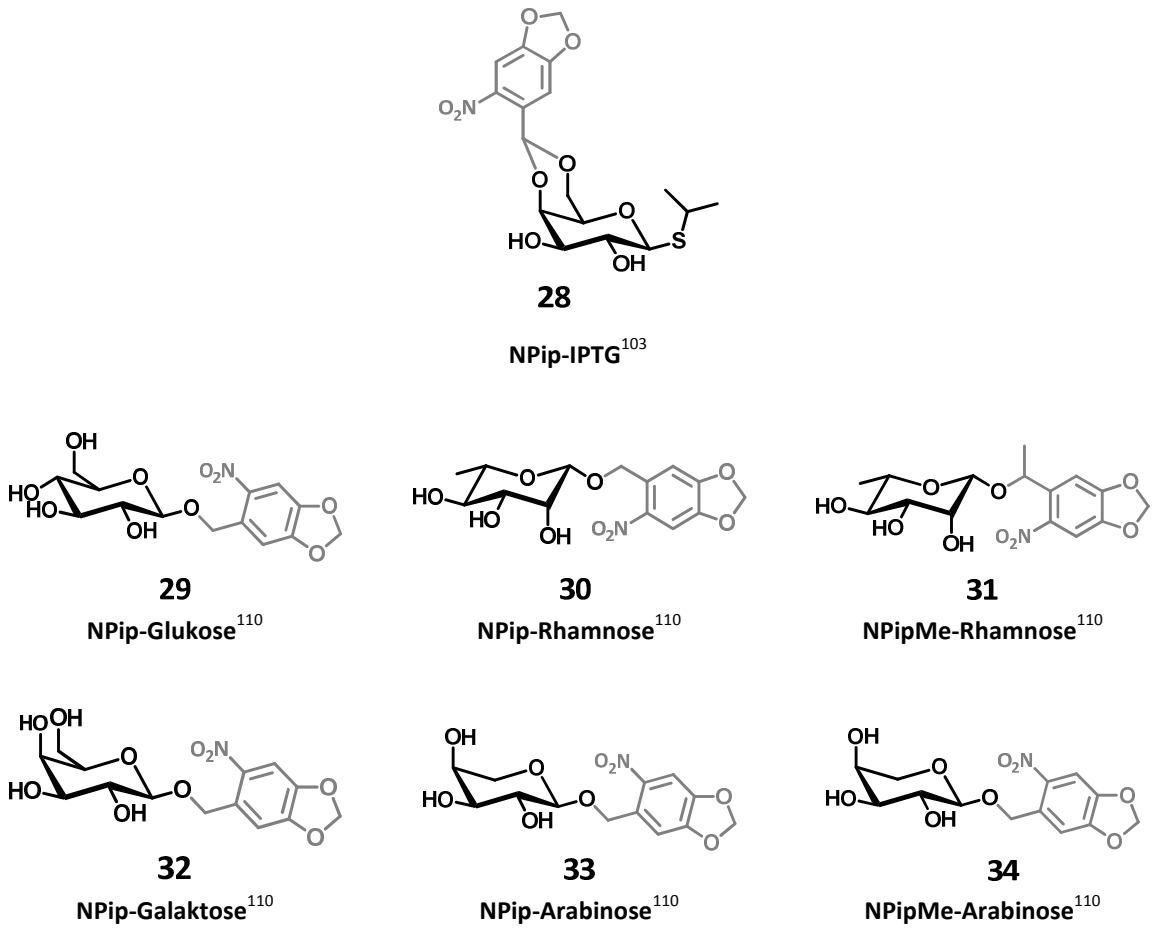


Abbildung 9: Saccharid-basierte caged compounds (photolabile Schutzgruppe grau markiert) zur lichtvermittelten Regulation der Genexpression.

Binder *et al.* konnten später durch Einsatz eines optimierten *E. coli* Stammes eine graduelle Regulation der Expressionsstärke über die Belichtungsdauer und -Intensität mit Hilfe dieses optischen Expressionssystems erzielen.[104] Des Weiteren konnte eine Verbesserung der Homogenität bezüglich der Genexpression unter der Anwendung von NPip-IPTG mit Hilfe von mikrofluidischen Einzelzell-Experimenten demonstriert werden. In einer anderen Studie von Wandrey *et al.* konnten die Vorteile einer optischen Regulation der Genexpression mittel NPip-IPTG bei der Etablierung eines optischen Hochdurchsatzverfahrens am Beispiel eines Fluoreszenz-Reporters dargelegt werden.[105] Dabei wurde ein *Screening* System zum effizienten *Profiling* von Expressionsparametern wie Induktionszeitpunkt und –stärke erstellt. Dieses soll eine kostengünstigere und einfachere Automatisierung und Parallelisierung ermöglichen, wobei die Kontaminationsgefahr gleichzeitig durch eine nicht-invasive Induktion gesenkt werden kann.

In einer weiteren Studie konnten Binder *et al.* die Anwendung des NPip-IPTG über ein beispielhaftes Reporterprotein hinaus weiterentwickeln.[106] Dabei wurde die bakteriellen Produktion eines Aromastoffes am Beispiel des (+)-Valencen optimiert. Dazu wurde die Expression eines artifiziellen Biosyntheseweges aus insgesamt vier Genen (zwei homologe, zwei heterologe) über die *caged*-IPTG vermittelte Lichtregulation in Bezug auf Induktionszeitpunkt und -stärke untersucht.

Die Verwendung von weiteren Sacchariden wurde kürzlich von Bier *et al.* beschrieben.[106] Dabei konnten die Saccharide Glukose, Galaktose, Arabinose, Rhamnose und Laktose erfolgreich mit den photolabilen Schutzgruppen NPip bzw. NPipMe versehen werden. Biologische Untersuchungen in *E. coli* konnten eine erfolgreiche lichtvermittelte Genexpression unter Verwendung der *caged compounds* NPip-Rhamnose (**30**), NPipMe-Rhamnose (**31**), NPip-Galaktose (**32**), NPip-Arabinose (**33**), NPipMe-Arabinose (**34**), demonstrieren. Dabei zeigten NPip-Arabinose, NPipMe-Arabinose und NPip-Galaktose sogar eine etwas stärkere Induktion als die gleiche Menge an nicht-modifiziertem Effektor. Darüber hinaus blieben diese *caged compounds in vivo* stabil und zeigten im Dunkeln nur eine geringe Basalexpression. NPip-Laktose dagegen zeigte auch im Dunkeln eine deutliche Induktion der Genexpression. Dies weist vermutlich auf eine verringerte Stabilität *in vivo* hin, welche möglicherweise von einer enzymatischen Hydrolyse durch Glykosidasen herrührt. Die Anwendung von NPip-Glukose (**29**) bewirkte eine leichte Reduzierung der Genexpression, hervorgerufen durch die Glukose-vermittelte Katabolitrepression. Allerdings konnte dabei

eine signifikante Verringerung bereits vor Belichtung beobachten werden. In der Studie wurden die Expressionssysteme p7lac/LacI für Glukose, Galaktose und Laktose, pBAD/AraC für Arabinose, sowie pRhaBAD/RhaRS für Rhamnose angewendet.[106]

1.6 Ziele dieser Arbeit

Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung von optogenetischen Methoden, die eine gezielte Regulation der Genexpressionen in *S. cerevisiae* mittels Bestrahlung ermöglichen. Dabei soll eine Strategie untersucht und weiterentwickelt werden, welche auf der Verwendung von modifizierten Effektormolekülen als photosensitive Sensoren basiert.

Die Regulation von Genexpressionen mit Hilfe dieser als *„caged compounds“* bezeichneten Effektormoleküle ist in der Wissenschaft noch vergleichsweise gering verbreitet. Als Grundstruktur der *caged compounds* sollen dabei klassische Effektormoleküle dienen, die zur Regulation von genetischen Expressionssystemen in *S. cerevisiae* eingesetzt werden, wie beispielsweise Galaktose, Kupferionen und Methionin. Eine chemische Modifikation, wie beispielsweise die Verknüpfung von photolabilen Schutzgruppen oder das Komplexieren innerhalb von photosensitiven Chelatoren soll deren biologische Aktivität maskieren. Somit soll eine bestrahlungsfreie Kultivierung der *S. cerevisiae* Expressionssysteme in Anwesenheit dieser *caged compounds* ermöglicht werden, ohne die gewünschte Genexpression ungewollt zu beeinflussen. Eine definierte Bestrahlung der *caged compounds*-haltigen Kultivierung soll anschließend genutzt werden, um die Abspaltung der Schutzgruppen bzw. die Spaltung des Chelators zu bewirken, wodurch die Effektoren freigesetzt und die Genexpression zielgerichtet gesteuert werden soll.

Ein Vorteil dieser Strategie beruht auf der Modifizierbarkeit von zahlreichen Effektormolekülen, wodurch die Adaption von verschiedensten Expressionssystemen möglich ist.[99,103,111] In dieser Arbeit soll die *caged compound* Strategie daher angewendet werden, um die in *S. cerevisiae* häufig angewendeten Promotoren *pGAL1*, *pCUP1* und *pMET17* für die optische Regulation der Genexpression verfügbar zu machen. Dazu sollen zunächst geeignete Expressionskassetten erstellt werden, welche die Expression eines *YFP*-Gens (*Yellow Fluorescent Protein)* unter Kontrolle des jeweiligen Promotors erlaubt.

Nach Transformation in *S. cerevisiae* soll die optische Regulation der Genexpression anhand der Bildung des fluoreszierenden YFP-Proteins charakterisiert werden. Dies soll im Rahmen einer Kooperation (OptoSys, BMBF, FKZ: 031A167A) mit Hilfe eines durch Dr. Georg Wandrey eigens konstruierten Screening-Systems und mittels eines durch Dr. Christopher Probst etablierten mikrofluidischen Kultivierungssystems in enger Zusammenarbeit durchgeführt werden.

Dazu benötigt werden spezifische *caged*-Galaktose, *caged*-Cu^{2+} *caged*-EDTA und *caged*-Methionin Derivate. Die Bereitstellung der *caged* compounds soll im Falle von *caged*-Galaktose durch Dr. Claus Bier im Rahmen der erwähnten Kooperation erfolgen. Für *caged*-Cu^{2+} *caged*-Methionin und *caged*-EDTA sollen einerseits kommerziell erhältliche Derivate genutzt und andererseits literaturbekannte und -unbekannte Verbindung selbständig synthetisiert werden. Bei der Synthese des *caged*-EDTA soll durch den Einsatz von spezifischen photolabilen Schutzgruppen zudem eine optische Kompatibilität mit *caged*-Cu^{2+} erzielt werden. In einem Gemisch beider *caged compounds* soll dadurch eine separate Photolyse durch den Einsatz unterschiedlicher Lichtfarben ermöglicht werden.

Vor dem Einsatz aller *caged compounds* mit den jeweiligen Expressionssystemen sollen diese noch hinsichtlich Photolyse, Stabilität, Toxizität und Maskierung *in vitro* charakterisiert werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Lichtregulation mittels *caged*-Galaktose

2.1.1 *Das pGAL1*-basierte Expressionssystem

Zu Beginn der Arbeiten sollte die lichtregulierte Expressionsregulation mittels *caged compounds* zunächst auf das *pGAL1*-basierte Expressionssystem in *S. cerevisiae* angewendet werden. Dieses Expressionssystem basiert auf dem *pGAL1*-Promotor und stellt neben dem *pADH*-Promotor einen der meist genutzten und stärksten Promotoren in *S. cerevisiae* dar.[66,69] Er bietet eine dauerhafte Regulierbarkeit mittels Galaktose als Effektormolekül und ist im Gegensatz zum ADH-Promotor nicht auf die Expression in der stationären Phase beschränkt.[66]

Der Regulationsmechanismus des *GAL1*-Promotors ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Aktivierung des Promotors wird über den Transkriptionsaktivator Gal4p vermittelt. Dieser besteht aus zwei funktionellen Domänen. Die DNA-Bindedomäne sorgt für die spezifische Anlagerung an den *GAL1*-Promotor (*pGAL1*). Die Polymerase-Bindedomäne dagegen besitzt eine hohe Affinität zur Polymerase und dirigiert diese zur kodierenden DNA, wodurch die Transkription eingeleitet wird.[112–115] Unter Galaktose-Mangelbedingungen wird die Genexpression der *pGAL1*-kontrollierten Gene durch das Repressorprotein Gal80p reprimiert. Dazu bindet dieses an den Transkriptionsaktivator Gal4p und macht dadurch die Polymerase-Bindedomäne unzugänglich. In Anwesenheit von Galaktose sorgt das Regulatorprotein Gal3p jedoch für eine Derepression des Promotors und eine Aktivierung der *GAL1*-Promotor-kontrollierten Genexpression. Dazu bindet Gal3p an den Repressor Gal80p. Dies bewirkt die Ausbildung eines DNA-ständigen Gal4p-Gal80p-Gal3p Komplexes, welcher daraufhin eine Konformationsänderung durchläuft. Dadurch wird die Polymerase-Bindedomäne zugänglich, was zur Transkription der *GAL1*-Promotor-kontrollierten Gene führt.[116] Zusätzlich muss noch erwähnt werden, dass das *pGAL1*-basierte Expressionssystem einer übergeordneten Regulation durch die sogenannte Katabolitrepression unterliegt. Diese bewirkt bei Anwesenheit von Glukose eine vollständige Repression des *GAL1*-Promotors, welche durch Zugabe von Galaktose nicht aufgehoben werden kann.[117,118]

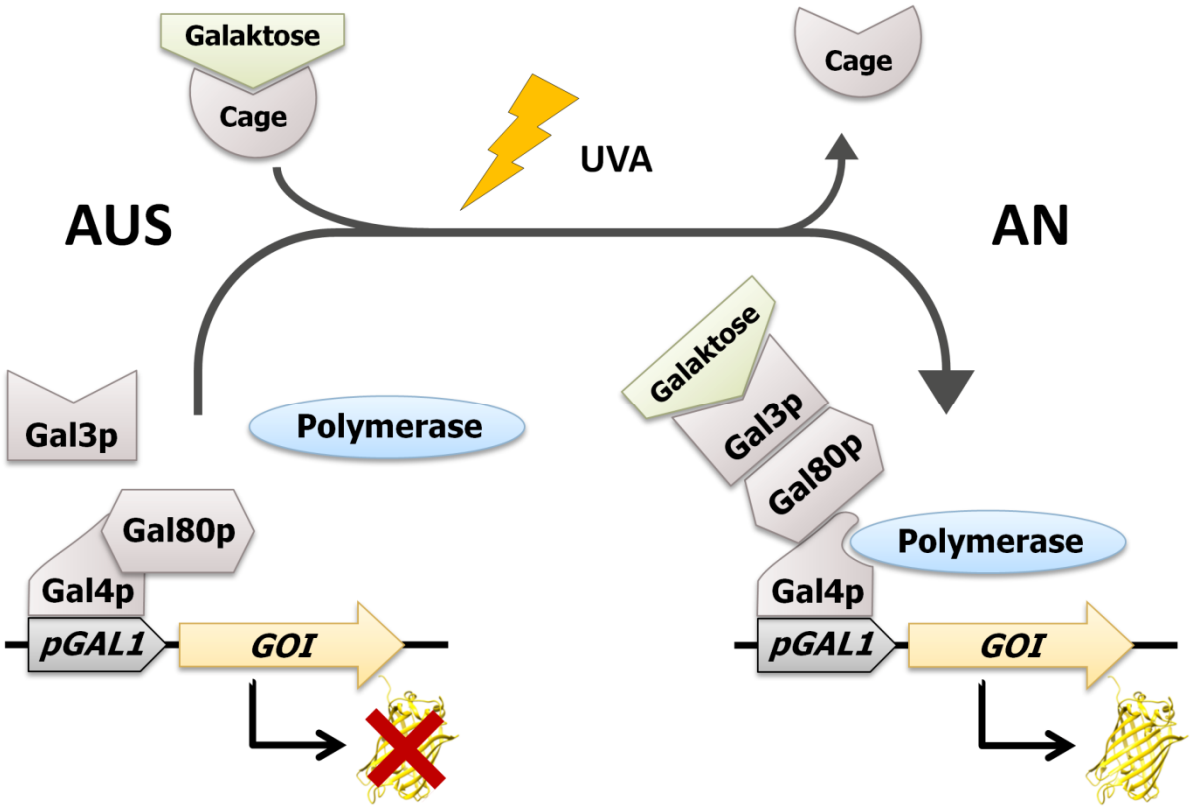


Abbildung 10: Regulation des GAL-Expressionssystems in S. cerevisiae mittels caged-Galaktose. Die Expression der GAL1-Promotor-kontrollierten Gene wird durch den Repressor Gal80p unterdrückt. Bestrahlung mit UVA-Licht bewirkt die Abspaltung der Schutzgruppe (cage). Die dadurch freigewordene Galaktose aktiviert den Regulator Gal3p, welcher nun den Repressor Gal80p bindet und eine Konformationsänderung des Gal3p-Gal80p-Gal4p-Komplexes bewirkt. Die Polymerase-Bindestelle wird dadurch zugänglich und die Transkription des GAL1-Promotor-kontrollierten Gens (GOI von gene of interest) wird aktiviert.[112–116] *Modifiziert nach Kusen.*[119]

Wie in Abbildung 10 verdeutlicht, soll der Wechsel zwischen Mangel- und Überschussbedingungen durch die photolytische Spaltung einer *caged compound* bewirkt werden. Dabei soll die Bestrahlung einer entsprechenden Verbindung die Abspaltung einer photolabilen Schutzgruppe bewirken, wodurch Galaktose freigesetzt wird. Nähere Erläuterungen dazu folgen im Kapitel 2.1.3.

2.1.2 Charakterisierung von *S. cerevisiae -ΔGAL1 -pGAL1-YFP*

Die initialen Arbeiten beschäftigten sich zunächst mit der Konstruktion eines geeigneten Reportersystems, um die Regulation der Genexpression in *S. cerevisiae* quantifizieren zu können. Daher wurde zunächst ein Reporterplasmid erstellt, mit dessen Hilfe Stärke und Verlauf der Genexpression verfolgt werden konnten. Diese Grundlagen dazu wurden bereits während der vorrangegangen Masterarbeit[119] zu dieser Dissertation erstellt.

Zur Konstruktion des Reporterplasmids wurde das Gen des *Yellow Fluorescence Protein* (YFP) unter die Kontrolle eines *GAL1-Promotors* in einen 2µ-*Shuttle*-Vektor integriert, um das Reporterplasmid pPK*_pGAL1-YFP* zu generieren. Die Aktivierung des *GAL1*-Promotors führte somit zur Bildung des fluoreszierenden YFP-Markerproteins. Der Verlauf der Genexpression konnte somit durch die Quantifizierung der YFP-Bildung anhand von Fluoreszenzmessungen beobachtet werden. Zur Erstellung eines Reporterstammes wurden Zellen des Stammes *S. cerevisiae Y00000* mit dem Reporterplasmid pPK1*_pGAL1-YFP* transformiert. Der daraus resultierende Stamm erhielt in dieser Arbeit die Bezeichnung *S.c.-pGAL1*-YFP.

Im Zuge der vorrangegangenen Masterarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass zur Regulation eines *GAL1*-Promotor-basierten Expressionssystems Galaktosekonzentrationen im millimolaren Bereich mit einer maximalen Induktion bei ca. 50 mM benötigt werden.[119] Die Konzentration des Induktors lag damit jedoch ca. 1000-fach höher als bei bereits beschriebenen *caged-compound*-basierten Expressionssystemen wie etwa *caged*-IPTG oder *caged*-Doxycycline. Diese Systeme benötigen lediglich Induktor-Konzentrationen im mikromolaren Bereich zwischen 25 - 75 µM.[97,120] Im Vergleich zu den beschriebenen *caged*-IPTG oder *caged*-Doxycycline Systemen würde die Regulation des *GAL1*-Promotor-basierten Expressionssystems somit die photolytische Freisetzung einer ca. 1000-fach höheren Effektormolekül-Konzentration benötigen. Dies würde, vorrausgesetzt die Eigenschaften der *caged compounds* (Quantenausbeute, etc.) sind ähnlich, auch einen ca. 1000-fach höheren Lichteintrag vorraussetzten.

Ein möglichst geringer Lichteintrag in die Zellkultivierungen sollte bei der Entwicklung von lichtregulierten Expressionssystemen jedoch angestrebt werden, um eine mögliche strahlungsbedingte Zellschädigung zu vermeiden. Als erster Schritt sollte daher die Sensitivität des Expressionssystems gegenüber dem Galaktose-Induktormolekül durch gezielte genetische Modifikation des Expressionsstammes erhöht werden. Ein Ansatzpunkt stellte dabei die Unterbindung der Galaktose-Metabolisierung dar. Die Metabolosierung von Galaktose wird durch dessen Zugabe (bei gleichzeitiger Abwensenheit von Glukose) in *S. cerevisiae* aktiviert und sorgt dafür, dass die Galaktose-Effektorkonzentration abgebaut wird. Somit nimmt die Stimulation des *GAL1*-Promotors mit der Zeit ab und die Genexpression wird schwächer. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass eine Unterdrückung des Abbaus von Galaktose in einer höheren Sensitivität des *pGAL1*-regulierten

Expressionssystems aufgrund der gleichbleibenden Verfügbarkeit des Induktors Galaktose resultiert.

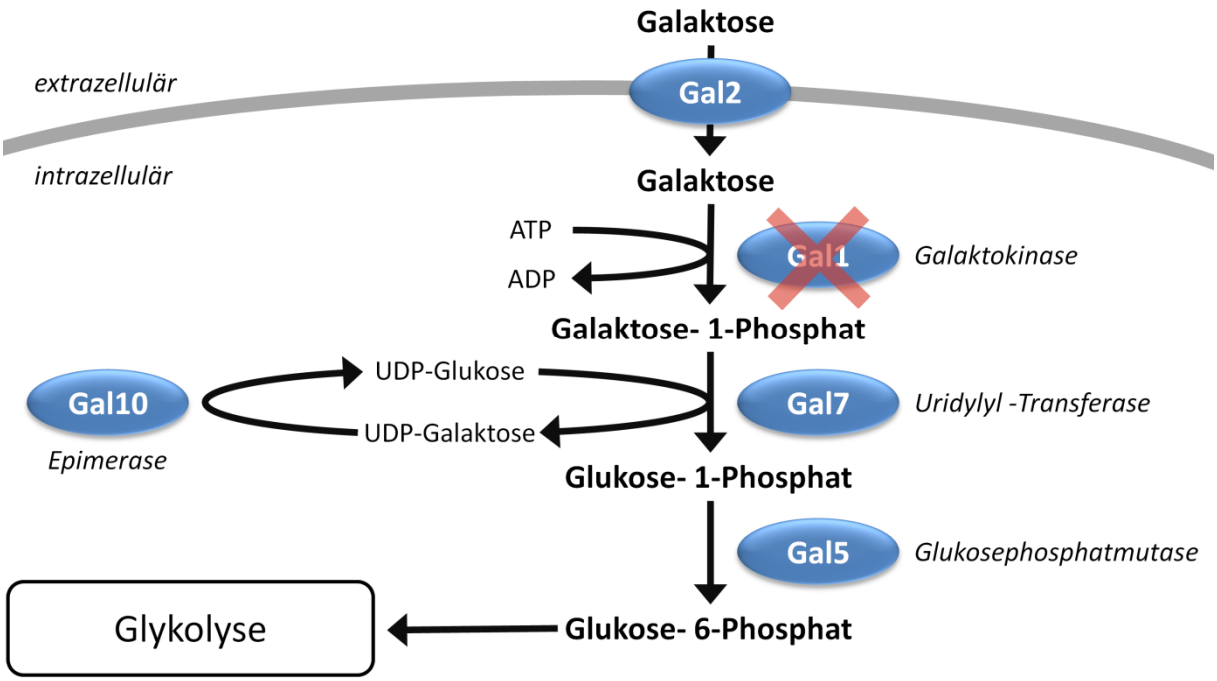


Abbildung 11: Stoffwechselweg und Transport von Galaktose in S. cerevisiae. Die Aufnahme der Galaktose in die Hefezellen erfolgt über den Transporter Gal2p. Intrazellulär wird die Galaktose anschließend durch die Kinase Gal1p phosphoryliert. Dieser initiale Schritt der Metabolisierung wurde in dem Stamm S. cerevisiae Y3157 (Euroscarf) durch die Deletion des GAL1 Gens unterdrückt (rotes Kreuz). Dadurch kann der Abbau der Galaktose in den Hefezellen verhindert werden.[121,122] *Entnommen aus der vorangegangenen Masterarbeit.*[119]

Ausgangspunkt für die Unterdrückung der Galaktose-Metabolisierung war das *GAL*-Expressionssystem aus *S. cerevisiae*, welches im Folgen genauer beleuchtet wird. Dabei handelt es sich um ein Expressionssystem, dass ein Netzwerk von Genen reguliert, welche zur Metabolisierung von Galaktose benötigt werden. Eine Übersicht über die Funktion einiger dieser Genprodukte ist in Abbildung 11 dargestellt. Dabei handelt es sich zum einen um einen Transporter (Gal2p) zur Aufnahme der Galaktose und zum anderen um stoffwechselrelevante Enzyme (Gal1p, Gal7p, Gal5p). Diese dienen zur Umwandlung von Galaktose in Glukose-6-Phosphat, was die Zuführung zur Glykolyse ermöglicht. Der initiale Schritt der Metabolisierung ist die Phosphorylierung der Galaktose durch die Galaktokinase Gal1p. Die Erhöhung der Polarität verhindert die Diffusion über die Zellmembran und aktiviert das Substrat für die nachfolgende Uridylylierung der Galaktose durch das Enzym Gal7p. Diese Umwandlung ermöglicht erst den anschließenden zentralen Schritt, die Epimersierung der Uridylyl-Galaktose (UDP-Galaktose) zu Uridylyl-Glukose (UDP-Glukose) mittels der Epimerase Gal10p. Anschließend erfolgen noch die Übertragung der Uridylyl-

Gruppe (Gal7p) und eine Transposition der Phosphat-Gruppe (Gal5p), um Glukose-6-Phosphat, das Eingangssubstrat der Glykolyse, zu erhalten.[121,122]

Eine Voraussetzung für die Metabolisierung von Galaktose ist also die Phosphorylierung an der 1-Position durch die Galaktokinase Gal1p, da dies für die Substraterkennung der darauffolgenden Enzyme essentiell ist. Eine Deletion des *GAL1* Gens sorgt demnach dafür, dass die *S. cerevisiae* Kulturen die Eigenschaft verlieren, Galaktose als Kohlenstoff-Quelle zu verwenden.[123,124] Daher wurde für weitere Arbeiten der Stamm *S. cerevisiae* Y03157 (Euroscarf) ausgewählt, der eine Deletion des GAL1-Gens aufweist. Dieser wurde mit dem Expressionsplasmid pPK1_*pGAL1-YFP* transformiert, um den Reporterstamm *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* zu erzeugen.

Im Anschluss daran wurden die beiden Reporterstämme *S.c.-pGAL1-YFP* und *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* verglichen, um die Auswirkungen der Deletion des *GAL1*-Gens auf die Stärke und Sensitivität der *GAL1*-Promotor-kontrollierten Genexpression zu untersuchen. Dazu wurden beide Reporterstämme in parallelen Experimenten in galaktosehaltigem [2 % (*w/v*), 111 mM] SC-Medium kultiviert. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde keine Glukose, sondern ein Laktose/Glycerin Gemisch [1,6 / 0,4 % (*w*/*v*)] verwendet, um eine Beeinflussung durch die glukosevermittelte Katabolitrepression auszuschließen. Während der Kultivierung wurde die Stärke der Genexpression anhand des YFP-Fluoreszenzsignals aufgezeichnet. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 12 dargestellt.

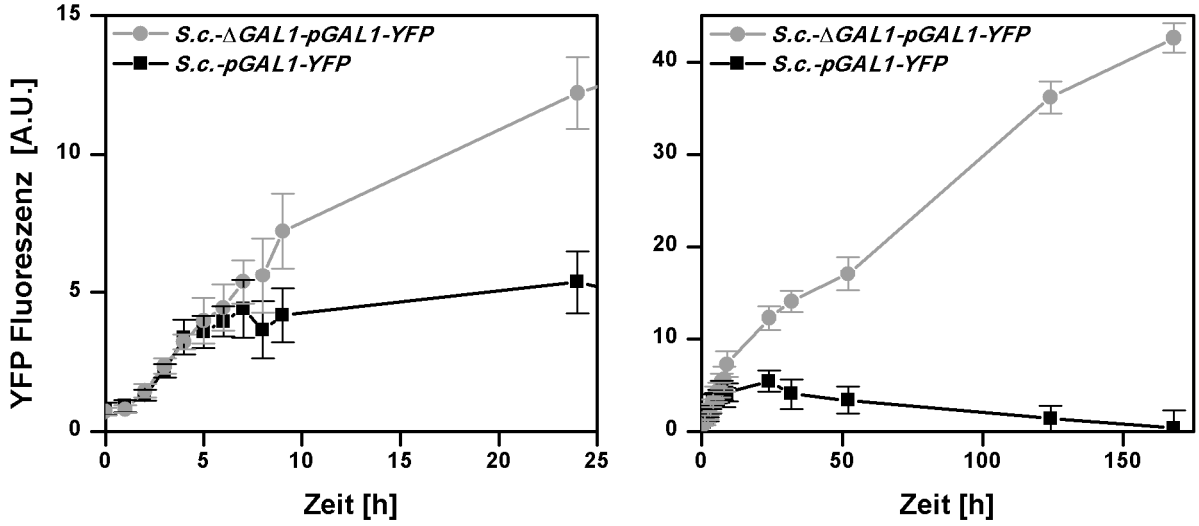


Abbildung 12: Auswirkung der Deletion des GAL1-Gens auf die YFP-Produktion. Kultivierung der beiden Reporterstämme S.c.-pGAL1-YFP und S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP in galaktosehaltigem Medium [2 % (w/v), 111 mM]. Die Linke und die rechte Grafik zeigen denselben Datensatz mit unterschiedlichen Achsenabschnitten. Standardabweichungen ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen.

Der Referenzstamm *S.c.-pGAL1-YFP* ohne Deletion des *GAL1*-Gens zeigt einen steilen Anstieg des YFP-Fluoreszenzsignals zu Beginn der Kultivierung. Nach ca. 8 - 10 h flacht der Anstieg jedoch ab und erreicht sein Maximum bei ca. 25 h. Dies deutet darauf hin, dass der *GAL1*-Promotor zu Beginn der Kultivierung stark aktiviert wird, was zur Bildung von YFP-Protein führt. Gleichzeitig werden jedoch auch die anderen *GAL*-Gene für den Galaktosestoffwechsel aktiviert. Dies führt mit zunehmender Kultivierungszeit wahrscheinlich zu einer Abnahme der Galaktosekonzentration, wodurch die *GAL1*-Promotoraktivierung mit der Zeit abnimmt. Im Vergleich dazu ist beim Reporterstamm *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* mit *GAL1*-Gen-Deletion ein steter Anstieg der YFP-Fluoreszenz zu erkennen. Bis ca. 8 - 10 Stunden ist der Anstieg vergleichbar mit dem des Referenzstamms, zeigt danach jedoch kein Abflachen. Dadurch erreicht der Reporterstamm *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* nach 25 h ein ca. 2,5-mal und nach 50 h ein ca. 11-mal höheres Fluoreszenzsignal als der Referenzstamm *S.c.-pGAL1-YFP*. Dies deutet drauf hin, dass bei dem Reporterstamm *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* eine konstante Produktion von YFP-Protein vorliegt, was eine anhaltende Aktivierung des *GAL1*-Promotors vermuten lässt. Somit konnte gezeigt werden, dass die Deletion des *GAL1*-Gens zu einer dauerhaften Expression und damit zur Verbesserung der Produktionsleistung von *GAL1*-Promotor-kontrollierten Genen führt.

Um darüber hinaus Aufschluss über die Sensitivität der Expressionssysteme zu erhalten wurde im Folgenden die Aktivierung des *GAL1*-Promotors in Abhängigkeit von der Effektorkonzentration untersucht. Dazu wurden die beiden Stämme *S.c.-pGAL1-YFP* und *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* in parallelen Versuchen unter den gleichen Bedingungen wie im vorherigen Versuch, aber mit unterschiedlichen Konzentrationen an Galaktose kultiviert. In Abbildung 13 sind die relativen YFP-Fluoreszenzwerte nach 15 Stunden Kultivierung gegen die eingesetzte Galaktosekonzentration aufgetragen. Die Daten wurden jeweils auf den höchsten Fluoreszenzwert eines Stammes normiert, um die zuvor beschriebenen auf der *GAL1*-Deletion beruhenden Unterschiede in der absoluten Fluoreszenzstärke auszugleichen.

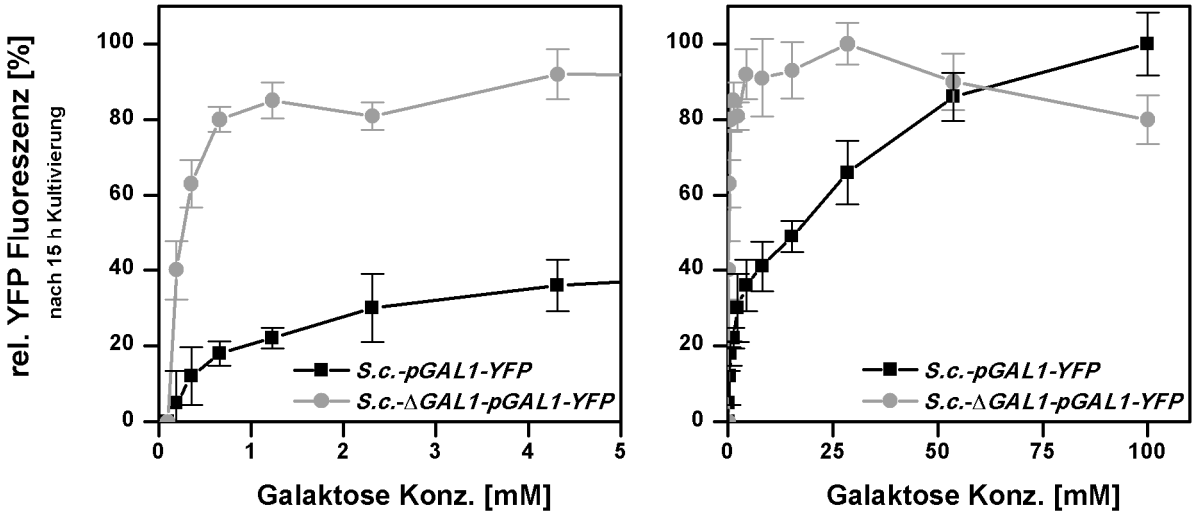


Abbildung 13: Auswirkung der Deletion des GAL1-Gens auf die konzentrationsabhängige Induktion der GAL1-Promotor-kontrollierten Expression von YFP. YFP-Produktion nach 15 h Kultivierung mit unterschiedlichen Galaktosekonzentrationen (0 - 100 mM). Die linke und die rechte Grafik zeigen denselben Datensatz mit unterschiedlichen Abszissenabschnitten. Standardabweichungen ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen.

Beide Stämme zeigen einen graduellen Anstieg der Fluoreszenzwerte. Die Fluoreszenzmaxima werden jedoch bei sehr unterschiedlichen Galaktosekonzentrationen erreicht. Beim Referenzstamm *S.c.-pGAL1-YFP* wird das Maximum bei ca. 100 mM Galaktose erreicht und bei dem Reporterstamm *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* bereits bei ca. 5 mM. Dies zeigt, dass die notwendige Konzentration zur maximalen Induktion der *pGAL1*-kontrollierten Genexpression durch Deletion des GAL1-Gens um das 20-fach gesenkt werden konnte. Somit konnte die anfangs aufgestellte Hypothese einer *ΔGAL1*-bedingten Sensitivitätserhöhung der *GAL1*-Promotor-regulierten Genexpression bestätigt werden. Bei der folgenden optischen Regulation mittels *caged*-Galaktose wurde daher der Reporterstamm *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* verwendet, um die Induktorkonzentration und damit den notwendigen Lichteintrag möglichst gering zu halten.

2.1.3 Charakterisierung und Anwendung von NPip-Gal (*caged*-Gal)

Nachdem die gentechnischen Arbeiten zur Erstellung der Reporterstämme abgeschlossen wurden, lag der Fokus auf der Charakterisierung der photolytischen Freisetzung des entsprechenden Effektormoleküls. Die Genexpression sollte durch die photolytische Freisetzung von Galaktose induziert werden. Dazu sollte ein *caged compound* verwendet werden, das nach Bestrahlung mit UVA-Licht das Effektormolekül Galaktose

freisetzt. Zur Umsetzung dieses Vorhabens sollte 6-Nitropiperonyl β-D-galactopyranosid (NPip-Gal, *caged*-Gal, **35**) verwendet werden. Die Synthese dieses *caged compounds* wurde von Dr. Claus Bier sowohl entwickelt als auch durchgeführt[110] und das erhaltene NPip-Gal für die folgenden Experimente zur Verfügung gestellt.

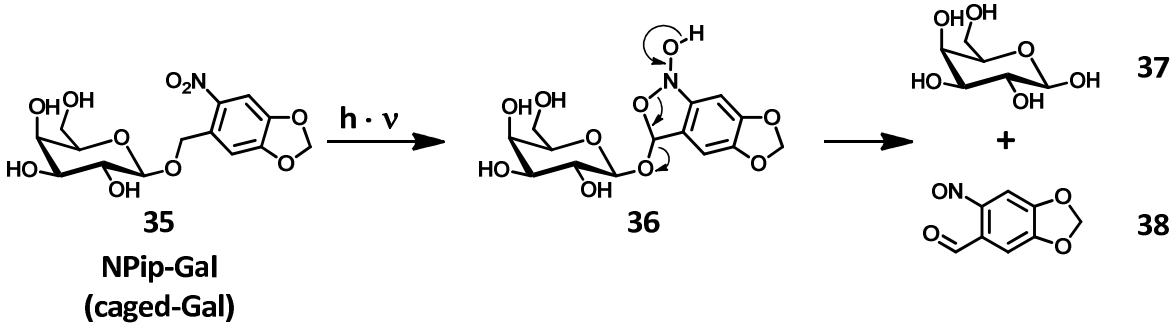


Abbildung 14: Photolytische Spaltung von NPip-Gal (Nitropiperonyl-Galaktose) nach dem allgemeinen Abspaltungsmechanismus von Nitropiperonyl-Schutzgruppen.[125–127]

Eine Molekülstruktur und die Photolyse der Verbindung sind in Abbildung 14 dargestellt. Galaktose (**37**) ist über die anomere Hydroxylgruppe mit der photolabilen Nitropiperonyl-Schutzgruppe verbunden. Eine Bestrahlung mit UVA-Licht bewirkt deren Abspaltung und die Bildung von „freier" Galaktose (**37**) sowie Nitrosopiperonal (**38**).

Der allgemeine Photolyse-Mechanismus von Nitropiperonyl-Verbindungen verläuft vermutlich über eine Isoxazolidin-Zwischenstufe **38**. Diese fünfgliedrige Ringstruktur entsteht nach der photochemischen Anregung durch die Bindungsbildung zwischen einem Nitro-Sauerstoffs auf dem benzylischen Kohlenstoff gebildet. Anschließend erfolgt der Bindungsbruch zwischen dem anomeren Sauerstoff und den benzylischen Kohlenstoff, was zur Freisetzung von Galaktose führt.[125–127] Die zuvor beschriebene Freisetzung von Galaktose sollte nur unter definierten Belichtungsbedingungen stattfinden, um eine Regulation der Genexpression zu ermöglichen. Daher wurde die Stabilität der NPip-Gal in Medium mit und ohne Zellen untersucht. Dazu wurde NPip-Gal in Medium mit und ohne Zellen des Reporterstammes *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* (OD_{600}= 2) gelöst und die Konzentration mittels HPLC Messungen über 3 Tage lang verfolgt. Abbildung 15 zeigt, dass die Konzentration über die gesamte Dauer konstant blieb. Daher kann davon ausgegangen werden, dass NPip-Gal bei einer Kultivierung mit *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* Zellen (unter Ausschluss von UVA-Belichtung) stabil vorliegt. Eine ungewollte Freisetzung ohne UVA-Belichtung scheint daher unwahrscheinlich.

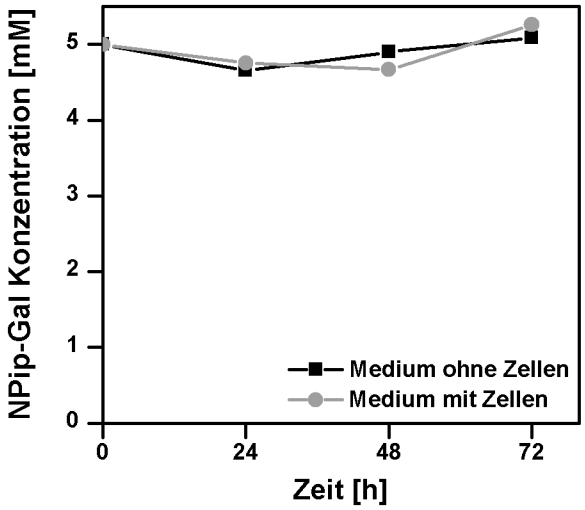


Abbildung 15: Stabilitätsuntersuchung von 6-Nitropiperonyl ß-D-Galactopyranosid (NPip-Gal) unter Kultivierungsbedingungen im BioLector. NPip-Gal-Konzentration nach Inkubation (30 °C) in SC-Medium mit Zellen des Reporterstammes S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP (grau) bzw. ohne (schwarz). Bestimmung der NPip-Gal-Konzentration über 72 Stunden mittels HPLC. Startkonzentration 5 mM NPip-Gal und 2 % (w/v) DMSO als Löslichkeitsvermittler.

Bei den Stabilitätsmessungen zeigte sich bereits eine schlechte Löslichkeit des NPip-Gal in Wasser. Daher wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) als Löslichkeitsvermittler eingesetzt. DMSO ist ein wasserlösliches, organisches Lösungsmittel, das die Löslichkeit von unpolaren Substanzen in Wasser verbessern kann. Es ist in geringen Konzentrationen biokompatibel, weist jedoch bei höheren Konzentrationen eine gewisse Toxizität gegenüber Mikroorganismen auf. Für *S. cerevisiae* ist beim Einsatz von DMSO dabei insbesondere eine Wasserstoffperoxid-vermittelte Zellschädigung durch oxidativen Stress beschrieben.[128,129]

Aufgrund dessen wurde die toxische Wirkung des DMSOs auf den Reporterstamm *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* untersucht. Dazu wurden Kultivierungen des *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* Reporterstammes mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen [0 - 20 % (*w*/*v*)] im BioLector *Setup* durchgeführt, wobei die Entwicklung der Zelldichte aufgezeichnet wurde. Anschließend wurden die Wachstumsraten durch die Zunahmen der Zelldichte über die Kultivierungszeit ermittelt. Zur Auswertung der Ergebnisse sind in Abbildung 16 die Wachstumsraten gegen die DMSO-Konzentrationen aufgezeichnet.

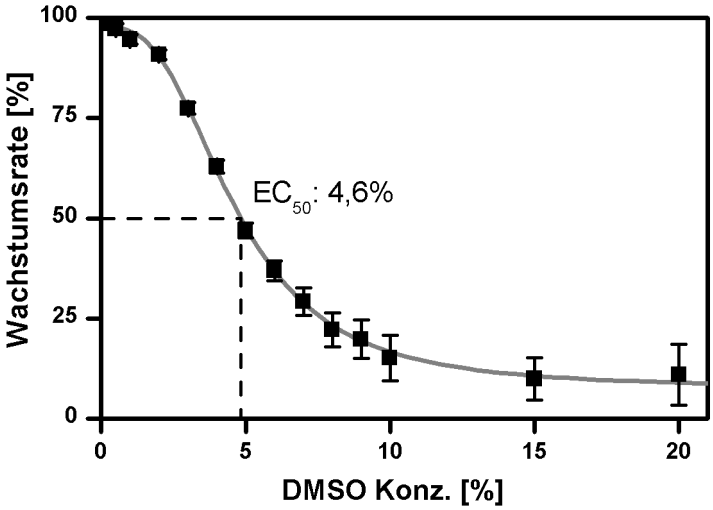


Abbildung 16: Untersuchung zur Toxizität von DMSO. Dargestellt sind die Wachstumsraten des S.c.-ΔGAL1-*pGAL1-YFP* Stammes *über 24 h Kultivierung gegen die Dimethylsulfoxid (DMSO) Konzentration [% (w/v)] des SC-Mediums. Die dargestellte Ausgleichsberechnung sowie die mittlere effektive Konzentration (EC50) wurden auf Basis der logistischen Funktion nach Verhulst ermittelt*[130]*. Standardabweichungen ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen mit jeweils unterschiedlichen Vorkulturen.*

Die Kurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf mit einer mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) von 4,6 % (*w*/*v*) DMSO. Eine deutliche Reduktion der Wachstumsrate kann jedoch bereits ab einem Einsatz von mehr als 2 % (*w*/*v*) DMSO beobachtet werden. Aufgrund dieser Daten wurde der Einsatz von DMSO bei der Kultivierung des *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* Reporterstammes auf eine Konzentration von maximal 2 % (*w*/*v*) begrenzt, um eine Beeinflussung des Wachstums zu minimieren. Durch den Einsatz von 2 % (*w*/*v*) DMSO konnte die Löslichkeit von NPip-Gal verbessert werden. Die maximale Konzentration von NPip-Gal im Medium konnte damit auf 5 mM gesteigert werden.

Nachdem die maximal einsetzbare NPip-Gal-Konzentration ermittelt worden war, konnte die Photolyse des *caged compounds* untersucht werden. Neben der bereits bestätigten Stabilität im Dunkelzustand, ist eine schnelle und zuverlässige Photolyse des NPip-Gal unter UVA-Belichtung essentiell für dessen erfolgreichen Einsatz. Daher wurde die Kinetik der Photolyse untersucht. Dazu wurden NPip-Gal Proben gleicher Konzentration (5 mM) unterschiedlich lange mit UVA-Licht bestrahlt und die Konzentrationsabnahme mittels RP-HPLC-Messungen bestimmt. Anschließend wurde die verbleibenden NPip-Gal Konzentrationen gegen die Belichtungszeiten aufgetragen, um die Kinetik der Photolyse in

Abbildung 17 darzustellen. Dabei wurden zwei unterschiedliche Belichtungsquellen verwendet: Erstens eine stärkere LED-Lampe (λ_{max} = 375 nm, F_0= 11 mW/cm^2), welche aufgrund der kompakten Bauweise allerdings nicht für Kultivierungsversuche geeignet war. Zweitens eine schwächere Quecksilberdampf-Handlampe (λ_{max} = 365 nm, F_0= 3 mW/cm^2), welche auch bei den Kultivierungsversuchen verwendet wurde.

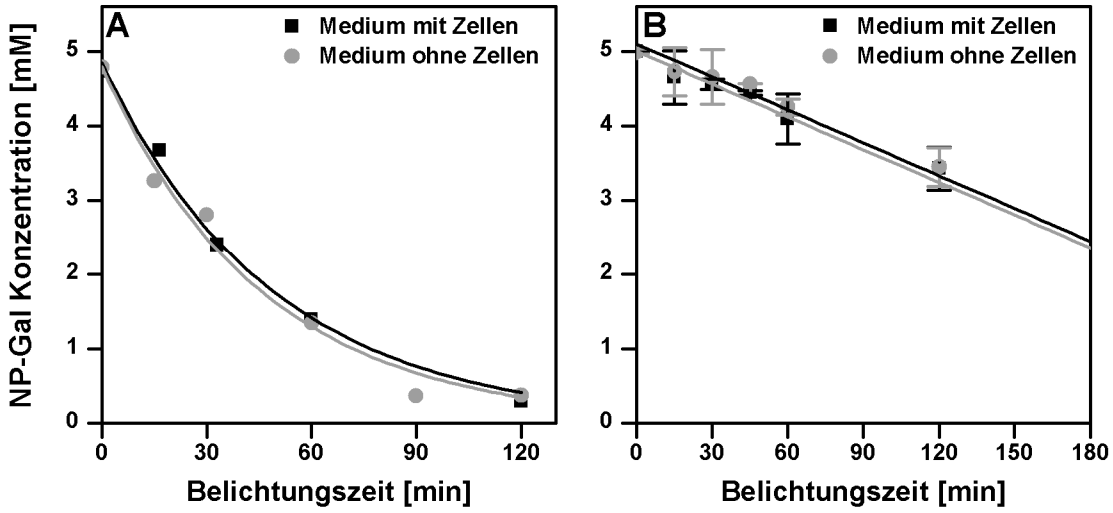


*Abbildung 17: Photolytische Spaltung von 6-Nitropiperonyl-β-D-Galactopyranosid (NPip-Gal, 5 mM) bei Belichtung in SC-Medium mit (schwarz) und ohne (grau) Zellen (*S.c.*-ΔGAL1-pGAL1-YFP, OD_{600} = 4). Belichtungsintensitäten: (A) λ_{max}= 375 nm, F_0= 11 mW/cm^2; (B) λ_{max} = 365 nm, F_0= 3 mW/cm^2. Standardabweichungen ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen.*

Die Abbildung 17, A zeigt, dass die vollständige Photolyse des NPip-Gal mit der LED-Lampe (λ_{max} = 375 nm, F_0= 11 mW/cm^2) erreicht werden kann. Dabei zeigt die Konzentrationsabnahme einen sigmoidalen Verlauf mit einer Halbwertszeit von ca. 35 min. Die Verwendung der Quecksilberdampf-Lampe (λ_{max} = 365 nm, F_0 = 3 mW/cm^2) zeigt dagegen eine deutlich langsamere Abnahme der NPip-Gal Konzentration. Innerhalb der gemessenen Belichtungszeiten von maximal 120 min konnte keine vollständige Photolyse beobachtet werden. Für die Daten dieses Zeitraumes konnten lineare Ausgleichsgeraden bestimmt werden, welche eine theoretische Halbwertszeit von ca. 180 min ergeben. Die Belichtung mit der LED-Lampe zeigt, dass eine Photolyse des NPip-Gal generell möglich ist. Trotz der hohen Lichtleistung von 11 mW/cm^2 liegt die benötigte Belichtungszeit für die Freisetzung von 5 mM Galaktose jedoch bei über 120 min. Bei der Verwendung des Kultivierungssetups mit einem schwächeren Lichteintrag von 3 mW/cm^2 würde eine vollständige Photolyse bei Annahme eines linearen Trends erst nach ca. 300 min eintreten. Es kann jedoch vermutet werden, dass bei längeren Belichtungszeiten der Zerfall ebenfalls einen exponentiellen

Verlauf annimmt, wodurch die benötigte Belichtungszeit zur vollständigen Photolyse vielleicht noch höher liegt. Der Vergleich von SC-Medium mit und ohne Zellen (*S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP*, $OD_{600} = 4$) offenbarte keine Unterschiede bei den Photolysekinetiken, unabhängig von der verwendeten Lichtquelle. Die photolytische Freisetzung von Galaktose könnte daher bei Kultivierungsversuchen vermutlich unabhängig von der Zelldichte durchgeführt werden.

Generell kann zusammengefasst werden, dass die Belichtungszeit für die Freisetzung einer zur Induktion der YFP-Produktion ausreichenden Konzentration von Galaktose mit dem Kultivierungssetup ($\lambda_{max} = 365$ nm, $F_0 = 3$ mW/cm^2) im Bereich von einer bis fünf Stunden liegt. Die Freisetzung von entsprechenden Effektorkonzentrationen würde daher relativ langsam verlaufen. Somit würde eine Regulation der Genexpression auf dieser Basis vermutlich nur mit sehr großer Verzögerung möglich sein. Die ermittelten Belichtungszeiten könnten zudem zu einer Belastung für die Vitalität der *S. cerevisiae* Zellen führen.

Aus diesem Grund wurde die Toxizität der UVA-Belichtung in den folgenden Experimenten untersucht. Dazu wurden Kultivierungen von *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (ca. 5 h Kultivierung) unterschiedlich lange mit UVA-Licht ($\lambda_{max} = 365$ nm, $F_0 = 3$ mW/cm^2) bestrahlt. Das Wachstum der Kultur wurde anhand der optischen Dichte bis zum Ende der Wachstumsphase beobachtet. Zur Auswertung wurden die finalen optischen Dichten nach 30 h Kultvierung gegen die jeweilige Belichtungsdauer aufgetragen. Diese Daten sind in Abbildung 18 dargestellt und zeigen mit zunehmender Belichtungszeit eine Abnahme der erreichten Zelldichten. Bereits nach 30 min Belichtung ist eine signifikante Abnahme des Wachstums um ca. 10 % zu beobachten. Nach 60 min hat sich die erreichte Zelldichte im Vergleich zur unbelichteten Kultivierung bereits halbiert. Damit zeigt sich, dass eine UVA-Belichtung über 30 min zu einer eindeutigen Beeinträchtigung der Zellvitalität führt. Daher sollte diese Belichtungszeit bei der Regulation der Genexpression nach Möglichkeit nicht überschritten werden. Die Versuche zur Photolyse von NPip-Gal haben jedoch gezeigt, dass Belichtungsdauern von mehr als einer Stunde nötig waren, um ausreichende Konzentrationen an Galaktose freizusetzen. Eine Regulation der Genexpression mittels NPip-Gal scheint daher nur unter erheblicher Beeinträchtigung der Zellvitalität möglich.

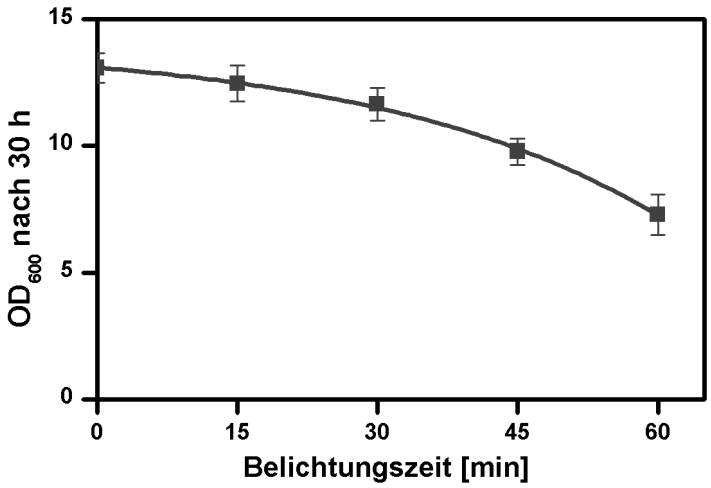


Abbildung 18: Einfluss der UVA-Belichtung auf das Wachstum der S.c.-ΔGAL1-*pGAL1-YFP Kulturen (BioLector Setup, SC-Medium, 30 °C). Parallelisierten Kultivierungen wurden nach 5 h Wachstum für unterschiedliche Dauer mit UVA-Licht (λ_{max} = 365 nm, F_0= 3 mW/cm^2) bestrahlt. Die maximale optische Dichte (OD_{600}) wurde nach 30 h gemessen.*

Dennoch wurden Kultivierungsexperimente durchgeführt, um eine lichtregulierte Genexpression mittels NPip-Gal zu testen. Dazu wurden Zellen des Reporterstammes *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* im NPip-Gal-haltigem Medium (SC-Medium, 5 mM NPip-Gal, 2 % DMSO, 30 °C) kultiviert. Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturen für unterschiedlich lange Zeit belichtet (0 - 120 min, λ_{max} = 365 nm, F_0= 3 mW/cm^2). Dabei konnte nach Belichtung jedoch keine Zunahme der YFP-Fluoreszenz und somit keine Induktion der *pGAL1*-kontrollierten Gene beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigten die Wiederholungen dieses Versuches unterschiedlich stark auftretende Wachstumsprobleme der *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* Kulturen. Die Ursache dafür konnte leider nicht aufgeklärt werden. Es könnte möglicherweise aber auf einen summierenden Effekt der DMSO- und UVA- Toxizitäten zurückzuführen sein.

Zusammenfassend kann dargelegt werden, dass bereits weitreichende Untersuchungen zur lichtvermittelten Genregulation mittels NPip-Gal unternommen wurden. Insbesondere die Optimierung des Reporterstammes war dabei sehr erfolgreich und ermöglichte eine 20-fache Reduzierung der Effektorkonzentration. Dadurch wurde die nötige Galaktosekonzentration für eine vollständige Induktion der *pGAL1*-kontrollierten Gene von 100 auf 5 mM reduziert. Die Charakterisierung des NPip-Gal hat gezeigt, dass eine photolytische Freisetzung von Galaktose prinzipiell möglich ist. Allerdings ergab die kinetische Untersuchung, dass die nötigen Belichtungszeiten mit einer Halbwertszeit von ca. 180 min (λ_{max} = 365 nm, F_0= 3 mW/cm^2) zu einer erheblichen Beeinträchtigung der

Zellvitalität führen. Die Verwendung von höheren NPip-Gal Konzentrationen zur Verringerung der Belichtungszeiten war aufgrund der schlechten Löslichkeit nicht möglich. Erst der Einsatz von DMSO ermöglichte überhaupt, die Löslichkeitsgrenze von NPip-Gal auf die regulatorisch notwendige Konzentration von 5 mM zu steigen. Dabei zeigten Toxizitätsuntersuchungen zu DMSO allerdings schon leichte Beeinträchtigungen des Zellwachstums bei Verwendung der notwendigen DMSO Konzentration von 2 %.

Die finalen Versuche zur Genregulation unter Verwendung von NPip-Gal konnten daher auch keine Induktion der Genaktivität zeigen. Zudem konnte eine unkontrollierbare Beeinträchtigung des Zellwachstums beobachtet werden, welche möglichweise auf eine Kombination der UVA- und DMSO-Toxizitäten sowie Nebenprodukte der NPip-Gal Photolyse zurückzuführen ist. Dabei führten längere UVA-Belichtungszeiten, welche zur Freisetzung von regulatorisch wirksamen Galaktosekonzentrationen erforderlich waren, zu einer Inhibierung des Zellwachstums. Die Verwendung von tolerablen Belichtungszeiten dagegen ergab keine ausreichende Galaktose-Freisetzung, um eine Genexpression im vorliegenden Expressionssystem zu induzieren. Folglich konnte keine lichtvermittelte Regulation des *pGAL1*-kontrollierten YFP-Gens mittels NPip-Gal erzielt werden.

2.2 Lichtregulation (Induktion) mittels *caged*-Cu^{2+}

Die folgenden Ergebnisse dieses Kapitels wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Georg Wandrey erzeugt und sind in eine gemeinsame Publikation eingegangen.[131] *Die Experimente zu Abbildung 21, Abbildung 25 und Abbildung 26 wurden im Rahmen dieser Dissertation zunächst als Vorversuchen im BioLector Setup durchgeführt. Die dargestellten Daten der Abbildung 21, Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 28 beziehen sich auf Experimente, die anschließend im Rahmen einer Kooperation [BMBF, FKZ: 031A167A, Neue Optosensoren und Photoregulatoren zur lichtvermittelten Steuerung und Analyse molekularer Systeme (OptoSys)] von Dr. Georg Wandrey mit einem eigens konstruierten Screening-System durchgeführt wurden. Details zur Versuchsdurchführung können der gemeinsamen Publikation*[131] *und dem Kapitel 5.3.4 entnommen werden.*

Alternativ zum *pGAL1*-basierten-Expressionssystem in Kombination mit *caged*-Gal wurden weitere Strategien zur Entwicklung eines lichtregulierten Expressionssystems verfolgt. Nachdem sich die hohe Effektorkonzentration, die zur Induktion des *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* Expressionssystems notwendig ist, als eines der Hauptprobleme herausgestellt hatte, wurde dieser Aspekt besonders berücksichtigt. Als Zielsetzung wurde daher die Regulation einer *CUP1*-Promotor-regulierten Genexpression gesetzt, da dieser Promotor durch deutlich geringere Effektor-Konzentrationen (in diesem Fall Cu^{2+}-Ionen) maximal induziert werden kann. Die angesprochenen Konzentrationen bewegen sich dabei im mikromolaren Bereich (5 - 100 µM).[132] Damit liegen diese ca. 100- bis 1000-fach niedriger als bei dem zuvor untersuchten *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* Expressionssystems, welches durch Konzentrationen im millimolaren Bereich (5 - 100 mM, vgl. Kapitel 2.1.2) voll induziert werden kann. Darüber hinaus gewährleistet ein *pCUP1*-kontrolliertes-Expressionssystem weiterhin die Fokussierung auf biotechnologisch relevante Expressionssysteme. Der *CUP1*-Promotor ist neben dem *GAL1*-Promotor einer der meistgenutzten, induzierbaren Promotoren in *S. cerevisiae* [66,69] und wurde in den Bereichen Proteinproduktion,[133] *metabolic engineering*[134,135] und weiße Biotechnologie[41,136] vielfältig eingesetzt.[137] Somit konnte das Hauptbestreben, den Einsatz lichtregulierter Expressionssysteme für die Biotechnologie zu vereinfachen, weiterhin verfolgt werden.

Neben der Bereitstellung geeigneter Expressionssysteme stellt die Verfügbarkeit der *caged compounds* ein weiteres Hindernis bei der Etablierung lichtregulierter

Expressionssysteme da. Fortschritte bei der Entwicklung von *caged compounds* führten zur Diversifizierung der Eigenschaften und zur Erweiterung der optogenetischen Anwendungen.[127,138] Der Zugriff auf solche Spezialchemikalien ist jedoch meist von chemischem Fachwissen und gegebenenfalls komplexen Syntheserouten abhängig. Das *pCUP1*-Expressionssystem könnte dieses Problem umgehen, da ein geeignetes *caged compound* kommerziell erhältlich ist. Dieses seltene Beispiel für ein industriell hergestelltes *caged compound* ist DMNP-EDTA {1-[2-Nitro-4,5-Dimethoxyphenyl]-N,N,N',N'-tetrakis[(oxycarbonyl)methyl]-1,2-ethandiamine, DM-Nitrophen},[78] ein Derivat des Komplexbildners EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), welches bereits seit mehr als zwei Jahrzehnten intensiv in der Neurobiologie eingesetzt wird. Dabei wurde es hauptsächlich genutzt, um Ca^{2+}-Ionen zu komplexieren und strahlungsbedingt freizusetzen. Beispielsweise ermöglichte die exakte Freisetzung des Neurotransmitters Ca^{2+} die eingehende Erforschung der synaptischen Funktionsweise.[139] Eine Anwendung zur Regulation von Genexpressionen wurde vor der Publikation der vorliegenden Arbeiten[131] nicht beschrieben.

Eine Besonderheit von DMNP-EDTA ist, dass die photosensitive Gruppe kovalent an den Chelator und nicht an das Metallion, den eigentlichen Effektor, gebunden ist. Dadurch ist ein modularer Einsatz dieses *caged compounds* für weitere Kationen möglich, da das Metallion erst nach der Synthese des *cages* hinzugefügt wird. Somit konnte die Anwendung von DMNP-EDTA ebenfalls für Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Sr^{2+}, Cd^{2+}, und Ba^{2+} demonstriert werden.[140,141] Bezogen auf die Komplexeigenschaften der separat betrachteten EDTA-Teilstruktur sollte die Verwendung des DMNP-EDTA-Cu^{2+}-Komplexes ebenfalls möglich sein, obwohl dies zu Beginn dieser Dissertation noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Grundlage für diese Annahme ist die Stabilitätskonstante des EDTA-Cu^{2+}-Komplexes (Stabilitätskonstante K_d: 18)[142], welche noch höher ist (ca. 1,6-fach) als beim EDTA-Ca^{2+}-Komplex (Stabilitätskonstante K_d: 11)[142].

Im Folgenden wurde daher die Strategie verfolgt, ein *CUP1*-Promotor-basiertes Expressionssystem in *S. cerevisiae* mittels lichtregulierter Freisetzung von Cu^{2+}-Ionen aus einem DMNP-EDTA-Cu^{2+}-Komplex zu realisieren. Das angestrebte Prinzip der Regulation ist in Abbildung 19 veranschaulicht. Dabei ist das Expressionssystem zu Beginn inaktiv, da die Cu^{2+}-Ionen vom DMNP-EDTA komplexiert sind. Durch Anpassung der Belichtung (Intensität / Dauer) kann nun eine definierte Menge an *cage-*Cu^{2+} (DMNP-EDTA-Cu^{2+}) gespalten und eine entsprechende Menge Cu^{2+}-Ionen freigesetzt werden. Dies führt zur Induktion des

Expressionssystems, wobei die Stärke der Expression von der Konzentration an photolytisch freigesetzten Cu^{2+}-Ionen abhängig ist. Im Folgenden werden die Ergebnisse im Detail dargestellt.

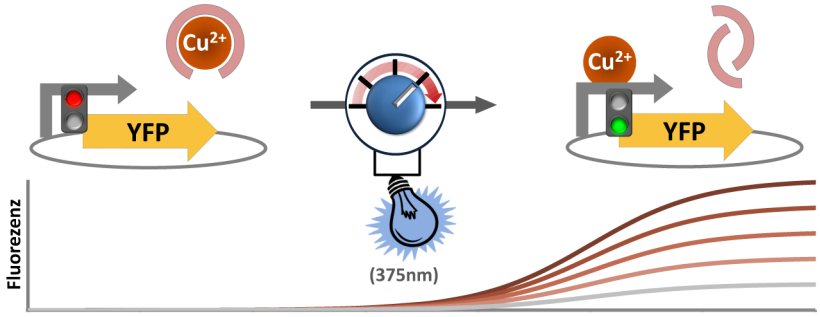


Abbildung 19: Prinzip der photolytischen Regulation des pCUP1-Expressionssystems mittels DMNP-EDTA-Cu^{2+}. Die Bestrahlung führt zur Spaltung des DMNP-EDTA und zur Freisetzung der als Induktor wirkenden Cu^{2+}-Ionen. Abhängig von der Cu^{2+}-Ionen-Konzentration soll eine graduelle Regulation der Expressionsstärke erreicht werden.

2.2.1 *Das pCUP1*-basierte Expressionssystem

Der *CUP1*-Promotor diente als Grundlage der optischen Expressionsregulierung und ist Teil der komplexen Kontrolle über die intrazelluläre Kupferkonzentration in *S. cerevisiae*. Daher wird dieser Aspekt im Folgenden genauer erläutert. Die Aufnahme von Kupfer ist besonders wichtig, da Spuren von Kupfer für das Überleben der *S. cerevisiae* Zellen essentiell sind.[143] Bedeutende Enzyme des Zellstoffwechsels sind auf Kupferionen als Kofaktoren angewiesen. Besonders hervorzuheben sind dabei die Superoxiddismutase (H_2O_2-Entgiftung), die Cytochrom C Oxidase (Atmungskette), die NADH-Dehydrogenase (Atmungskette) oder die Aminoxidase (Coenzym A Biosynthese). Die Aufnahme von Kupfer erfolgt über transmembrane Transporterproteine (Ctr1p, Ctr3p, Fet4p). Dabei wird das Cu^{2+} vor der Aufnahme durch die zelloberflächenassoziierte Metalloreduktase Fre1p zu Cu^{+} reduziert. Die Regulation dieser Kupferaufnahme wird dabei maßgeblich vom Trankriptionsregulator Mac1p gesteuert.[143–145] Höhere Konzentrationen an Kupfer gelten jedoch für viele Mikroorganismen als toxisch. Sie können in sogenannten Fenton-Reaktionen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) führen. Dadurch kann es unter anderem zur Peroxidation von Lipidmolekülen und damit zur Destabilisierung der Membran kommen. Des Weiteren besitzt Cu^{+} als starke sogenannte weiche Base mit einer hohen Affinität zu Thiolaten das Potential, Eisen-Schwefel-*Cluster* und Proteine zu destabilisieren.[146] Aus diesen Gründen ist die Begrenzung der intrazellulären

Kupferkonzentration für *S. cerevisiae* überlebenswichtig. Die Kontrolle der intrazellulären Kupferkonzentration erfolgt maßgeblich über die Expressionsregulation des *CUP1*-Gens. Sie diente als Grundlage für die im Folgenden entwickelte optische Expressionsregulation und ist daher in Abbildung 20 genauer veranschaulicht.

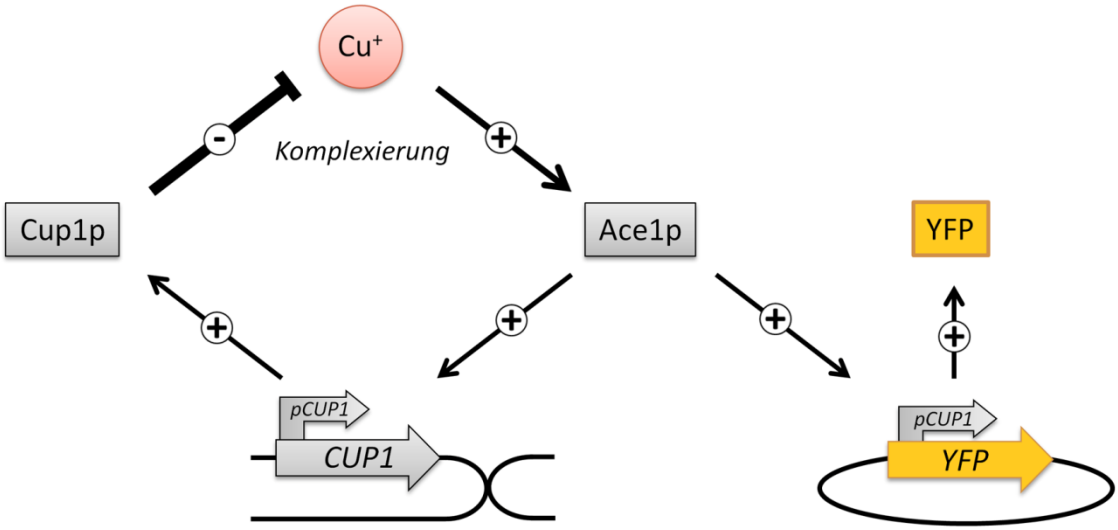


Abbildung 20: Regulation des pCUP1-Expressionssystems in S. cerevisiae. Nach Zugabe von Kupferionen werden diese durch den Transkriptionsaktivator Ace1p gebunden. Dadurch erhöht sich die Affinität von Ace1p zum CUP1*-Promotor deutlich und die Expression der pCUP1-kontrollierten Gene wird induziert. Neben dem durch Transformation eingebrachten YFP-Gen des Reporterplasmids kommt es auch zur Bildung des chromosomal kodierten* Cup1p *Metallothionein, welches Kupferionen bindet und speichert. Das* Cup1 *Protein besitzt dabei eine höhere Affinität zu den Kupferionen als Ace1p, wodurch es diesem die Kupferionen langsam entzieht. Als Folge wird die Expression des nativen CUP1 Gens in einer Art Autoregulation durch sein eigenes Genprodukt inhibiert.*

Die Expression des Cup1-Gens wird bei Kupferüberschuss in *S. cerevisiae* aktiviert. Das resultierende Protein Cup1p bindet Cu^{2+}-Ionen, lagert diese ein und bewirkt dadurch eine Detoxifikation. Die Aktivierung des entsprechenden *CUP1*-Promotors wird durch den Transkriptionsaktivator Ace1p bewirkt.[145] Dieses Protein besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten: einer Cystein-reichen Metallothionein-artigen Sensordomäne und einer DNA-bindenden Regulatordomäne. Die Sensordomäne liegt bei Cu^{2+}-Mangel zunächst unstrukturiert vor, bildet aber durch die Bindung von vier Äquivalenten Cu^{2+} ein Tetrakupfer-*Cluster* aus.[147,148] Die damit verbundene Konformationsänderung wirkt sich auch auf die Regulatordomäne aus, wodurch deren Affinität zu einer spezifischen DNA Sequenz des *CUP1*-Promotors deutlich steigt.[149,150] Die anschließende Bindung des Ace1 Proteins an die DNA bewirkt die Aktivierung der Transkription von nachgeschalteten Genen. Auf

chromosomaler Ebene ist dies vor allem das *CUP1* Gen, dessen Genprodukt, das Cup1p Metallothionein, Kupferionen einlagert und speichert.

Die Affinität des Cup1 Proteins ist dabei höher als die des Ace1 Proteins. Es wird daher davon ausgegangen, dass es zu einer gewissen Autoregulation kommt. Dabei entzieht das Cup1 Protein bei steigender Expression die Kupferionen aus dem Ace1p Transkriptionsaktivator. Dadurch schaltet das Cup1-Protein seinen eigene Expression langsam wieder ab.[151,152] Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass die Autoregulation deutlich vermindert wird, nachdem die Kupferaffinität des Cup1 Proteins mutationsbedingt verringert wurde.[153,154] Ähnliche Regulationsmechanismen sind z. B. auch von Zinkfingerproteinen bekannt. Dabei wird Zink von einem Protein gebunden, dessen Expression durch einen Zinkfinger-Transkriptionsaktivator reguliert wird. Dies führt zur Inaktivierung des Transkriptionsaktivators und folglich zum Transkriptionsstopp.[155,156]

2.2.2 Charakterisierung von *S.c.-pCUP1-YFP*

Zur Entwicklung und Charakterisierung eine *pCUP1*-basierten Expressionssystems wurde ein *YFP* Gen unter der Kontrolle des *CUP1*-Promotors[157] aus *S. cerevisiae Y00000* in einen 2µ-Vektor kloniert. Dazu wurde der *GAL1*-Promotor der Plasmids pPK1*_pGAL1-YFP* gegen den *CUP1*-Promotor ausgetauscht. Anschließend wurden Zellen des Stammes *S. cerevisiae Y00000* mit diesem Vektor transformiert, um den Reporterstamm *S.c.-pCUP1-YFP* zu erzeugen. Das *YFP* Gen sollte dabei als Reportergen funktionieren, um die Genexpression fluoreszenzbasiert beobachten zu können. Zur biotechnologischen Nutzung würde das Gen des YFP gegen das Gen eines entsprechenden Enzyms oder Proteins ausgetauscht. Die über den *CUP1*-Promotor und das Cup1-Protein vermittelte Autoregulation sollte dem Expressionssystem darüber hinaus die Möglichkeit einer graduellen Regulation der Expressionsstärke verleihen. Konkret ist damit gemeint, dass die Stärke der Genexpression über die Konzentration an Cu^{2+}-Ionen im Medium reguliert werden könnte.

Das Expressionsverhalten des erzeugten Reporterstammes *S.c.-pCUP1-YFP* wurde zu Beginn der Arbeiten charakterisiert. Dabei wurde auf den Einsatz einer optischen Komponente zunächst verzichtet und der Promotor der bekannten Literatur[66,69,133] entsprechend mit $CuCl_2$ induziert. Dadurch sollte eine Referenz erzeugt werden, um die später folgende optische Regulation vergleichen zu können. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf die graduelle Regulierbarkeit der Genexpression gelegt. Zusätzlich sollte die Schwellen-

konzentration an Cu^{2+}-Ionen bestimmt werden, ab der die maximale Expressionsstärke erreicht wird.

Zur Charakterisierung des Reporterstammes wurden mehrere Ansätze von *S.c.-pCUP1-YFP* parallel im BioLector *Setup* in kupferfreiem SC-Medium kultiviert. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (ca. 5 h) wurden die Zellen durch Zugabe von unterschiedlichen $CuCl_2$ Konzentrationen (0 - 100 µM) induziert. Während dieser Versuche wurden sowohl die YFP-Fluoreszenz als auch die Zelldichte in Echtzeit dokumentiert.
In Abbildung 21, A ist die Auswertung dieser Versuche veranschaulicht. Der Anstieg des YFP-Fluoreszenzsignals nach ca. 5,5 h zeigt, dass es nach der $CuCl_2$-Zugabe zu einer raschen Induktion der Genexpression mit einer Verzögerung von weniger als 30 min kam. Danach folgten die Graphen der Fluoreszenzmessungen einem sigmoidalen Verlauf und erreichten nach ca. 10 - 13 h Kultivierung ein Produktionsplateau. Dadurch ergab sich eine Expressionszeit von ca. 5 - 8 h.

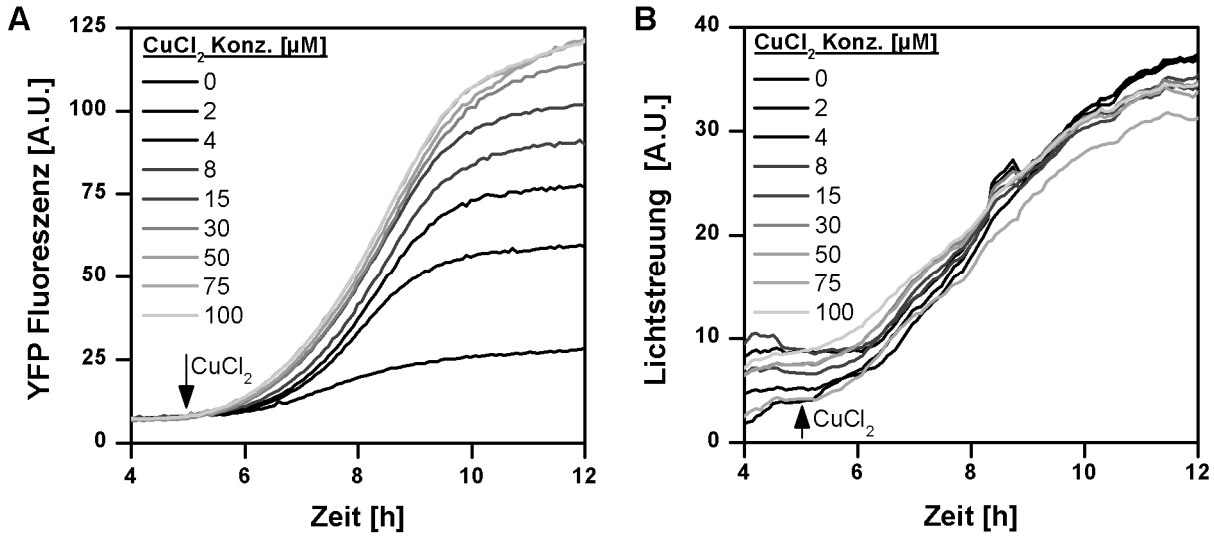


Abbildung 21: Charakterisierung des S.c -pCUP1-YFP Expressionssystems bei Zugabe von unterschiedlichen $CuCl_2$-Konzentrationen (0 - 100 µM) zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (nach 5 h). Messung der Daten von Georg Wandrey. (A) Die Aktivität des Promotors kann anhand der Bildung des YFP-Proteins verfolgt werden. (B) Zeitgleich wurde das Wachstum der Zellen mittels Lichtstreuung verfolgt. Modifiziert nach Kusen et al.[131]

Zusätzlich konnte eine graduelle Expressionsregulation beobachtet werden, bei der die erreichte Endstärke des Fluoreszenzsignals direkt mit der eingesetzten $CuCl_2$ Konzentration korrelierte. Dabei konnte erkannt werden, dass die Höhe der Endsignale auf zwei verschiedene Ursachen zurückzuführen ist. Die maximalen Fluoreszenzsignale unterscheiden sich hauptsächlich aufgrund unterschiedlicher Steigungen während der quasi-linearen

Produktionsphase (insbesondere bei 2, 4 und 8 µM $CuCl_2$). Ab einer Konzentration von 15 - 30 µM sind die Steigungen nahezu gleich und die Unterschiede der maximalen Fluoreszenzsignale sind vorwiegend auf die Dauer der quasi-linearen Produktionsphase zurückzuführen. Eine weitere Steigerung der $CuCl_2$ Konzentration von 50 - 100 µM führte zu keiner weiteren Änderung der Signalverläufe bzw. -maxima.

Diese Beobachtung stützt die These der Autoregulation durch das *CUP1* Genprodukt (s. Kapitel 2.1.1). Es deutet darauf hin, dass im vorliegenden Expressionssystem bis zu einer Konzentration von 15 µM genug CUP1-Protein (Cup1p) gebildet wird, um dem Ace1p Transkriptionsaktivator die Kupferionen zu entziehen und damit die Deaktivierung der *pCUP1*-regulierten YFP Expression hervorzurufen. Ab einer Konzentration von 30 µM liegen offenbar so viele Kupferionen vor, dass die Expressionsstärke des *CUP1*-Promotors nicht mehr ausreicht, um genug Cup1p für eine hinreichend schnelle Komplexierung zu bilden.

Des Weiteren kann die Cu^{2+}-Schwellenkonzentration, ab der eine Maximierung der Expressionsstärke vorliegt, auf eine Konzentration von 50 µM bestimmt werden. Damit liegt dieser Wert 100-mal niedriger als beim *pGAL1*-basierten Expressionssystem, welches mit dem optimierten *S.c.-pGAL1-YFP* Stamm 5 µM Galaktose zur maximalen Induktion benötigt. Für die späteren optischen Regulationen mittels des DMNP-EDTA-Cu^{2+} Komplexes wurde auf Grundlage dieser Daten ebenfalls eine Konzentration von 50 µM komplexiertem Cu^{2+} festgelegt.

Bezüglich des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems erreicht die Basalexpression der nicht induzierten Kultivierungen (0 µM $CuCl_2$) einen Wert von ca. 20 % der maximalen Expressionsstärke. Die tatsächliche Basalexpression lag jedoch vermutlich geringer, da biomolekulare Autofluoreszenzen von Stoffwechselprodukten und Zellbestandteilen mit der YFP-Fluoreszenz interferieren. Somit könnte das tatsächliche YFP-verursachte Fluoreszenzsignal durch *unmixing* Methoden korrigiert werden.[158,159]

Die Wachstumskurve der Zellen zeigte ebenfalls einen sigmoidalen Verlauf (Abbildung 21, B), wobei das exponentielle Wachstum nach ca. 5 h begann und nach einer Zeit von ca. 11 h sein Plateau erreichte. Die relativ großen Unterschiede der Streulichtwerte am Anfang der Kultivierung rühren von der Messtechnik her und überzeichnen deutlich die Unterschiede der Zelldichte bis zu einer Kultivierungszeit von ca. 5 h. Das Streulichtsignal besitzt bei geringen Zelldichten eine deutlich größere Schwankung als beispielsweise Messungen der optischen Dichte. Letzteres konnte jedoch nicht durchführt werden, da die BioLector-

Technologie eine optische Einwirkung ausschließlich vom Boden der Multiwellpatten erlaubt. Die Messung der optischen Dichte setzt jedoch die Bestrahlung von der einen und die optische Messung von der gegenüberliegenden Seite voraus. Ab einer Zelldichte mit einer OD_{600} von ca. 0,5 werden die Werte des Streulichts aber hinreichend verlässlich. Somit ist die Aussagekraft der Wachstumskurven weiterhin gegeben.

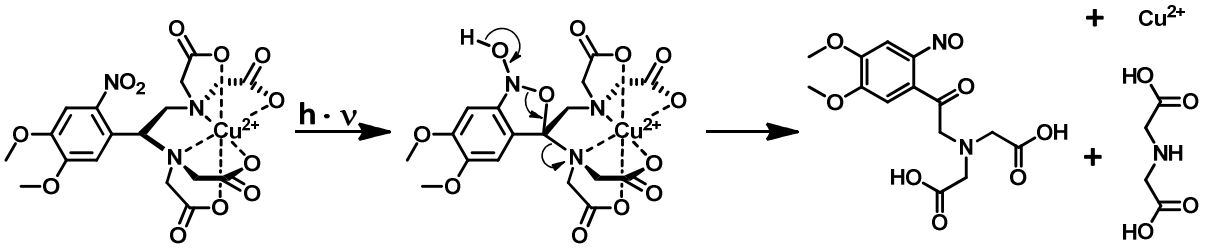
Insgesamt verlaufen die Wachstumskurven der einzelnen Kultivierungen unabhängig von der eingesetzten $CuCl_2$ Konzentration sehr ähnlich. Zudem sind die Wachstumsraten der exponentiellen Phase, also die Zunahme der Lichtstreuung pro Zeit, bei allen Kulturen nahezu gleich. Beide Faktoren zusammen lassen darauf schließen, dass die Behandlung mit unterschiedlich hohen $CuCl_2$ Konzentrationen (0 - 100 µM) keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatte. Ebenso kann vermutet werden, dass die Expressionsstärken eher auf moderatem Niveau liegen. Ansonsten wäre eine negative Beeinflussung der Wachstumsrate aufgrund der Induktion der Genexpression und der damit verbundenen Verlagerung der zellulären Ressourcen auf die heterologe Genexpression zu erwarten.[160]

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass wichtige Kriterien des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems charakterisiert werden konnten, welche einen biotechnologischen Einsatz sowie eine optische Regulation begünstigen. Für die Schwellenwertkonzentration bei der eine maximale Expression erreicht wird, konnte eine Cu^{2+}-Konzentration von 50 µM bestimmt werden und ist damit 100-fach niedriger als beim *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP Expr*essionssystem. Zudem zeigte die Expressionsregulation einen graduellen Verlauf, dessen maximales Produktionsniveau anhand der eingesetzten Kupferionenkonzentration reguliert werden konnte. Dabei zeigt die Behandlung mit Kupferionen, welche für Mikroorganismen allgemein als toxisch gelten, bei den eingesetzten Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen.

2.2.3 Charakterisierung von DMNP-EDTA-Cu^{2+} (*caged*-Cu^{2+})

Neben einem geeigneten Expressionssystem galt es die zweite wesentliche Komponente für eine optische Expressionsregulation zu charakterisieren. Dabei handelte es sich um ein *caged compound* zur photosensitiven Freisetzung von entsprechenden Effektormolekülen. Ein Vorteil des *pCUP1*-basierten Expressionssystems bestand darin, dass ein kommerzieller Zugang zu solch einer Verbindung bestand.

Dabei handelte es sich um DMNP-EDTA (**39**), einem EDTA (Ethylendiamin-N,N,N‘,N‘-tetraessigsäure)-basierten Chelator dessen Ethylendiamin-„Rückgrat“ mit einer photosensitiven 4,5-Dimethyl-2-nitrophenyl-Gruppe (DMNP) verbunden ist (s. Abbildung 22). Die Struktur von DMNP-EDTA (**39**) unterscheidet somit grundlegend von der „klassischer“ *caged compounds*, wie den bereits erwähnten *caged*-Galaktose oder *caged*-IPTG (vgl. Kapitel 1.4). Die kovalente Bindung der photosensitiven Gruppe besteht nicht - wie sonst üblich - zum Effektor (wie z.B. Galaktose oder IPTG), sondern zur Grundstruktur eines Chelators (hier: EDTA). Die Bestrahlung bewirkt dadurch keine Abspaltung der photosensitiven Gruppe, sondern eine Spaltung des gesamten Chelatormoleküls. Zu diesem Mechanismus kommt es, da an der benzylischen Position ein sekundärer Kohlenstoff vorliegt. Somit wird die photosensitive Gruppe nicht wie bei primären Kohlenstoffen abgespalten, sondern verbleibt an einem der Bruchstücke. Bei Bestrahlung kommt es unter Beteiligung des benzylischen Kohlenstoff und der Nitrogruppe vermutlich zunächst zur Bildung eines Isoxazolidins und somit zur Zwischestufe **40**. Bei der anschließenden Auflösung dieser fünfgliedriegen Ringstruktur bildet sich ein Keton an benzylischer Position, wodurch ein Bindungsbruch zum benachbarten Heteroatom, also zum Stickstoff hin, erfolgt. In Folge dessen kommt es zur Bildung von Iminodiessigsäure (IDA, **14**) und einem *N*-substituierten Derivat **13** von IDA. Die Affinität dieser IDA Komponenten zu Cu^{2+}-Ionen ist im Vergleich zum intakten DMNP-EDTA (**39**) deutlich reduziert, wodurch die biologische Verfügbarkeit der Metallionen ermöglicht wird.



39 **30** **13** **14**

DMNP-EDTA-Cu^{2+}
(caged-Cu^{2+})

Abbildung 22: Mechanismus der photolytischen Spaltung von DMNP-EDTA-Cu^{2+}. Abgewandelt nach Kaplan und Ellis-Davies(1988).[78] Modifiziert nach Kusen et al.[131]

Die Struktur des DMNP-EDTA ermöglicht den Einsatz von unterschiedlichen Kationen, da diese erst nach der Synthese des photosensitiven Chelators zugegeben werden, um den funktionellen Metallkomplex zu bilden. Zu Beginn dieser Doktorarbeit konnte jedoch kein

Beispiel für die Verwendung von Cu^{2+}-Ionen in der wissenschaftlichen Literatur gefunden werden. Aus diesem Grund wurden im Folgenden zunächst absorptionsspektroskopische Untersuchungen zum DMNP-EDTA-Cu^{2+} (**39**) Komplex durchgeführt, um anschließend die Photolyse dieses *caged compound* zu charakterisieren.

Die Messungen der Absorptionsspektren sollten unter definierten Bedingungen des pH-Wertes durchgeführt werden. Daher wurde der Einsatz von Pufferlösungen favorisiert. Viele Pufferreagenzien verfügen in der Regel allerdings über basische Gruppen zur Aufnahme von Protonen wie Amine, Carboxylate oder Phosphate. Deren freie Elektronenpaare ermöglichen prinzipiell ebenfalls eine Koordinierung von Metallionen, was zur Bildung von farbigen Komplexen führen kann. Deswegen wurde zunächst der Einfluss von unterschiedlichen Puffern auf die Absorption von Cu^{2+}-Ionen untersucht. Dazu wurde $CuCl_2$-Lösungen (100 µM) in unterschiedlichen Puffersubstanzen mit gleicher Konzentration und gleichem pH-Wert (10 mM, pH 7) hergestellt und deren Absorptionsspektrum anschließend vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23, A dargestellt und zeigen, dass der verwendete Puffer einen großen Einfluss auf das Absorptionsspektrum hat. Generell kann jedoch festgehalten werden, dass die Absorption bei allen Puffern niedriger ist als im Vergleich zu reinem Wasser.

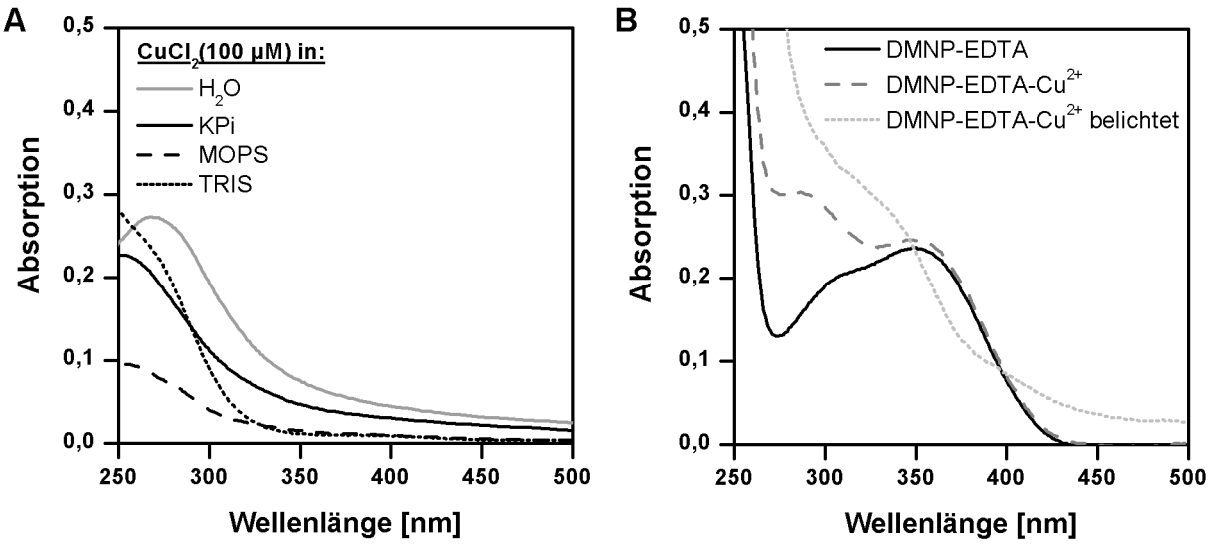


Abbildung 23: Absorptionsspektroskopische Charakterisierung von DMNP-EDTA Komplexen. (A) Einfluss der getesteten Puffer (10 mM, pH 7) auf die Absorption von $CuCl_2$ (100 µM) in Wasser. (B) Absorptionsspektren des DMNP-EDTA-Cu^{2+} Komplexes vor und nach Belichtung (40 min, vollständige Photolyse) sowie von reinem DMNP-EDTA ohne Metallion in gepuffertem Wasser (10 mM MOPS, pH 7). Die Kationen wurden im Überschuss eingesetzt, um die Sättigung des Chelators zu gewährleisten (80 µM DMNP-EDTA, 100 µM $CuCl_2$). Modifiziert nach Kusen et al.[131]

Dennoch ist schon zu Beginn des Messfensters zwischen 250 und 275 nm eine deutliche Absorption bei allen Puffern zu erkennen. Dabei steigt die Absorption jeweils mit sinkenden Wellenlängen bis zu einem Wert von 0,28 bei TRIS [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan], 0,22 bei KP_i (Kaliumphosphat) und 0,1 bei MOPS [3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure] an. Die Kombination mit Kaliumphosphat-Puffer zeigt darüber hinaus noch eine eindeutige Absorption im Bereich von 275 bis 500 nm.

Die niedrigste Adsorption zeigten Cu^{2+}-Ionen in MOPS Puffer. Aufgrund dieser Befunde wurde der MOPS Puffer für alle weiteren Charakterisierungen von DMNP-EDTA ausgewählt, um so das durch die Absorption der Kupferionen hervorgerufene Hintergrundsignal in den DMNP-EDTA-Cu^{2+} Spektren möglichst gering zu halten. Dies galt insbesondere für die späteren Photolysekinetiken, bei denen die Cu^{2+}-Ionen schrittweise freigesetzt wurden. Dies führte zu einem zunehmenden Hintergrundsignal und damit zu einer leichten Verzerrung der Absorptionsmessungen.

Im Anschluss wurden die Absorptionsspektren des DMNP-EDTA-Cu^{2+} Komplexes vor und nach Belichtung gemessen, sowie zusätzlich das Spektrum des reinen DMNP-EDTA ohne Metallion (s. Abb. 19, B). Um die vollständige Photolyse zu gewährleisten, wurde die Belichtung solange durchgeführt, bis keine Änderung der Absorption mehr festzustellen war (40 min). Die Sättigung des DMNP-EDTA Komplexes mit Cu^{2+}-Ionen wurde durch einen Überschuss an $CuCl_2$ gewährleistet. Dabei wurden 80 µM DMNP-EDTA und 100 µM $CuCl_2$ eingesetzt und in MOPS Puffer (10 mM, pH 7) gelöst. Der Vergleich der DMNP-EDTA Spektren mit und ohne Cu^{2+} zeigt, dass sich die Spektren von 350 nm bis ca. 500 kaum verändern. Erst bei niedrigeren Wellenlängen von ca. 250 bis 360 nm wird eine deutliche Erhöhung der Absorption erkennbar. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung eines lokalen Maximums bei 288 nm, dessen Absorption an dieser Stelle ca. 1,7-fach höher liegt als der Wert des Chelators ohne Metallion.

Die reine Addition des Hintergrundsignals von $CuCl_2$ in MOPS-gepuffertem Wasser kann für diese große Veränderung nicht verantwortlich sein. Darauf deutet hin, dass die Absorption mit maximal 0,1 bei 250 nm zu gering ist und bei 288 nm kein lokales Maximum besitzt. Deshalb sind diese Veränderungen wahrscheinlich größtenteils auf die Komplexierung der Cu^{2+}-Ionen durch den DMNP-EDTA Chelator zurückzuführen. Die Belichtung des DMNP-EDTA-Cu^{2+} Komplexes bewirkte im Gegensatz dazu deutliche Veränderungen des gesamten Absorptionsspektrums. Von 250 bis 350 nm und von 400 bis

450 nm ist eine Erhöhung zu beobachten. Dazwischen, d.h. im Bereich von 350 bis 400 nm, nimmt das Absorptionssignal deutlich ab.

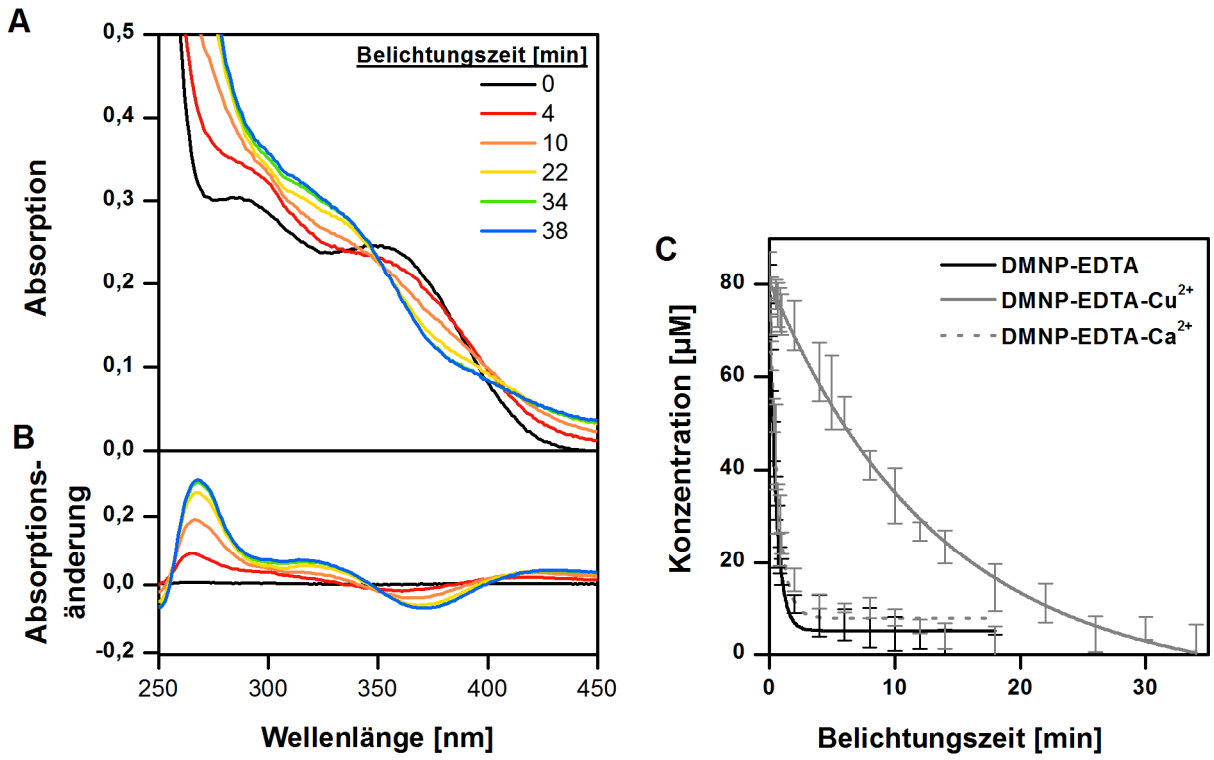


Abbildung 24: Photolysekinetiken des DMNP-EDTA-Cu^{2+} Komplexes. (A) Darstellung exemplarischer Absorptionsspektren von DMNP-EDTA-Cu^{2+} (80 µM DMNP-EDTA, 100 µM $CuCl_2$) nach unterschiedlich langer Belichtung (λ_{max} = 375 nm, F_0 = 11 mW/cm^2). (B) Absorptionsänderung von DMNP-EDTA-Cu^{2+} nach unterschiedlichen Belichtungszeiten im Vergleich zur unbelichteten Probe (schwarze Linie). (C) Photolysekinetik von DMNP-EDTA-Cu^{2+} im Vergleich zu DMNP-EDTA-Ca^{2+} und DMNP-EDTA ohne Ion (Anfangskonzentration jeweils 80 µM DMNP-EDTA, und ggf. 100 µM $CuCl_2$), Konzentrationen umgerechnet anhand der Absorptionsänderung bei 370 nm. Modifiziert nach Kusen et al.[131]

Die charakteristische Absorptionsänderung wurde verwendet, um im Folgenden die Kinetik der Photolyse zu verfolgen. Dazu wurde DMNP-EDTA-Cu^{2+} (80 µM DMNP-EDTA, 100 µM $CuCl_2$) in MOPS-gepuffertem Wasser (10 mM, pH 7) gelöst und für unterschiedlich lange Zeit belichtet (λ_{max} = 375 nm, F_0 = 11 mW/cm^2). Im direkten Anschluss wurden die Absorptionsspektren aufgezeichnet. Die Überlagerung einiger exemplarischer Spektren ist in Abbildung 24, A dargestellt. Dabei wird die sukzessive Veränderung der Spektren vom unbelichteten DMNP-EDTA-Cu^{2+} (0 min) zum vollständig photolysierten Komplex (38 min) deutlich. Zusätzlich dazu sind die Absorptionsänderungen der jeweiligen Belichtungszeit (4, 10, 22, 34, 38 min) im Vergleich zur unbelichteten Probe (0 min) in der Abbildung 24, B veranschaulicht. Daraus wird ersichtlich, dass die größte sukzessive Verringerung der

Spektren bei einer Wellenlänge von 370 nm auftrat. Daher wurde die Absorptionsänderung bei 370 nm verwendet, um die Kinetik der Photolyse im Weiteren zu charakterisieren. Zur Analyse der Photolysekinetik wurde die Absorption bei 370 nm in Konzentrationen umgerechnet (s. Kapitel 5.5) und gegen die Belichtungszeit aufgetragen. Zusätzlich wurde die Photolyse des DMNP-ETDA Chelators in Komplexierung mit Ca^{2+}-Ionen bestimmt. Diese Kombination wird seit mehr als zwei Jahrzenten in den Neurowissenschaften eingesetzt (s. Kapitel 1.4) und diente somit als etablierte Referenz. Die Daten sind in Abbildung 24, C dargestellt. Dabei wurden für die einzelnen Datenreihen exponentielle Ausgleichsfunktionen berechnet, deren Bestimmtheitsmaß ausnahmslos 0,99 betrug. Dennoch sollte berücksichtig werden, dass diese spektroskopische Auswertung auf einem einfachen Photolysemodell beruht. Nebenreaktionen, wie beispielsweise kurzlebige Photoprodukte oder die weitere Photolyse von initialen Photoprodukten, werden dabei bewusst nicht berücksichtig, können jedoch nicht ausgeschlossen werden.[161,162] Aus den spektroskopischen Untersuchungen (Abbildung 24, B) und den exponentiellen Photolysekinetiken (Abbildung 24, C) konnten jeweils die Quantenausbeute (Φ_{375nm}), die Zeit für die halbmaximale photolytische Spaltung ($t_{½}$) und der *uncaging* Index ($\varepsilon_{375nm} \times \Phi$) berechnet werden, welche in Tabelle 6 aufgelistet sind (Nähere Angaben zur Ermittlung dieser Werte können der Methodenbeschreibung in Kapitel 5.5.1 und 5.5.2 entnommen werden).

Es zeigte sich, dass die Photolyse des DMNP-EDTA-Cu^{2+} Komplexes langsamer verlief, als die des Ca^{2+}-Komplexes oder des Chelators ohne komplexiertes Kation. Die Zeit für die halbmaximale photolytische Spaltung ($t_{½}$) des DMNP-EDTA-Cu^{2+} Komplexes betrug 519 s und war damit ca. 16-mal höher als beim Ca^{2+}-Komplex. Ähnlich große Unterschiede ergaben sich bei der Photolyse-Quantenausbeute (Φ_{375nm}) und dem *uncaging* Index ($\varepsilon_{375nm} \times \Phi$). Diese betrugen für den Cu^{2+}-Komplex 0,01 (Φ_{375nm}) bzw. 24 ($\varepsilon_{375nm} \times \Phi$) und lagen damit 18- bzw. 17-mal höher als die Werte des Ca^{2+}-Komplexes.

Tabelle 6: Caged compound Eigenschaften von DMNP-EDTA ohne Metallion und in Komplex mit Cu^{2+} und Ca^{2+} (80 µM DMNP-EDTA, 100 µM Cu^{2+} oder Ca^{2+}), gemessen in gepuffertem Wasser (10 mM MOPS, pH 7). Modifiziert nach Kusen et al.[131]

***Caged* compound**	ε_{375nm} [a] $[M^{-1}cm^{-1}]$	Φ_{375nm} [b]	***uncaging* Index** ($\varepsilon_{375nm} \times \Phi$)	$t_{½}$ [c] [s]
DMNP-EDTA	2539 ± 8	0,22 ± 0,02	559	25 ± 6
DMNP-EDTA-Ca^{2+}	2295 ± 5	0,18 (Lit.)*	413	32 ± 2
DMNP-EDTA-Cu^{2+}	2461 ± 10	0,01 ± 0,01	24	519 ± 47

[a] Molarer Extinktionskoeffizient bei 375 nm (Belichtungswellenlängen)

[b] Quantenausbeute bei einer Belichtungswellenlänge von 375 nm

[c] Zeit für die halbmaximale photolytische Spaltung bei (F_0 = 11 mW/cm², λ_{max} = 375 nm)

* der Literatur entnommen (Kaplan und Ellis-Davies, 1988)[78]

Trotz dieser Unterschiede verlief die vollständige Photolyse des DMNP-EDTA-Cu^{2+}-Komplexes innerhalb eines Zeitfensters von ca. 30 Minuten. Die nachfolgenden biologischen Anwendungen wurden von Dr. Georg Wandrey in einem eigens konstruierten *Screening*-System mit einem 5-fach höheren Lichteintrag (F_0 = 53 mW/cm², λ_{max} = 368 nm anstatt F_0 = 11 mW/cm², λ_{max} = 375 nm) durchgeführt. Somit sollte die Freisetzung von ausreichender Menge Cu^{2+} in wenigen Minuten erreicht werden können. Die geringfügig abweichenden maximalen Wellenlängen zwischen der initialen Charakterisierung und den Versuchen im BioLector *Setup* können dabei vernachlässigt werden.[163] Eine direkte Charakterisierung der Photolyse unter denselben Lichtverhältnissen wie für die biologischen Anwendungen konnte aufgrund des minimalisierten BioLector *Setups* nicht durchgeführt werden. Eine regulierte Freisetzung von Cu^{2+}-Ionen mittels Bestrahlung von DMNP-EDTA-Cu^{2+} sollte auf Grundlage dieser Charakterisierung jedoch mit dem zuvor beschriebenen *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystem kompatibel sein.

2.2.4 Optische Expressionsregulation mittels DMNP-EDTA-Cu^{2+} (*caged*-Cu^{2+})

Nach den Untersuchungen der photolytischen Cu^{2+} Freisetzung aus DMNP-EDTA-Cu^{2+} und der Charakterisierung des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionsstammes, wurden beide Elemente kombiniert, um eine lichtregulierte Genexpression zu etablieren.

Der Versuchsablauf wurde analog zur Charakterisierung der kuperinduzierten Expression des Reporterproteins YFP im Reporterstamm *S.c.-pCUP1-YFP* durchgeführt, wobei jedoch die $CuCl_2$-Zugabe ausgelassen wurde. Stattdessen wurde 50 µM DMNP-EDTA-Cu^{2+} (52,6 µM DMNP-EDTA, 50 µM $CuCl_2$) als potentielles Cu^{2+}-Ionen Reservoir vor Kultivierungsbeginn

dem Medium hinzugegeben. Die Induktion erfolgte diesmal durch UVA-Belichtung (F_0 = 53 mW/cm^2, λ_{max} = 368 nm), wiederum am Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (nach 5 h, vgl. Kapitel 2.2.2). Zur Generierung einer Referenz mit maximaler Induktion (s. Kapitel 2.2.2) wurde eine parallele Kultivierung zeitgleich zur Belichtung (nach 5 h Wachstum) mit 50 µM $CuCl_2$ induziert. Während der gesamten Kultivierungszeit im BioLector *Setup* wurden die YFP-Fluoreszenz und die Lichtstreuung aufgezeichnet (s. Abbildung 25).

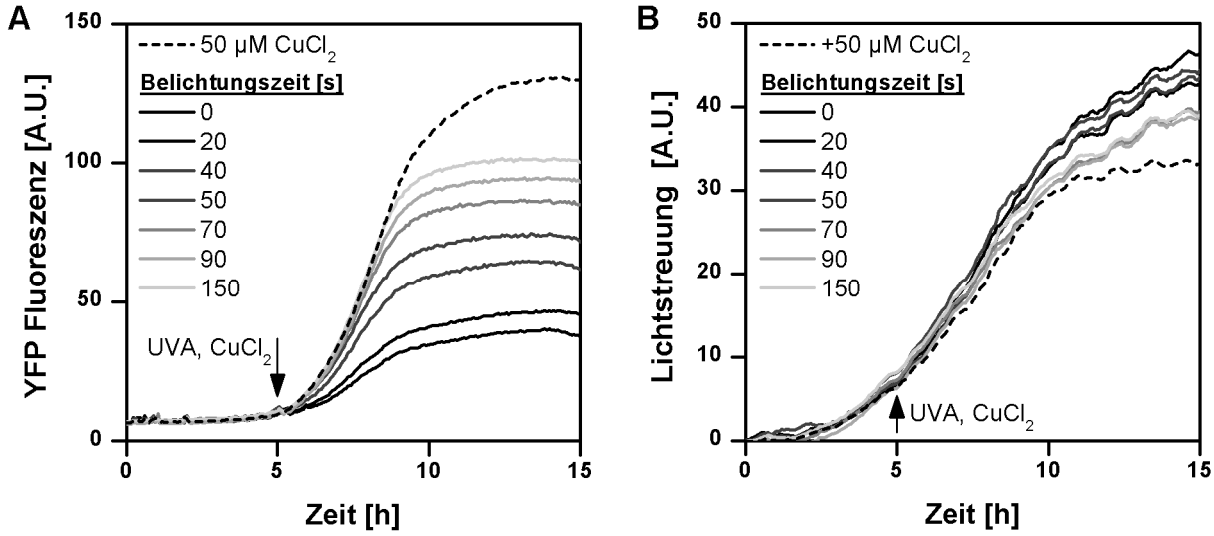


Abbildung 25: Optische Regulation der Genexpression des S.c.–pCUP1-YFP Expressionsstammes mittels DMNP-EDTA-Cu^{2+}. Messung der Daten von Georg Wandrey. (A) Entwicklung der YFP-Fluoreszenz nach UVA-Belichtung (F_0 = 53 mW/cm^2, λ_{max} = 368 nm, 52,6 µM DMNP-EDTA, 50 µM $CuCl_2$) im Vergleich zur einer maximalen Induktion mittels $CuCl_2$-Zugabe (50 µM, gestrichelte Linie). (B) Wachstum der Zellne, beobachtet durch die Entwicklung der Lichtsstreuung. Modifiziert nach Kusen et al.[131]

Der Verlauf der YFP-Fluoreszenz in Abbildung 25, A zeigte, dass es bei Anwesenheit von DMNP-EDTA-Cu^{2+} weder zu einer vorzeitigen Induktion der YFP-Expression noch zu einer Erhöhung der Basalexpression kam. Dies weist darauf hin, dass die Stabilitätskonstante des DMNP-EDTA-Cu^{2+} hoch genug ist, um eine Extraktion der Cu^{2+}-Ionen durch Sensorproteine (wie z. B. den Transkriptionsaktivator Ace1p) oder andere Zell- bzw. Mediumbestandteile zu verhindern. Zusätzlich könnten die Cu^{2+}-Ionen auch durch den Komplex außerhalb der Zellen gehalten werden, wodurch sie dem Zugriff der Sensorproteine entzogen würde. Dies setzt voraus, dass der DMNP-EDTA-Cu^{2+}-Komplex die Zellmembran nicht überwinden kann. Dafür sprechen Untersuchungen zum Calcium-Komplex von DMNP-EDTA (DMNP-EDTA-Ca^{2+}), welche gezeigt haben, dass spezielle Methoden zur intrazellulären Beladung notwendig sind, wie Patchpipetten, Mikroinjektion, oder die Acetyl-Veresterungs-Technik.[164] Dies deutet darauf hin, dass die Membrangängigkeit des Cu^{2+}-Komplexes ebenfalls eher eingeschränkt

ist. Die Lokalisation bzw. Membrangängigkeit des Komplexes wurde jedoch nicht untersucht, weshalb über diese Vorgänge nur nur hypothetische Aussagen getroffen werden können.

Im Gegensatz zur strikten Maskierung (*caging*) der Cu^{2+}-Ionen im unbelichteten Zustand führte eine UVA-Belichtung zu einem unmittelbaren Anstieg des YFP-Fluoreszenzsignals. Damit konnte eine lichtinduzierte Genexpression mittels DMNP-EDTA in *S. cerevisiae* erstmals erfolgreich demonstriert werden. Bei längerer Belichtung wurde eine gesteigerte YFP-Produktion nachgewiesen, die auf die Freisetzung von höheren Mengen an Cu^{2+} und die damit verbundene Steigerung der Induktion zurückzuführen ist. Die maximale Absorption konnte nach 150 s Belichtung gemessen werden, bewirkte jedoch nicht vollständig das YFP-Produktionsniveau der voll induzierten Referenz (50 µM $CuCl_2$-Zugabe). Eine Verlängerung darüber hinaus führte zu keiner weiteren Erhöhung, was auf eine vollständige Photolyse des DMNP-EDTA-Cu^{2+} hinweist. Stattdessen verringerte sich die YFP-Fluoreszenz wieder ab einer Belichtungszeit von 300 s, was auf einen phototoxischen Effekt hindeutet (Daten nicht gezeigt). Innerhalb des regulatorisch notwendigen, Belichtungszeitraums bis 150 s zeigten die Kurven der Lichtstreuung (Abbildung 25, B) nur geringe Abweichungen. Diese verliefen zudem innerhalb der Standardabweichungen, welche in Abbildung 25, B aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht angegeben sind. Dies deutet darauf hin, dass eine lichtvermittelte Induktion der pCUP1-kontrollierten YFP-Expression des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems unter Verwendung von DMNP-EDTA-Cu^{2+} ohne phototoxische Effekte durch die Bestrahlung oder potenziell entstehende Photoprodukte möglich ist.

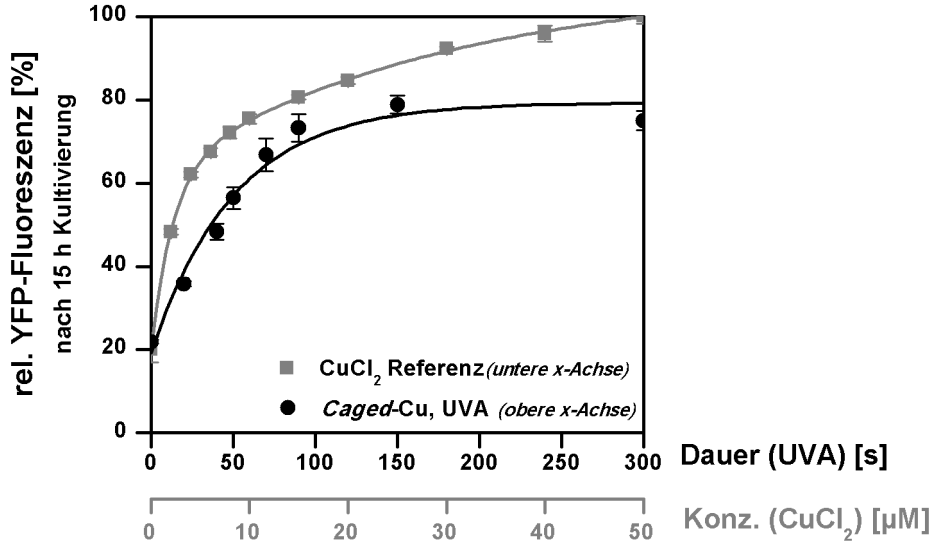


Abbildung 26: Vergleich der maximalen YFP-Fluoreszenzsignale nach 15 h Kultivierung nach manueller (0 - 50 µM $CuCl_2$, graue Werte und untere x-Achse) bzw. optischer Induktion (50 µM DMNP-EDTA-Cu^{2+}, 0 - 300 s UVA, schwarze Werte und obere x-Achse) ab 5 h. Die YFP-Fluoreszenzsignale wurden auf den maximal gemessenen Wert normiert, welcher bei manueller Induktion mittels 50 µM $CuCl_2$ erreicht wurde. Modifiziert nach Kusen et al.[131]

In Abbildung 26 werden die beiden Induktionsmethoden der optischen und manuellen Induktion gegenübergestellt. Dazu wurden die Produktionsmaxima nach 15 h Kultivierung gegen die DMNP-EDTA-Cu^{2+} Belichtungszeit (schwarze Abszisse) bzw. die $CuCl_2$ Konzentration (graue Abszisse) aufgetragen. Zusätzlich wurden die YFP-Fluoreszenzsignale zur besseren Vergleichbarkeit auf den Maximalwert (mit 50 µM $CuCl_2$) normiert. Dabei zeigt sich, dass die Expressionsstärke der optischen Induktion nur ca. 70 % der manuellen Induktion mittels $CuCl_2$-Zugabe erreichte, obwohl nach der vollständigen Photolyse die gleiche Cu^{2+}-Ionenkonzentration vorliegen sollte.

Dieser Effekt könnte durch die entstandenen Photoprodukte des DMNP-EDTA hervorgerufen werden. Betrachtet man den Mechanismus der Photoreaktion (s. Abbildung 22) so entstehen dabei Iminodiessigsäure (IDA) sowie ein Derivat dieser Dicarbonsäure, welche beide über drei potentielle Koordinationsstellen für Cu^{2+}-Ionen verfügen. Für IDA und Cu^{2+} kann daher auch eine Stabilitätskonstante von 10,6 angegeben werden.[142] Dabei handelt es sich um eine Größenordnung, welche vergleichbar ist mit der Affinität anderer biologisch verwendeter Metall-Komplexe. Beispielsweise weist der EDTA-Calcium-Komplex eine Stabilitätskonstante von 11[142] auf und ist damit stabil genug, um die Stimulation von mit Ca^{2+}-Ionen regulierten Zellsysteme zu verhindern.[139,164]

Zur Überprüfung der Hypothese, dass IDA als DMNP-EDTA Photoprodukt die *uncaged* Cu^{2+}-Ionen teilweise bindet und somit die Wirksamkeit als Effektor verhindert, wurde die

Verfügbarkeit der Cu^{2+}-Ionen bei IDA-Zugabe untersucht. Dafür wurde eine Messung der freien Cu^{2+}-Ionen Konzentration mithilfe einer Cu^{2+}-Ionen sensitiven Elektrode durchgeführt. Dazu wurde diese zunächst kalibriert, indem das jeweilige Spannungssignal in gepufferten $CuCl_2$-Lösungen (10 mM MOPS, pH 7) mit unterschiedlichen Konzentrationen aufgezeichnet wurde. Abbildung 27, A zeigt die graphische Auftragung dieser Daten, wobei die Korrelation beider Parameter durch eine exponentielle Funktion hinreichend genau bestimmt werden konnte. Für die weiteren Experimente wurde eine Konzentration von 90 µM $CuCl_2$ ausgewählt. Diese liegt etwa im Mittel des annäherungsweise linearen Bereiches der Korrelationsfunktion und ermöglicht damit eine möglichst sensitive Messung sowohl der Erhöhung als auch der Verringerung der freien Cu^{2+}-Ionen Konzentration.

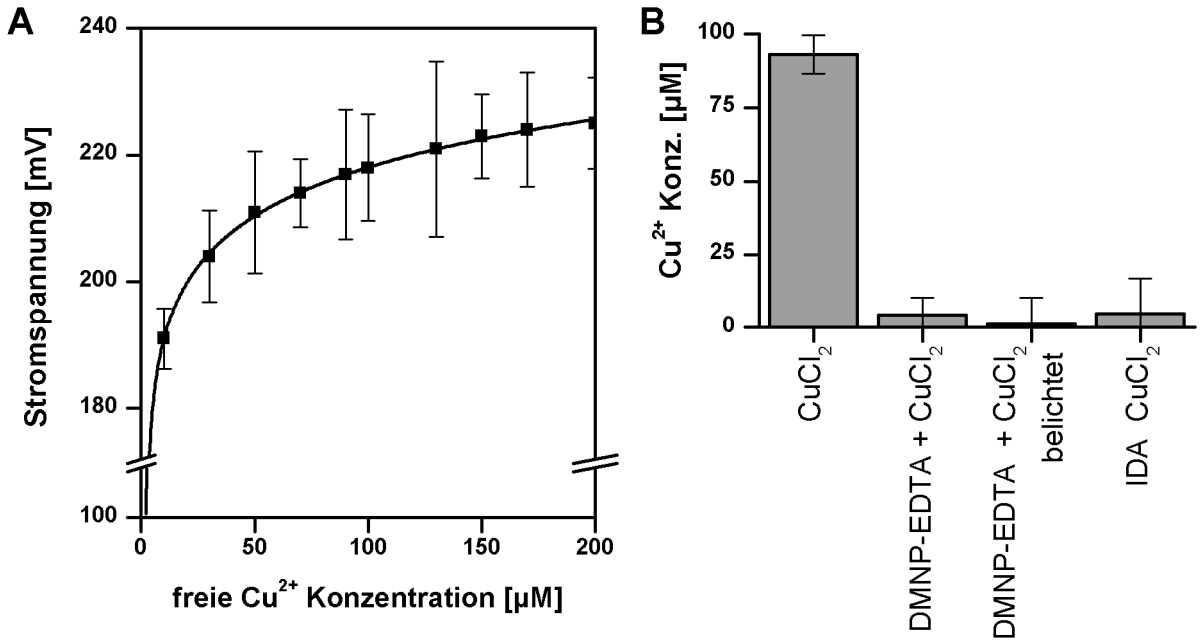


Abbildung 27: Untersuchung der freien Cu^{2+}-Ionen Konzentrationen mithilfe einer kupfersensitiven Elektrode. (A) Kalibrierung der Elektrode unter Verwendung unterschiedliche konzentrierten $CuCl_2$-Lösungen (0 - 200 µM). (B) Freie Cu^{2+} Konzentration (Ausgangskonzentration 90 µM) bei Zugabe von DMNP-EDTA (90 µM) und anschließender Belichtung(F_0 = 11 mW/cm², λ_{max} = 375 nm, 30 min) sowie nach Zugabe von IDA (90 µM).

Im Anschluss daran wurde die freie Cu^{2+}-Ionen Konzentration unter verschiedenen Bedingungen gemessen, um die Auswirkungen von DMNP-EDTA, dessen Belichtung und einer direkten IDA-Zugabe zu untersuchen. Als Referenz wurde eine gepufferte (10 µM MOPS, pH 7) $CuCl_2$-Lösung (90 µM) vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27, B präsentiert und zeigen, dass die Zugabe von DMNP-EDTA (90 µM) zu einer nahezu vollständigen Verringerung der freien Cu^{2+} Konzentration führt. Dies spricht für die Ausbildung von stabilen DMNP-EDTA-Cu^{2+} Komplexen. Trotz der anschießenden Belichtung (F_0 = 11 mW/cm², λ_{max} = 375 nm, 30 min) dieser Lösung und des darin enthaltenen DMNP-

EDTA-Cu^{2+} Komplexes konnte mit Hilfe der Cu^{2+}-Ionen sensitiven Elektrode keine messbare Freisetzung von Cu^{2+}-Ionen festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Photoprodukte des DMNP-EDTA weiterhin stabile Komplexe mit Cu^{2+}-Ionen ausbilden, welche eine Erfassung durch die Cu^{2+}-Ionen sensitiven Elektrode verhindern. Darauf folgend wurde eine $CuCl_2$-Lösung (90 µM) mit der gleichen Konzentration an IDA (90 µM) versehen. Das Signal zeigt einen vergleichbar geringen Wert wie die zuvor gemessene DMNP-EDTA-Cu^{2+} Probe nach Belichtung. Dies zeigt, dass IDA ebenfalls stabile Komplexe mit Cu^{2+}-Ionen bildet. Somit könnte IDA dafür verantwortlich sein, dass nach der Belichtung des DMNP-EDTA-Cu^{2+} Komplexes keine messbare Freisetzung von Cu^{2+}-Ionen mit Hilfe der Cu^{2+}-Ionen sensitiven Elektrode festgestellt werden konnte.

Es kann also vermutet werden, dass die Photoprodukte des DMNP-EDTA eine immer noch relevante Affinität zu den Cu^{2+}-Ionen besitzen. Dadurch könnte die Verfügbarkeit der Cu^{2+}-Ionen für das *CUP1*-Expressionssystem verringert sein, was die leicht verminderte Expressionsstärke erklären würde.

2.2.5 *Screening* des Induktionszeitpunkts mittels optischer Regulation

Nachdem die optische Regulation der Genexpression mittels DMNP-EDTA-Cu^{2+} erfolgreich etabliert wurde, sollte diese Technologie für die automatisierte Charakterisierung des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems genutzt werden. Dabei wurde das Potential genutzt, welches die lichtregulierte Genexpression auf dem Gebiet der Automatisierung birgt. Im Gegensatz zum manuellen Pipettieren kann anstelle von mechanischen Operationen die Schaltung von stationären Lichtquellen verwendet werden. Dieser Vorteil wurde durch die Kombination des optischen Expressionssystems mit dem BioLector *Setup* genutzt. Dabei ermöglichte der Einsatz von individuell regelbaren LEDs die parallele Durchführung von 48 unabhängigen Belichtungsschemata. Somit konnten alle im Folgenden gezeigten Daten durch einen einzigen Versuchsdurchlauf mit 48 parallelisierten Einzelkultivierungen innerhalb von 15 h generiert werden. Dieser Versuchsablauf wurde weiter genutzt, um mögliche Auswirkungen des Induktionszeitpunktes auf den Verlauf der Genexpression des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems zu charakterisieren. Dabei wurden alle Einzelkultivierungen vor Beginn der Kultivierung mit 50 µM DMNP-EDTA-Cu^{2+} versehen. Anschließend erfolgte die Belichtung (F_0 = 53 mW/cm^2, λ_{max} = 368 nm, 100 s) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung.

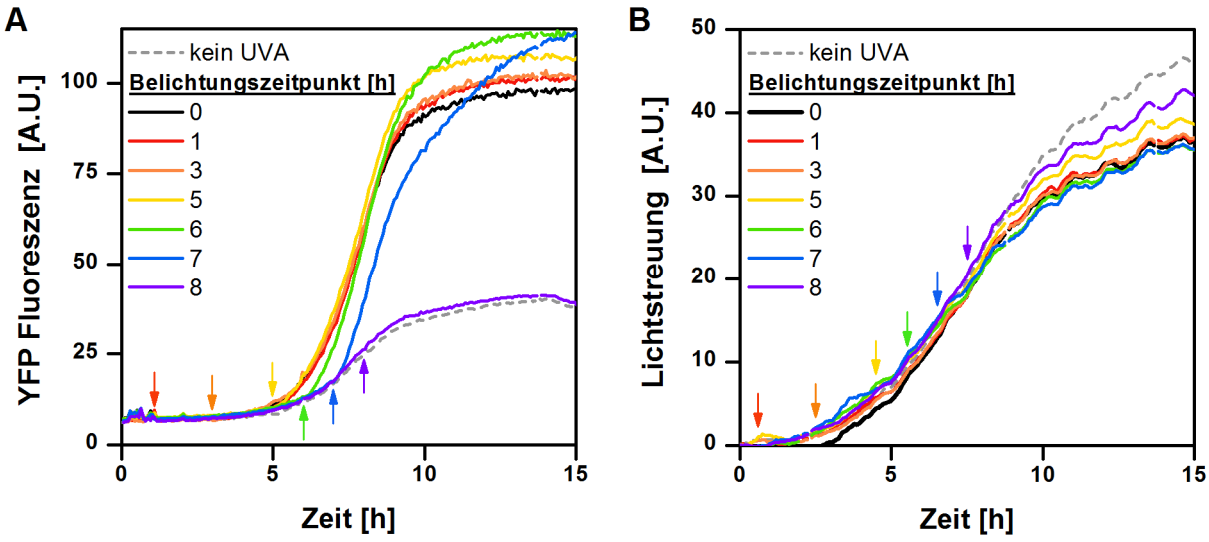


Abbildung 28: Einfluss des Induktionszeitpunktes auf die Genexpression von YFP unter Kontrolle von pCUP1 nach lichtvermittelter Freisetzung des Induktors. Messung der Daten von Georg Wandrey. (A) Entwicklung der YFP-Fluoreszenz nach optischer Induktion (F_0 = 53 mW/cm^2, λ_{max} = 368 n, 100 s) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 - 8 h) aus einem zu Beginn der Kultivierung zugegeben DMNP-EDTA-Cu^{2+} Reservoir (50 µM). (B) Parallel aufgenommenes Streulichtsignal zur Beobachtung der Zelldichte. Modifiziert nach Kusen et al.[131]

Abbildung 28, A zeigt den Verlauf des YFP-Fluoreszenzsignals während des gesamten Versuches für ausgewählte, exemplarische Kultivierungen. Durch den Versuchsdurchlauf wurden deutlich mehr Induktionszeitpunkte getestet werden, welche der Übersichtlichkeit halber aber nicht dargestellt sind. Es zeigte sich, dass die Regulation nur in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase zwischen 5 und 7 h möglich war. In dieser Zeitspanne führte die Belichtung zu einer unmittelbaren Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Dabei konnte die maximale Induktion bei einer Belichtung nach 6 bzw. 7 h Wachstumsdauer erreicht werden. Dies entspricht einer Erhöhung der YFP-Produktion um 18 % im Vergleich zu 0 h und 5 - 6 % mehr YFP im Vergleich zum bisher verwendeten Standardbelichtungszeitpunkt (nach 5 h). Belichtungen vor der exponentiellen Wachstumsphase (0 - 4 h) führten zu keiner früheren Induktion. Die Genexpression startete stattdessen verzögert erst nach 5 h. Im Gegensatz dazu führte eine spätere Belichtung ab 8 h zu keiner Steigerung der YFP-Produktion im Vergleich zur unbelichteten Probe. Folglich scheint die Induktion der Genexpression unter den gegebenen Bedingungen nur in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase möglich zu sein. Die Streulichtdaten in Abbildung 28, B zeigen zudem allesamt sehr ähnliche Kurvenverläufe, insbesondere in der exponentiellen Wachstumsphase. Ein Einfluss des Induktionszeitpunktes auf das Wachstum der Zellen konnte daher nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der Induktionszeitpunkt für die Ansprechbarkeit des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems von großer Bedeutung ist und sich zudem auf die finale YFP-Produktion auswirkt. Eine Regulation des Expressionsstarts war nur innerhalb der mittleren exponentiellen Wachstumsphase möglich, wobei eine maximale YFP-Produktion bei einer Induktion nach 6 - 7 h erreicht wurde. Somit ermöglichte die optische Expressionsregulation ein präzises *Screening* des Induktionszeitpunktes mittels eines einzigen Versuchsdurchlaufs innerhalb von 15 h. Dadurch konnte anhand dieses Anwendungsbeispiels das Potential der optischen Genregulation zur automatisierten Optimierung und Charakterisierung von wichtigen Expressionsparametern demonstriert werden. Neben der vereinfachten Automatisierung ermöglicht die optische Schaltung, im Gegensatz zum mechanischen Pipettieren, die Kultivierung in einem strikt geschlossenen System. Daher kann während der gesamten Kultivierung eine kontinuierliche Durchmischung und konstante Abdichtung gewährleistet werden. Somit könnte das lichtregulierte Expressionssystem auch weitere Anwendungen finden, bei denen die Aufrechterhaltung einer definierten Atmosphärenzusammensetzung (Sauerstoffgehalt, etc.) von besondere Bedeutung ist.

Durch den einfachen genetischen Aufbau und die gute kommerzielle Verfügbarkeit des *caged-compound* sind zudem gute Voraussetzungen gegeben, damit das Potential des lichtregulierten, DMNP-EDTA-Cu^{2+}-basierte *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems zukünftig eine breite Anwendung finden kann.

2.2.6 Alternatives *caged*-Cu^{2+} (3Gcage-Cu^{2+})

Im Zuge dieser Arbeit sollte neben dem kommerziell erhältlichen DMNP-EDTA (**29**) ein weiteres *caged compound* getestet werden. Dieses wurde selbstständig synthetisiert und sollte die Bandbreite an möglichen *caged compounds* für die kufperinduzierte optische Regulation des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems erhöhen. Als Alternative zum DMNP-EDTA (**39**) sollte ein Stickstoff-reicher Pyridylamin-Pyridylamid Ligand hergestellt werden. Dabei handelte es sich um Pyridin-2-carbonsäure-*N*-{1-[2-nitrophenyl]-3-[(pyridin-2-ylmethyl)amino]propyl}picolinamid (**41**), welcher von Ciesienski *et al.* entwickelt und als 3Gcage (**41**) bezeichnet wurde.[165] Die Synthese und Verwendbarkeit in biologischen Systemen wurden bereits durch die Arbeitsgruppe von Katherine J. Franz beschrieben[165–167]

und sollten auf die im vorangegangen Kapitel (vgl. Kapitel 2.2.3 und 2.2.4) gezeigte lichtregulierte Genexpression angewendet werden.

Abbildung 29 ist die Bildung des 3Gcage-Cu^{2+} (**42**) Komplexes veranschaulicht, welcher durch die Koordinierung eines Cu^{2+}-Ions über vier Stickstoffatome des 3Gcage (**41**) zustande kommt. Die Bestrahlung mit UVA-Licht bewirkt anschließend die photolytische Spaltung in zwei Fragmente (**43**, **44**) und die Freisetzung des Cu^{2+}-Ions. Dieser Mechanismus könnte also analog zu den DMNP-EDTA-Cu^{2+}-Versuchen (vgl. Kapitel 2.2.3 und 2.2.4) zur lichtregulierten Freisetzung von Cu^{2+} verwendet werden.

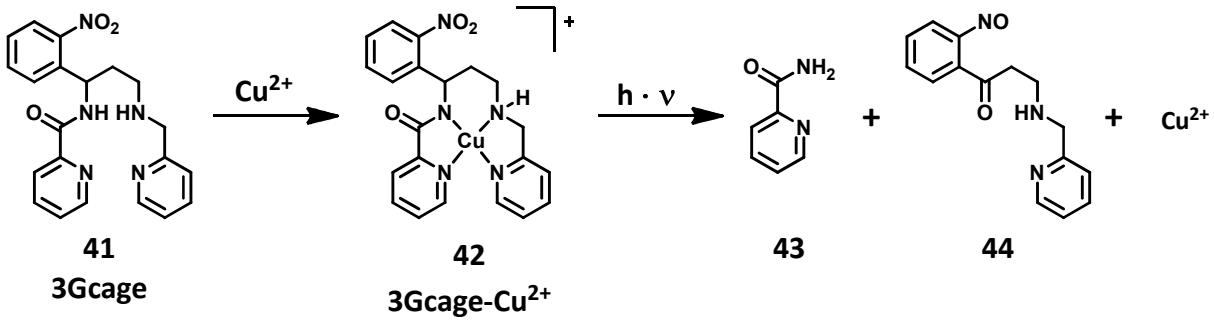


*Abbildung 29: Komplexierung und photolytische Spaltung von 3Gcage Pyridin-2-carbonsäure-N-{1-[2-nitrophenyl]-3[(pyridin-2-ylmethyl)Amino]propyl}picolinamid, **41**] mit Cu^{2+} nach L. Ciesienski et al. (2010)*[165]

Insgesamt wurden drei unterschiedliche Strategien zur Synthese des 3Gcage verfolgt, wobei lediglich die Letzte zum gewünschten Produkt führte. Zu Beginn wurde eine Synthese nach der Vorschrift von Ciesienski *et al.* durchgeführt (Abbildung 30).[165] Dabei sollte der Alkohol **50** durch eine Eintopf-Synthese in vier Schritten erhalten werden. Der Ablauf der einzelnen Reaktionsschritte konnte ohne Vergleichsspektren der gereinigten Zwischenstufen jedoch nur schwer nachvollzogen werden. Folglich enthielt das Endprodukt eine Vielzahl von Substanzen, welche säulenchromatographisch nicht in ausreichenden Mengen voneinander getrennt werden konnten. Vermutlich wäre dazu eine Reinigung mittels HPLC, wie in der entsprechenden Literatur beschrieben, nötig gewesen. Die Kapazität dieser Methode ist jedoch eingeschränkt und hätte nur schwer ausreichende Mengen für biologische Untersuchungen liefern können. Daher wurde diese Synthesestrategie nicht weiter verfolgt.

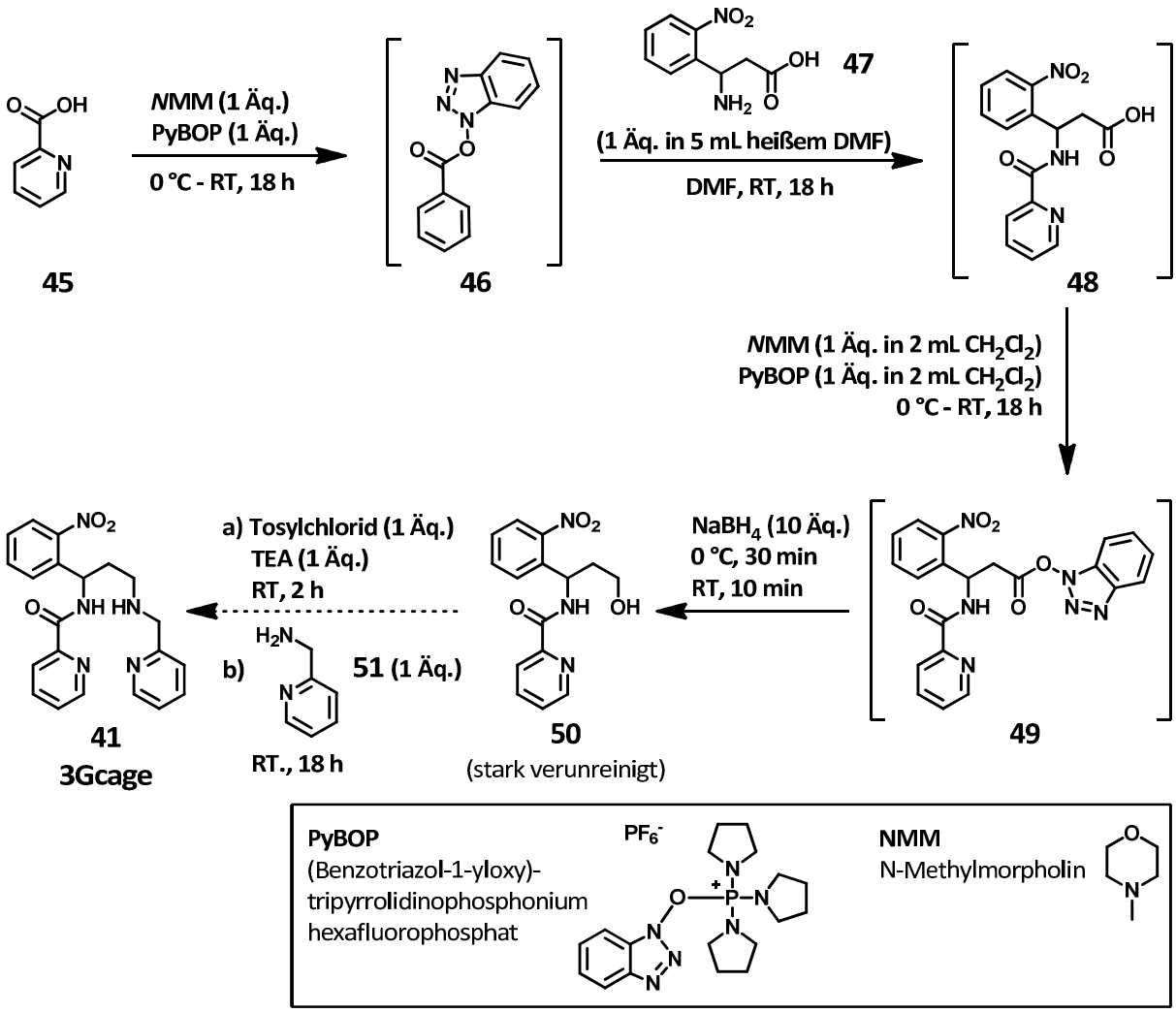


*Abbildung 30: Synthesestrategie 1 zur Herstellung von 3Gcage (**41**) nach Ciesienski et al.*[165]

Im Anschluss daran wurde eine Synthese nach Kumbhar *et al.* angestrebt (Abbildung 31).[166] Diese im selben Arbeitskreis von Franz entstandene Syntheseroute beinhaltet die Reinigung und Isolation aller Zwischenstufen mit säulenchromatographischen Methoden. Die Verwendung von HPLC-Methoden sollte somit umgangen werden. Es konnte jedoch lediglich die Amidierung als erste Stufe mit dem Produkt **48** erfolgreich durchgeführt werden. Die Ausbeute lag dabei nur bei 37 % und könnte gegebenenfalls auf eine Polykondensation des Säureamids (**47**) zurückzuführen sein. Der darauffolgende Reaktionsschritt unter Verwendung von Ethylchloroformiat und Natriumborhydrid zur Reduktion der Carbonsäure war nicht erfolgreich. Es kam zu Bildung von sehr vielen Nebenprodukten, wodurch der gewünschte Alkohol **50** nicht isoliert werden konnte.

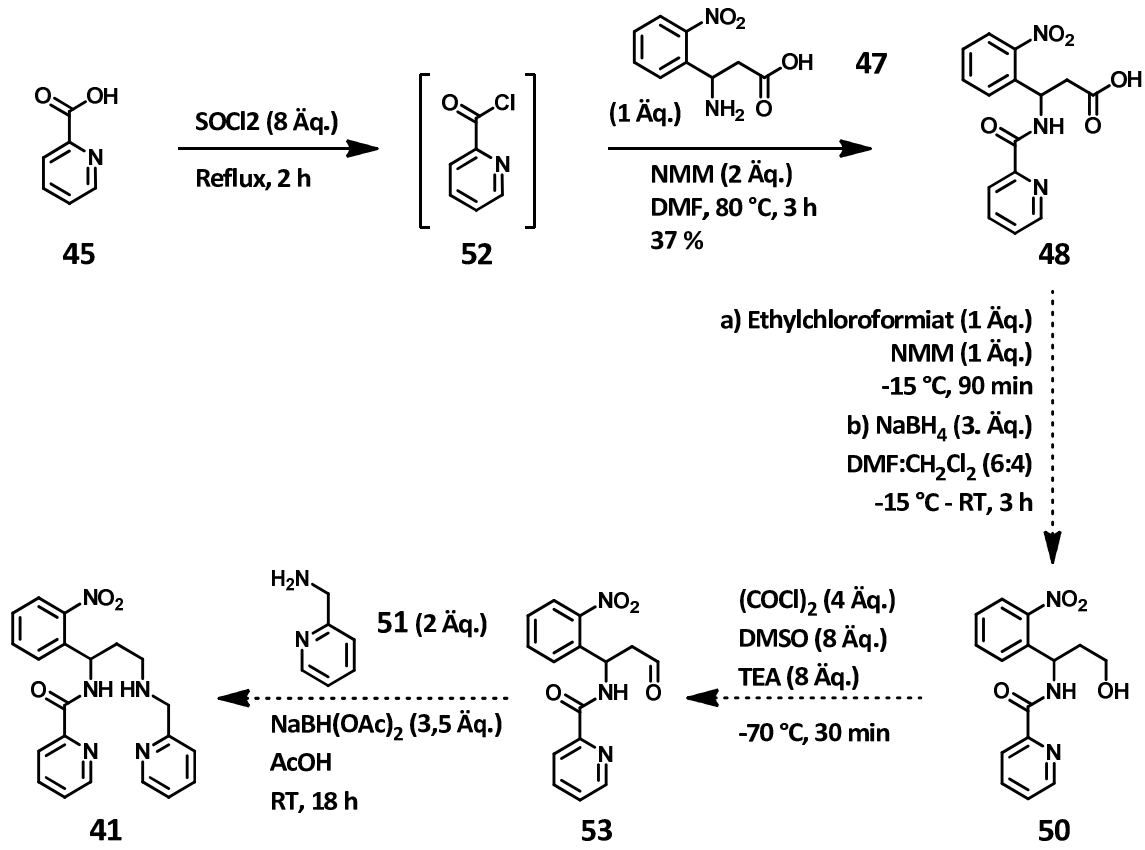


*Abbildung 31: Synthesestrategie 2 zur Herstellung von 3Gcage(**41**) nach Kumbhar et al.* [166]

Aufgrund dessen wurde eine eigene Synthesestrategie entwickelt, welche in Abbildung 32 dargestellt ist. Zur Vermeidung der möglichen Polykondensation wurde die Reduktion der Carbonsäure **47** vor dem Amidierungsschritt durchgeführt. Diese Reduktion zur Verbindungt **54** konnte unter Verwendung von Natriumborhydrid und Methansulfonsäure in Ausbeuten von 84 % vollzogen werden, womit zudem die Verwendung des toxischen Ethylchloroformiat vermieden werden konnte. Zusätzlich ermöglichte die vorgezogene Reduktion die Parallelisierung der ersten beiden Reaktionsschritte, wodurch das Carbonsäurechlorid **52** zeitgleich hergestellt werden konnte. Die anschließende Amidierung zur Verbindung **50** verlief in Vergleich zur Synthesestrategie 2 mit deutlich verbesserten Ausbeuten von 80 %. Dies könnte neben der Vermeidung der Polymerisation auf die verbesserte Löslichkeit des Amins, den damit verbundenen Wechsel zum Lösungsmittel Chloroform und die Verwendung von TEA anstatt *N*MM zurückzuführen sein. Die folgende Oxidation zum Aldehyd **43** wurde abweichend von Kumbhar *et al.*[166] nicht mittels *Swern*-Oxidation, sondern mit *Dess-Martin*-Perodinan durchgeführt. Die Vollständigkeit der Reaktion konnte dabei mittels NMR-Analysen nachvollzogen werden. Das Produkt wurde über Silikagel filtriert und sofort für die anschließende reduktive Aminierung eingesetzt.

Dabei konnte nach Testung von unterschiedlichen Borhydriden das Zielprodukt (3Gcage, **41**) mit einer maximalen Ausbeute von 54 % unter Verwendung von Natriumtriacetoxyborhydrid erzielt werden.

Zusammengefasst konnte der 3Gcage in ausreichenden Mengen für die folgenden biologischen Versuche mit einer Gesamtausbeute von 36 % über fünf Stufen erfolgreich synthetisiert werden.

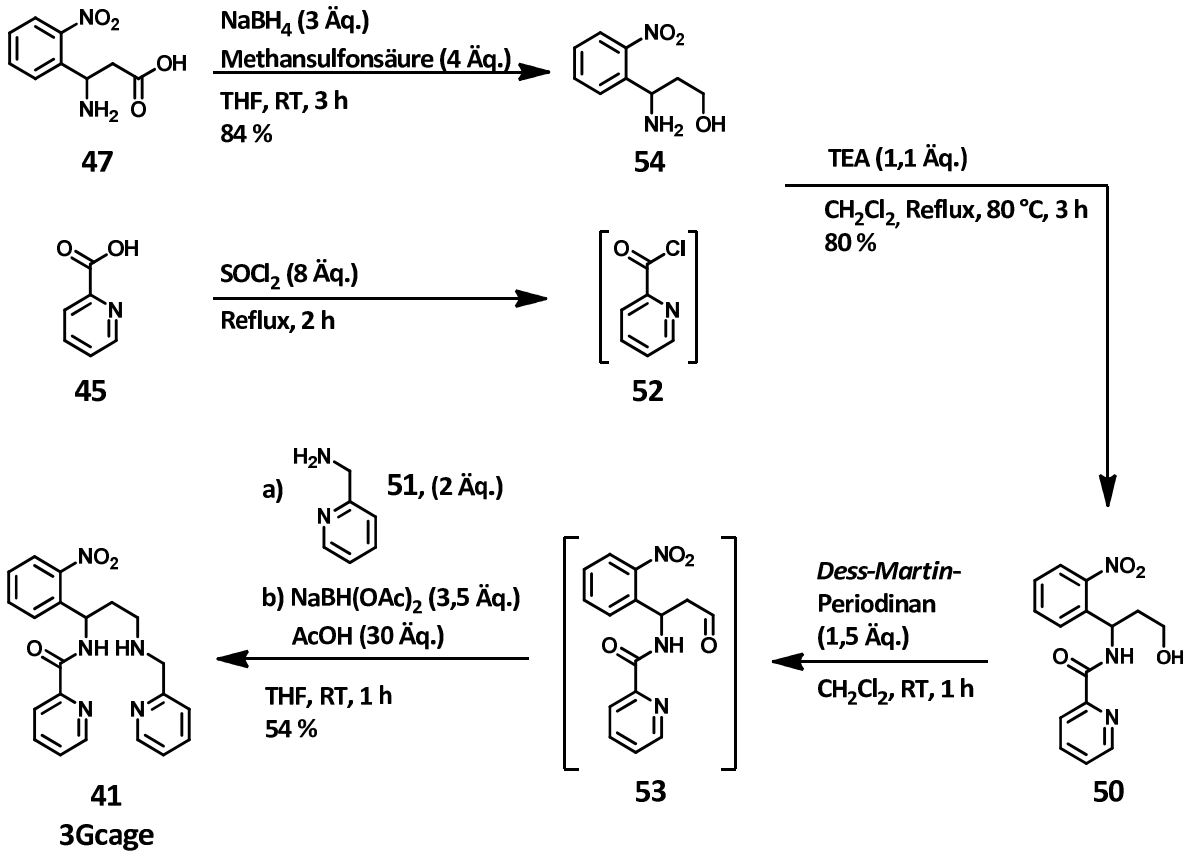


*Abbildung 32: Synthesestrategie 3: Herstellung des 3Gcage (**31**) mittels einer modifizierten Methode nach Kumbhar et al.*[166]

Nach der erfolgreichen Synthese des 3Gcage-Cu^{2+} (**42**) sollte dessen Anwendbarkeit für die lichtregulierte Genexpression *in vivo* getestet werden. Dazu wurde ein Expressionsversuch analog zu den Versuchen mit DMNP-EDTA-Cu^{2+} im BioLector *Setup* durchgeführt (s. Abbildung 33). Vor Beginn der Kultivierung wurden die *S.c.-pCUP1-YFP* Kulturen jedoch nicht mit 50 µM DMNP-EDTA-Cu^{2+}, sondern mit 100 µM 3Gcage-Cu^{2+} versetzt. Nach Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kultivierungsansätze belichtet (F_0 = 11 mW/cm^2, λ_{max} = 375 nm, 20 min). Die Ergebnisse der YFP-Fluoreszenzentwicklung zeigen, dass die 3Gcage-Cu^{2+}-versetzten Kulturen (durchgezogene Linien) zu Beginn der Kultivierung deutlich mehr YFP-Protein bildeten als die

3Gcage-Cu^{2+}-freien Referenzen (gestrichelte Linien). Dies spricht dafür, dass es bereits ohne Belichtung zu einer Induktion der Genexpression kam. Zudem war bei den 3Gcage-Cu^{2+}-versetzten Kulturen nach der Belichtung keine weitere Steigerung des YFP-Signals zu beobachten. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von $CuCl_2$ nach der gleichen Kultivierungszeit bei den Referenzkulturen zu einer sehr deutlichen Erhöhung des YFP-Fluoreszenzsignals. Dies zeigt, dass die Genexpression zu diesem Kultivierungszeitpunkt generell noch induziert werden konnte.

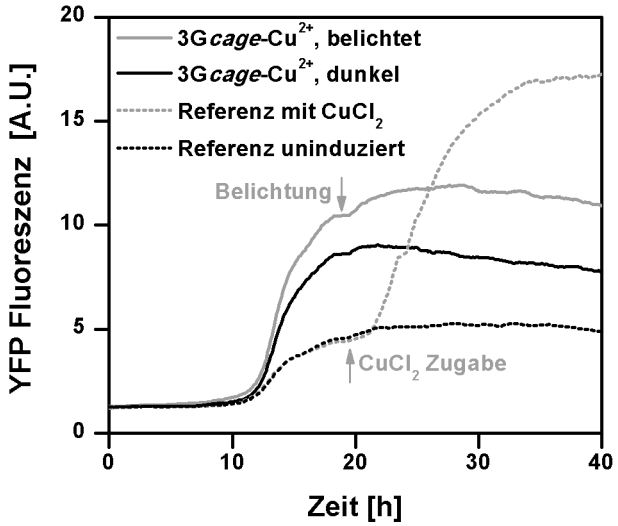


Abbildung 33: Untersuchung der Eignung von 3Gcage-Cu^{2+} zur lichtregulierten Genexpression des S.c.-pCUP1-YFP Expressionssystems (mit BioLector Setup und SC-Medium). Dargestellt ist die Entwicklung des YFP-Fluoreszenzsignals bei Induktion in der mittlere exponentiellen Wachstumsphase mittels 3G-caged-Cu^{2+} (100 µM vor Kultivierungsbeginn zugegeben, F_0= 11 mW/cm², λ_{max} = 375 nm, 20 min) im Vergleich zur Referenz ohne Induktor bzw. mit $CuCl_2$ (50 µM).

Es deutet also viel darauf hin, dass der 3Gcage nicht in der Lage war, die Cu^{2+}-Ionen ausreichend zu „maskieren“, um eine verfrühte Induktion der Expression vor der Belichtung zu verhindern. Als Ursache kommt in Betracht, dass der 3Gcage durch Bestandteile der Kultivierungsansätze gespalten bzw. modifiziert wurde und dadurch seine Affinität zu den Cu^{2+}-Ionen verlor. Der 3Gcage verfügt zwar nicht über klassische Angriffspunkte von Biomolekülen wie z. B. Ester- oder Alkohol-Funktionen, weshalb diese Möglichkeit aber dennoch nicht ausgeschlossen werden kann. Alternativ könnte die Stabilität des 3Gcage-Cu^{2+} zu gering sein, um eine Extraktion der Cu^{2+}-Ionen und damit eine Interaktion mit dem Cu^{2+}-Sensorprotein Ace1p zu verhindern. Einen Hinweis darauf liefert ein Vergleich der Cu^{2+} Bindungskonstanten vom 3Gcage ($K_d = 1{,}8 \times 10^{-16}$ M)[165] und dem Ace1-Sensorprotein ($K_d = 4{,}7 \times 10^{-18}$ M)[145] des S.c.-*pCUP1-YFP* Expressionssystems (vgl. Kapitel 2.2.1). Dabei zeigt Ace1p eine geringere Bindungskonstante mit einem Unterschied von fast zwei Magnituden,

was für eine bevorzugte Bildung von Ace1p-Cu^{2+}-Komplexen spricht. Der 3Gcage-Cu^{2+}-Komplex stellte sich somit unter den getesteten Bindungen als ungeeignet heraus, um eine lichtregulierte Induktion des *S.c.-pCUP1-YFP Expressionssystem* zu ermöglichen.

2.3 Zwei-Wellenlängen-Regulation mittels *caged*-EDTA

Die Experimente zur Abbildung 35 wurden im Rahmen dieser Dissertation zunächst als Vorversuchen im BioLector Setup durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die dargestellten Daten der Abbildung 35 beziehen sich auf Experimente die anschließend im Rahmen einer Kooperation [BMBF, FKZ: 031A167A, Neue Optosensoren und Photoregulatoren zur lichtvermittelten Steuerung und Analyse molekularer Systeme (OptoSys)] von Dr. Georg Wandrey mit einem eigens konstruierten Screening-System durchgeführt wurden. Details zur Versuchsdurchführung können der gemeinsamen Publikation[131] *und dem Kapitel 5.3.4 entnommen werden.*

Zusätzlich zur Etablierung alternativer *caged*-Cu^{2+} Derivate wurde eine Weiterentwicklung der lichtregulierte Genexpression des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems in Kombination mit DMNP-EDTA-Cu^{2+} geprüft. Die optische Regulation des *pCUP1*-Expressionssystems mittels DMNP-EDTA-Cu^{2+} konnte in Kapitel 2.2 bereits erfolgreich demonstriert werden. Dabei wurde die einmalige Induktion der Genexpression mittels UVA-Bestrahlung gezeigt. Eine reversible Regulation der Genexpression, also ein nachgeschaltetes lichtvermitteltes Ausschalten der Expression dieses *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems nach erfolgreicher Induktion, wurde bis jetzt noch nicht beschrieben. Daher wurde im Folgenden eine Strategie entworfen, um eine reversible Regulation des *pCUP1*-Expressionssystems zu ermöglichen. Dabei sollte die Induktion und Repression separat durch zwei unterschiedliche Lichtfarben, also durch Bestrahlung mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge, kontrolliert werden.

Eine solche Schaltung würde eine präzise Modifikation der Genexpression ermöglichen, durch die das Expressionslevel aktiv angepasst werden könnte. Dies wäre zum einen hilfreich, wenn die Menge an Zielenzym, die produziert werden soll, limitiert werden muss. Ein solcher Fall ist etwa gegeben bei der Produktion von toxischen Proteinen oder Metaboliten sowie bei sequentiellen Reaktionen *in vivo*, bei denen zwei oder mehrere Enzyme erst nacheinander exprimiert werden. Zum anderen wäre ein Einsatz der reversiblen Schaltung sinnvoll, wenn die Menge an Zielenzym, die produziert werden soll, unbekannt ist oder stetig angepasst werde muss. Ein Anwendungsbeispiel dabei sind *in vivo* Reaktionskaskaden oder Metabolismusmodifikationen, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit von zwei oder mehrere Enzyme möglichst genau abgestimmt

werden muss. Dies ist nötig, um die Anreicherung von toxischen oder hemmenden Intermediaten zu vermeiden und so den *metabolic flux* und damit die Umsatzrate der Verbindungen durch den Stoffwechselweg bzw. die Reaktionskaskade zu optimieren.

Die Strategie zur Generierung einer reversiblen Regulation des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems basiert auf dem Einsatz von zwei antagonistischen *caged compounds*, welche durch Licht unterschiedlicher Wellenlänge photolysiert werden können. Das eine soll dabei der Cu^{2+}-Ionen Freisetzung und damit der Aktivierung der Expression, das andere wiederum dem erneuten Einfangen der Cu^{2+}-Ionen und so dem Ausschalten der Expression dienen.

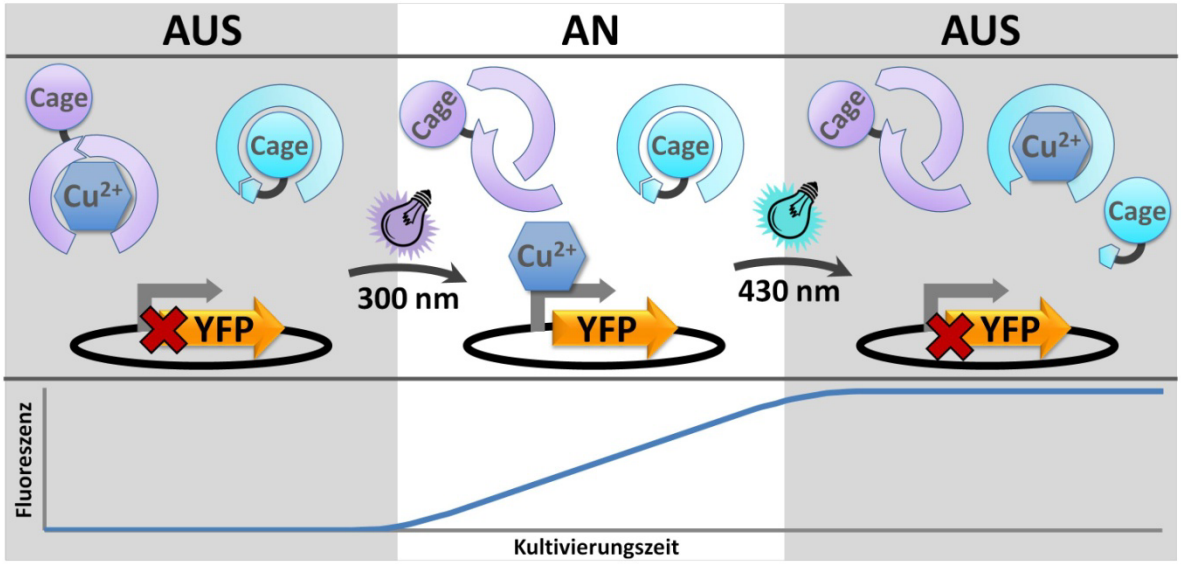


Abbildung 34: Strategie der reversiblen Regulation des S.c.-pCUP1-YFP Expressionssystems mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen. Theoretisch führt die Bestrahlung mit ca. 300 nm zur Spaltung des ersten caged compound und damit zur Freisetzung von Cu^{2+}-Ionen, welche zur Induktion des CUP1-Promotors führen. Die anschließende Bestrahlung mit ca. 430 nm soll die photolabile Schutzgruppe vom zweiten caged compound abspalten und einen Cu^{2+}-Chelator freisetzen, welcher die Cu^{2+}-Ionen wieder komplexieren und die Genexpression damit ausschalten soll.

Abbildung 34 zeigt die Strategie nach der die reversible Regulation stattfinden soll. Dabei liegt das System zunächst im Grundzustand ohne Genexpression, bei dem beide *caged compounds* intakt vorliegen. Dabei handelt es sich um das bereits beschriebene DMNP-EDTA-Cu^{2+} (*caged*-Cu^{2+}) und um ein *caged*-EDTA Derivat. Die Bestrahlung mit 300 nm bewirkt zunächst die Photolyse des *caged*-Cu^{2+}und die damit verbundene Freisetzung von Cu^{2+}-Ionen, wodurch die Expression von *CUP1*-Promotor-kontrollierte Genen aktiviert wird. Im Anschluss daran bewirkt eine Belichtung mit 430 nm die Photolyse des *caged*-EDTA. Die

daraus resultierende Freisetzung von EDTA führt zur Komplexierung der Cu^{2+}-Ionen und damit zur Deaktivierung der Genexpression.

Die entwickelte Strategie beruhte damit auf zwei essentiellen Kriterien. Zum einen auf der Annahme, dass die Zugabe von EDTA eine durch Cu^{2+}-Ionen induzierte Genexpression wieder reprimieren kann. Zum anderen auf der Möglichkeit, die beiden *caged compounds* durch Licht unterschiedlicher Wellenlängen separat zu photolysieren. Beide Aspekte wurden im Folgenden untersucht.

2.3.1 Reversible Regulation mittels EDTA

Zur Untersuchung des ersten Kriteriums wurde die Regulation des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems mit den reinen Effektoren (Cu^{2+}, EDTA), welche theoretisch durch die Bestrahlung freigesetzt würden, getestet.

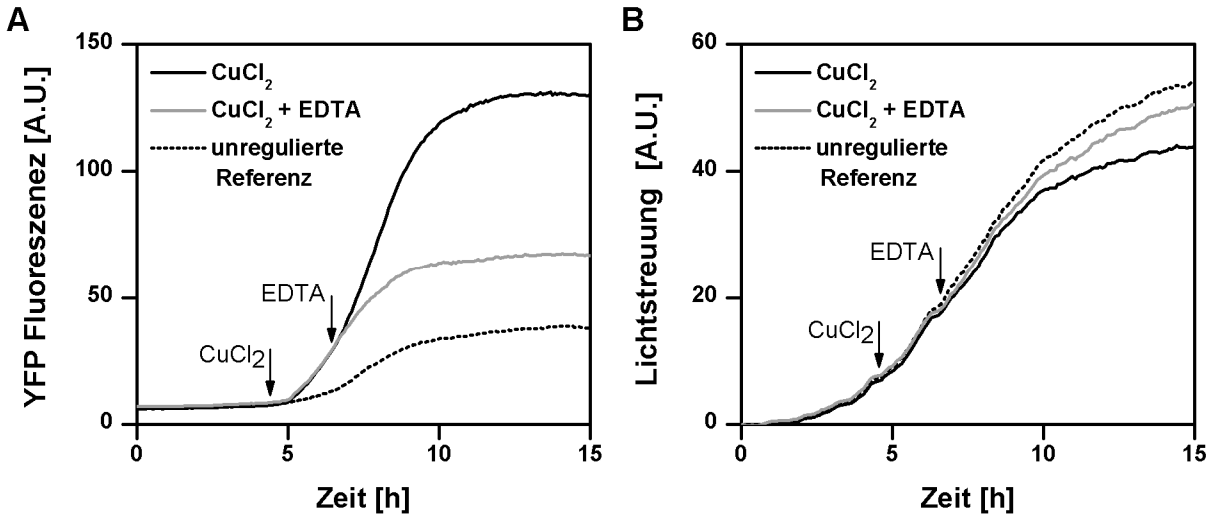


Abbildung 35: Reversible Regulation des S.c.*-pCUP1-YFP Expressionssystems durch die Verwendung von EDTA. Messung der Daten von Georg Wandrey. A) Entwicklung des YFP-Fluoreszenzsignals nach Induktion mit 50 µM $CuCl_2$ und anschließender Reprimierung mit 100 µM EDTA (n SC-Medium). B) Parallel aufgezeichnetes Streulichtsignal zur Beobachtung des Zellwachstums.*

Dazu wurde die Genexpression einer *S.c.-pCUP1-YFP* Zellkultivierung nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase durch $CuCl_2$ Zugabe (50 µM) induziert. Im Folgenden wurde nach ca. zwei Stunden Expression EDTA (100 µM) zugegeben, um die Expression zu stoppen. Während der Versuche im BioLector wurden die YFP-Fluoreszenz und das Zellwachstum (Lichtstreuung) in Echtzeitmessungen verfolgt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 präsentiert. Die Messung der YFP-Fluoreszenzen zeigt nach Zugabe von $CuCl_2$ einen raschen Anstieg des Fluoreszenzsignals, was für eine

erfolgreiche Induktion der Genexpression spricht. Die anschließende EDTA-Zugabe führte nach ca. einer Stunde zu einem deutlichen Abflachen des YFP-Fluoreszenzsignals. Dies führte im Vergleich zur Referenz ohne EDTA-Zugabe zu einem ca. 50 % geringen Endniveau der YFP-Fluoreszenz nach 15 h Kultivierung. Die Wachstumskurven in Abbildung 35, B zeigen einen gleichmäßigen Verlauf mit annähernd einheitlichen Wachstumsraten während der exponentiellen Wachstumsphase. Somit lässt sich ein bedeutender Einfluss der Cu^{2+}- / EDTA-Regulation auf die Vitalität der Zellen nicht erkennen.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass eine durch $CuCl_2$ induzierte Genexpression durch Zugabe von EDTA reprimiert werden konnte. Somit konnte die reversible Regulation des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems durch die Verwendung von EDTA erfolgreich demonstriert werden. Dadurch konnte das erste Kriterium der beschriebenen Strategie zur reversiblen lichtregulierten Genexpression erfüllt werden.

2.3.2 Synthese und Charakterisierung von DEACM-EDTA (*caged*-EDTA)

Im nächsten Schritt wurde das zweite Kriterium für die Entwicklung einer reversiblen Regulation des *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystems adressiert. Dabei sollte die Möglichkeit untersucht werden, beide *caged compounds* durch Licht unterschiedlicher Wellenlängen separat zu photolysieren. Aufgrund der erfolgreichen Vorversuche mit nicht modifiziertem EDTA sollte auf dessen Grundlage ein neuartiges *caged compound* (*caged*-EDTA) zu photosensitiven Freisetzung von EDTA entwickelt werden.

Dazu sollte EDTA, ein Chelator für zweiwertige Kationen mit besondere Affinität zu Cu^{2+}, an seinen Koordinierungsstellen teilweise mit DEACM-Schutzgruppen (Diethylaminocumarin) versehen wurden. Die DEACM-Schutzgruppe wurde für diesen Zweck ausgewählt, da ihr Absorptionsspektrum im Vergleich zur DMNP-Gruppe (Dimethoxynitrophenol) des *caged*-Cu^{2+} (DMNP-EDTA-Cu^{2+}) zu größeren Wellenlängen hin verschoben sein sollte.[168,169] Somit sollte sich im Bereich von 310 und 430 nm nur eine geringe Überschneidung der Absorptionsspektren (s. Abbildung 38) ergeben, wodurch eine separate Photolyse beider *caged compounds* realisierbar sein sollte.

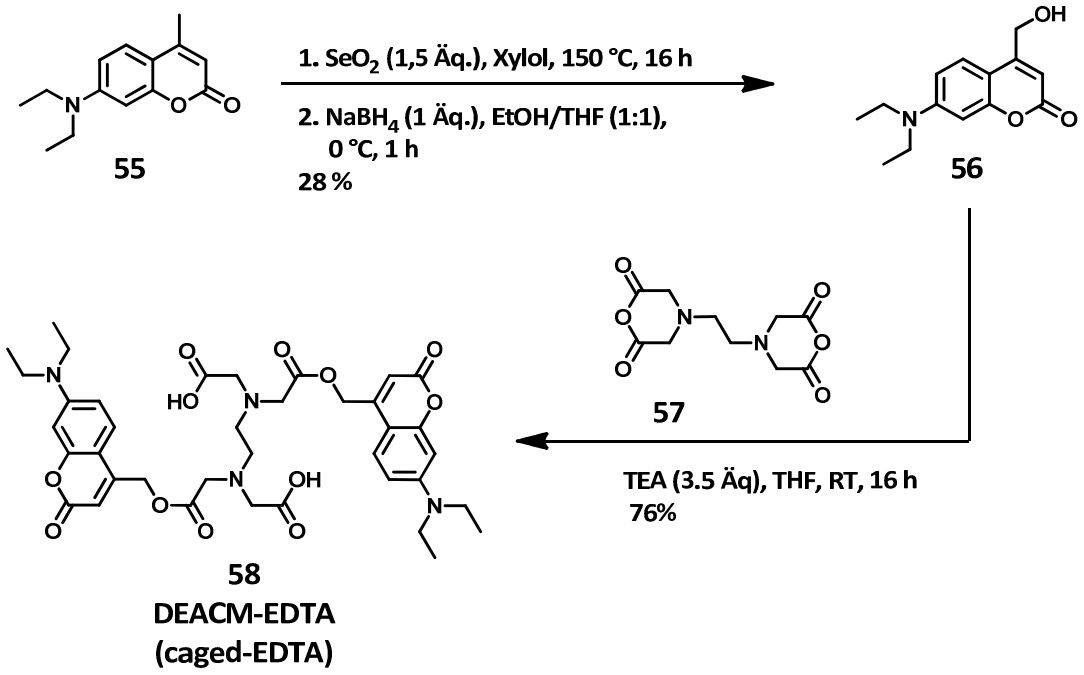


*Abbildung 36: Synthese von DEACM-EDTA (**58**) mittels EDTA-Anhydrid (**57**) und 7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-Cumarin (**56**). Letzteres wurde nach einer modifizierten Methode von Babin et al. hergestellt.*[170]

Die Synthese von DEACM-EDTA (sogenanntes *caged*-EDTA, **58**) ist in Abbildung 36 abgebildet. Sie startete von kommerziell erhältlichem 7-(Diethylamino)cumarin (**55**). Dieses wurde in einer Eintopf-Zwei-Schritt-Synthese zunächst mittels *Riley*-Oxidation unter Verwendung von Seleniumdioxid in allylischer Position oxidiert und anschließend mit Hilfe von Natriumborhydrid zum primären Alkohol **56** reduziert. Dabei wurde nach einer modifizierten Methode von Babin *et al.* vorgegangen.[170] Die geringe Ausbeute von 28 % im Vergleich zu 48 % bei Babin *et al.* ist vermutlich auf Produktverluste bei der Abtrennung von schwarzem Selen und die schlechte Phasentrennung bei der Extraktion zurückzuführen. Die anschließende Veresterung wurde mit Hilfe des EDTA-Anhydrids (**57**) unter Zugabe von 3,5 Äquivalenten Triethylamin (TEA) durchgeführt und lieferte das gewünschte Endprodukt (**58**, DEACM-EDTA) in 76 % Ausbeute. Eine alternative Veresterung nach der Methode von Steglich[171] bzw. der Einsatz von abweichenden Mengen TEA führte zu geringen Ausbeuten (Daten nicht dargestellt).

Die Ergebnisse der Synthese zeigen, dass DEACM-EDTA (**58**) in einer Gesamtausbeute von 21 % über drei Schritte synthetisiert werden konnte. Damit konnte ein zuverlässiger Zugang zu diesem *caged compound* für die späteren biologischen Anwendungen entwickelt werden.

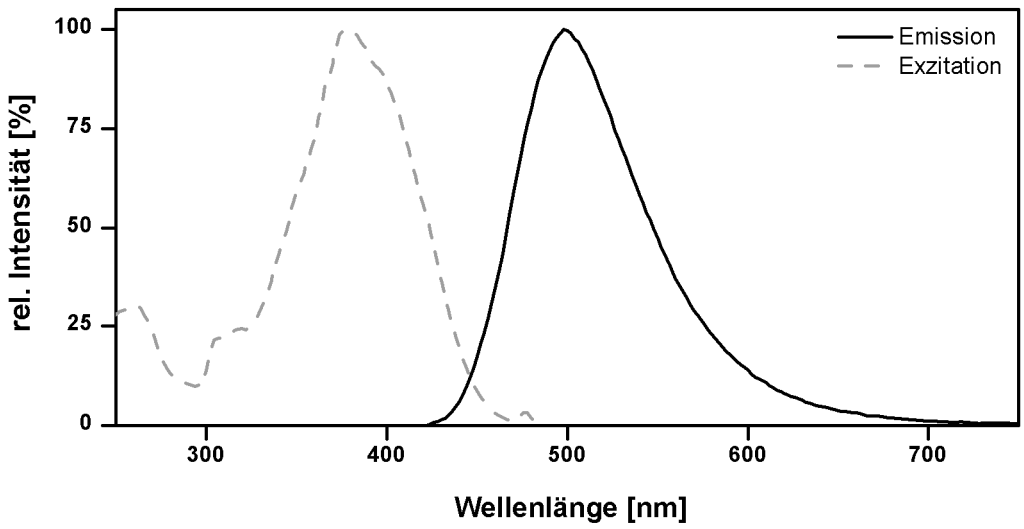


Abbildung 37: Normiertes Exzitations- und Emissions-Fluoreszenzspektrum von DEACM-EDTA (0,2 mg/mL) in gepuffertem Wasser (10 mM MOPS, pH 7).

Im Anschluss an die Synthese wurde DEACM-EDTA spektroskopisch charakterisiert. Zunächst wurde ein Fluoreszenzspektrum (0,2 mg/mL) in gepuffertem Wasser (MOPS, 10 mM, pH 7) aufgenommen, welches in Abbildung 37 dargestellt ist. Dabei zeigt der Abstand der beiden Maxima des Exzitations- und Emissionsspektrums eine Stokes-Verschiebung von 118 nm. Des Weiteren ergab sich durch die charakteristische Fluoreszenz dieser Schutzgruppen eine Möglichkeit, die Konzentrationsabnahme bei der später durchgeführten Photolyse zu verfolgen. Darüber hinaus zeigen die Parameter der YFP-Fluoreszenzmessung[172] (Exzitationswellenlänge: 515 nm, Emissionwellenlänge: 527 nm), dass die YFP-Exzitationswellenlänge außerhalb des Exzitationsspektrums von DEACM-EDTA liegt. Somit konnte die Verfolgung der *CUP1*-Promotoraktivität mittels YFP-Fluoreszenzmessung weiterhin gewährleistet werden und die Überlagerung der DEACM-EDTA-Fluoreszenz mit dem Signal des YFP-Proteins war vernachlässigbar.

Darauffolgend wurde ein Absorptionsspektrum von DEACM-EDTA (0,2 mg/mL) in gepuffertem Wasser (MOPS, 10 mM, pH 7) gemessen. Die Daten sind in Abbildung 38 dargestellt und wurden mit dem Absorptionsspektrum von DMNP-EDTA-Cu^{2+} überlagert. Dabei wurden die Werte auf das jeweilige Maximum der Spektren normiert. Der Vergleich zeigt, dass zwischen ca. 300 und 330 nm (schwarz schraffierter Bereich) die Absorption bei DEACM sehr gering war, wohingegen DMNP-EDTA-Cu^{2+} eine starke Absorption aufwies. Entgegengesetzt verhält es sich zwischen 430 und 460 nm (grau schraffierter Bereich). In dieser Wellenlängenspanne zeigt DMNP-EDTA-Cu^{2+} nahezu keine Absorption, im Gegensatz zu DEACM-EDTA, welches eine moderate Absorption aufweist. Es konnten also spektrale

Bereiche definiert werden, die es ermöglichen sollten, die beiden *caged compounds* separat von einander zu photolysieren.

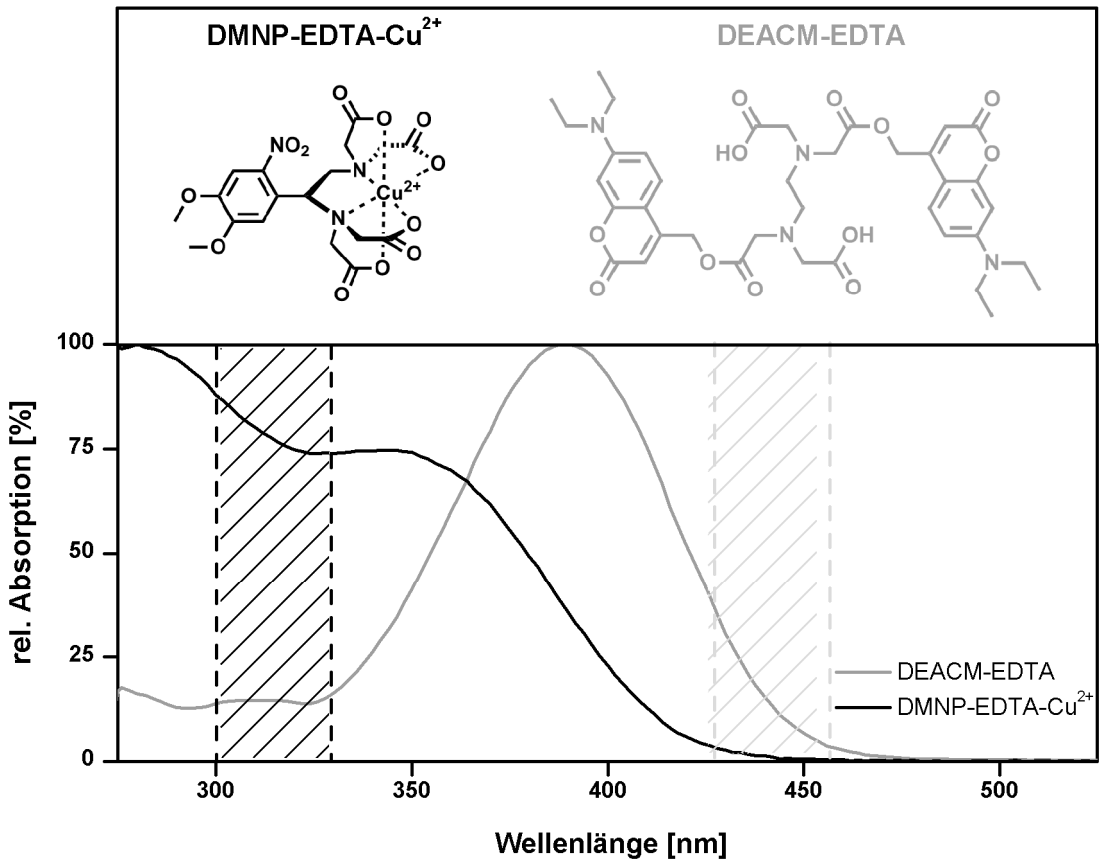


*Abbildung 38: Überlagerung der normierten Absorptionsspektren von DMNP-EDTA (caged-Cu^{2+}) (0,2 mg/mL) und DEACM-EDTA (*caged*-EDTA) (0,2 mg/mL) in gepuffertem Wasser (10 mM MOPS, pH 7). Schraffierte Zonen markieren Wellenlängenbereiche, in denen die separate Photolyse jeweils nur eines caged compounds möglich sein sollte.*

Zur Überprüfung der separaten Ansprechbarkeit wurden zunächst die Photolysekinetiken von DEACM-EDTA bei 300 und 430 nm aufgenommen. Eine Spaltung des *caged*-Cu^{2+} (DMNP-EDTA-Cu^{2+}) bei 375 nm, wie bei der lichtregulierten Induktion in Kapitel 2.2.3 beschrieben, war nicht mehr möglich. Dies hätte zu einer parallelen Photolyse des *caged*-EDTA (DEACM-EDTA) geführt und hätte einer separate Ansprechbarkeit der beiden *caged compound* damit entgegengestanden.

Zur Aufzeichnung der Photolysekinetiken wurde DEACM-EDTA (100 µM) in gepuffertem Wasser (MOPS, 10 mM, pH 7) gelöst und für unterschiedlich lange Zeit belichtet. Anschließend wurde die Abnahme der DEACM-EDTA-Konzentration sowohl über die charakteristische Absorptionsabnahme bei 367 nm als auch über die charakteristische Fluoreszenzzunahme der DEACM Schutzgruppe (Exzitation 376 nm und Emission 494 nm)

verfolgt. Beide Methoden ergaben dabei vergleichbare Ergebnisse, die in Abbildung 39 bzw. Tabelle 7 zusammengefasst sind.

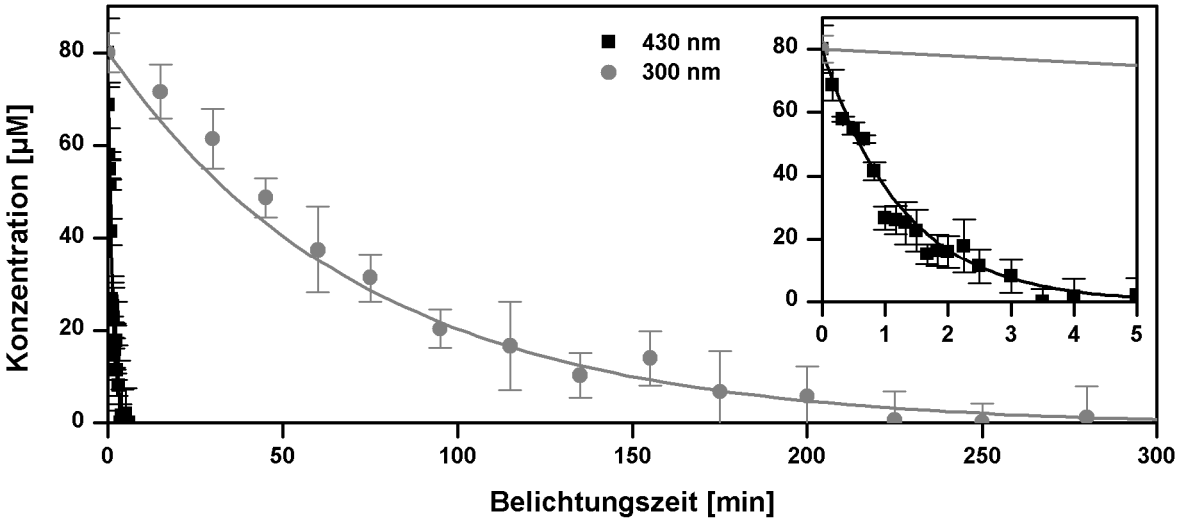


Abbildung 39: Photolyse von DEACM-EDTA (100 µM) in gepuffertem Wasser (MOPS, 10 mM, pH 7) bei unterschiedlichen Wellenlängen (λ_{max} = 300 nm, F_0 = 1 mW/cm^2 bzw. λ_{max} = 430 nm, F_0 = 30 mW/cm^2).

Es wird ersichtlich, dass die Photolyse des DEACM-EDTA (*caged*-EDTA) bei 430 nm deutlich schneller abläuft, als bei 300 nm. Die Bestrahlungszeiten für die halbmaximale photolytische Spaltung ($t_{1/2}$), also die Bestrahlungszeiten bis die Konzentration des DEACM-EDTA auf die Hälfte gesunken ist, unterscheiden sich daher deutlich. Sie betragen eine Stunde bei 300 nm und nur 0,83 ± 0,07 min bei 430 nm. Somit verläuft die Photolyse bei 430 nm ca. 70-mal schneller als bei 300 nm.

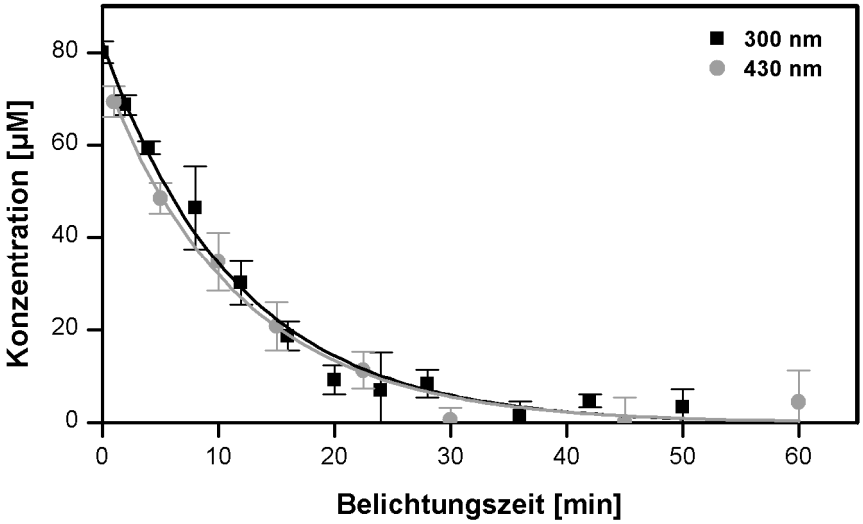


Abbildung 40: Photolyse von DMNP-EDTA (80 µM) in gepuffertem Wasser (MOPS, 10 mM, pH 7) bei unterschiedlichen Wellenlängen (λ_{max} = 300 nm, F_0 = 1 mW/cm^2 bzw. λ_{max} = 430 nm, F_0 = 30 mW/cm^2).

In Ergänzung dazu wurden in analogen Experimenten die Photolysekinetiken von DMNP-EDTA-Cu^{2+} (*caged*-Cu^{2+}) bei gleichen Wellenlängen (300, 430 nm) durchgeführt (s. Abbildung 40). Die daraus ermittelten Bestrahlungszeiten für die halbmaximale photolytische Spaltung ($t_{1/2}$) sind ebenfalls in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Vergleich der photolytischen Zerfallsgeschwindigkeiten von DEACM-EDTA (caged-EDTA, 100 mM) und DMNP-EDTA-Cu^{2+} (caged-Cu^{2+}, 80 µM) in gepuffertem Wasser (10 mM MOPS, pH 7) bei Bestrahlung mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen (λ_{max} = 300 nm, F_0 = 1 mW/cm^2; λ_{max} = 375 nm, F_0 = 11 mW/cm^2; λ_{max} = 430 nm, F_0 = 30 mW/cm^2). Angegeben sind jeweils die Bestrahlungszeiten für die halbmaximale photolytische Spaltung ($t_{1/2}$).

	Bestrahlungszeiten für die halbmaximale photolytische Spaltung $t_{1/2}$ [min] bei Licht der Wellenlänge		
	300 nm	**375 nm**	**430 nm**
DEACM-EDTA (*caged*-EDTA)	60 ± 6	0,53 ± 0,9	0,83 ± 0,07
DMNP-EDTA-Cu^{2+} (*caged*-Cu^{2+})	8,3 ± 0,7	8,7 ± 0,1	7,5 ± 0,9

Die $t_{1/2}$-Werte für *caged*-Cu^{2+} (DNMP-EDTA-Cu^{2+}) zeigen dabei, dass die Photolyse unabhängig von der Wellenlänge bei 300 nm ($t_{1/2}$-Wert: 8,3 min) und bei 430 nm ($t_{1/2}$-Wert: 7,5 min) nahezu gleich schnell ablaufen. Beim *caged*-EDTA (DEACM-EDTA) dagegen verläuft die Photolyse bei 430 nm ($t_{1/2}$-Wert: 0,83 min) ca. 70-fach schneller als bei 300 nm ($t_{1/2}$-Wert: 60 min). Betrachtet man die Wellenlängen separat, so zeigt sich, dass bei 300 nm DMNP-EDTA-Cu^{2+} (*caged*-Cu^{2+}) ca. 7-mal schneller photolysiert als DEACM-EDTA (*caged*-EDTA). Bei einer Wellenlänge von 430 nm zeigt sich hingegen, dass DEACM-EDTA (*caged*-EDTA) ca. 9-mal schneller photolysiert als der DMNP-EDTA-Cu^{2+} Komplex (*caged*-Cu^{2+}). Somit sollte die Verwendung von Licht der Wellenlängen 300 bzw. 430 nm ermöglichen, jeweils nur eines der *caged compounds* gezielt zu photolysieren.

Es kann daher festgehalten werden, dass das entwickelte DEACM-EDTA in einer Kombination mit DMNP-EDTA-Cu^{2+} nach diesen Befunden geeignet wäre, eine lichtvermittelte reversible Regulation der Genexpression zu ermöglichen. Hierzu würde eine Kombination beider *caged compounds* genutzt, um mittels Bestrahlung mit 300 nm zuerst Cu^{2+} aus DMNP-EDTA-Cu^{2+} freizusetzen und die *CUP1*-Promotor-reguliere Genexpression zu aktivieren. Eine anschießende Bestrahlung mit 430 nm könnte dann genutzt werden, um EDTA aus DEACM-EDTA freizusetzten. Diese würden anschließend zu einer Komplexierung

der zuvor freigesetzten Cu^{2+}-Ionen führen und damit zur Deaktivierung der *CUP1*-Promotor-regulierten Genexpression.

2.3.3 Einsatz von DEACM-EDTA in biologischen Systemen

Die Verwendung von DEACM-EDTA in Rahmen der Zwei-Wellenlängen-Regulation erfordert für die erste Stufe der Regulationskaskade mittels *caged*-Cu^{2+} die Belichtung mit einer Wellenlänge von 300 nm. Diese Strahlung liegt bereits im UVB-Bereich und verfügt damit über ein nicht zu vernachlässigendes zellschädigendes Potential. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung der Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 300 nm auf das Zellwachstum untersucht. Dazu wurden Kultivierungen von *S.c.-pCUP1-YFP* standardmäßig in SC-Medium bei 30 °C kultviert und am Anfang der exponentiellen Wachstumsphase (nach 4 h) belichtet (λ_{max} = 300 nm, F_0 = 1 mW/cm^2). Zum Vergleich wurde auch eine Belichtung mit 430 nm (F_0 = 30 mW/cm^2) durchgeführt. Das Wachstum der Zellkultivierungen wurde über das Streulichtsignal aufgezeichnet. Zur Auswertung wurden die Wachstumsraten der einzelnen Zellkultivierungen bestimmt. Dazu wurde die Steigung des Streulichtsignals innerhalb des Intervalls von der Belichtung (5 h) bis zum Ende der Kultivierung (22 h) über eine lineare Interpolation berechnet.

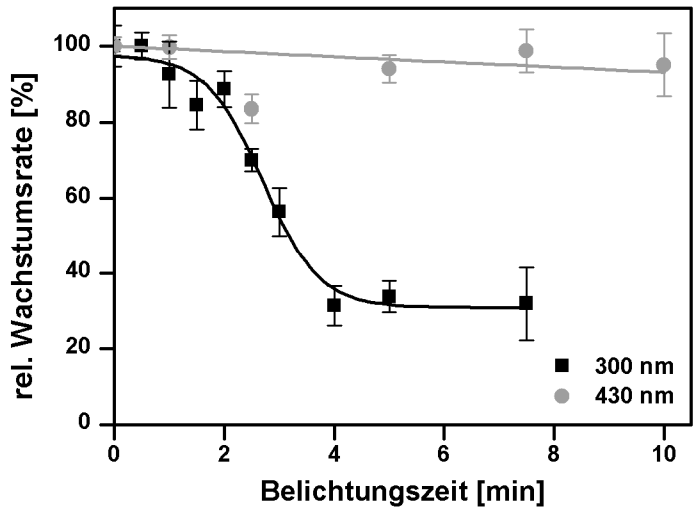


Abbildung 41: Auswirkung der Bestrahlung (nach 5 h Kultivierung) mit einer Wellenlänge von 300 nm (F_0 = 1 mW/cm^2) bzw. 430 nm (F_0 = 30 mW/cm^2) auf die Wachstumsrate der S.c.-pCUP1-YFP Zellkultivierungen (BioLector Setup, SC-Medium, 30 °C). Die rel. Wachstumsrate entspricht der durchschnittlichen Steigung des Streulichtsignals, gemessen nach der Bestrahlung bis zum Ende der Kultivierung (22 h), normiert auf die höchste gemessene Steigung. Zusätzlich dargestellt ist die lineare (grau) bzw. logistische (schwarz) Interpolation der Daten (Bestimmtheitsmaß > 0,97). Standardabweichungen ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen.

In Abbildung 41 sind die Wachstumsraten gegen die Belichtungszeit aufgetragen, wobei die Werte auf das Zellwachstum ohne Belichtung normiert sind. Die Daten zeigen, dass die Wachstumsrate bei Bestrahlung mit 430 nm nahezu gleich bleibt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Bestrahlung mit 430 nm bei den gemessenen Belichtungszeiten keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellkultivierung hatte. Eine Bestrahlung mit 300 nm dagegen führte bei Belichtungszeiten von mehr als 4 min zu einer Abnahme der Wachstumsrate um fast 30 %. Bei bis zu einer Minute Bestrahlung zeigte sich jedoch keine signifikante Abweichung der Wachstumsrate. Erst ab 2 min Belichtung kam es zu einer ca. 10 % verringerten Wachstumsrate. Es kann also festgehalten werden, dass die Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 300 nm ab einer Belichtungszeit von 2 min zu einer deutlichen Reduktion der Wachstumsrate und somit der Zellvitalität führt. Innerhalb dieses Zeitfensters von 2 min wäre die Photolyse des DMNP-EDTA-Cu^{2+} möglich, ohne die Zellvitalität stark zu beeinflussen. Ein Vergleich mit der Photolysekinetik von DMNP-EDTA-Cu^{2+} zeigt jedoch, dass eine Halbwertszeit von ca. 8 min bestimmt wurde. Somit könnten innerhalb des 2 min Zeitfensters nur ca. 15 % des DMNP-EDTA-Cu^{2+} gespalten werden. Eine Induktion der Genexpression mittels DMNP-EDTA-Cu^{2+} Bestrahlung bei 300 nm wäre dennoch möglich. Dazu müsste die Konzentration des DMNP-EDTA-Cu^{2+} auf ca. 333 µM angehoben werden, um bei einer Photolyseeffizienz von 15 % die ursprüngliche Cu^{2+} Konzentration von ca. 50 µM (vgl. Kapitel 2.2.2) zu erreichen.

Im nächsten Schritt sollte die Anwendung von DEACM-EDTA zur lichtvermittelten Repression einer durch Cu^{2+}-Ionen induzierten Genexpression getestet werden. Dazu wurde eine *S.c.-pCUP1-YFP* Kultur vor Versuchsbeginn mit DEACM-EDTA (100 µM) versetzt und standardmäßig im BioLector *Setup* bei 30 °C in SC-Medium kultiviert. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Expression des *YFP*-Gens durch $CuCl_2$ Zugabe (50 µM) induziert. Ca. 2 h nach Induktionsbeginn wurde ein Teil der Kulturen belichtet (λ_{max} = 430 nm, F_0 = 30 mW/cm^2). Zusätzlich wurden Referenzkulturen i) ohne Belichtung, ii) ohne DEACM-EDTA-Cu^{2+} aber mit $CuCl_2$ Zugabe und iii) ohne jeglichen Zusatz oder Belichtung (= „Referenz“) kultiviert.

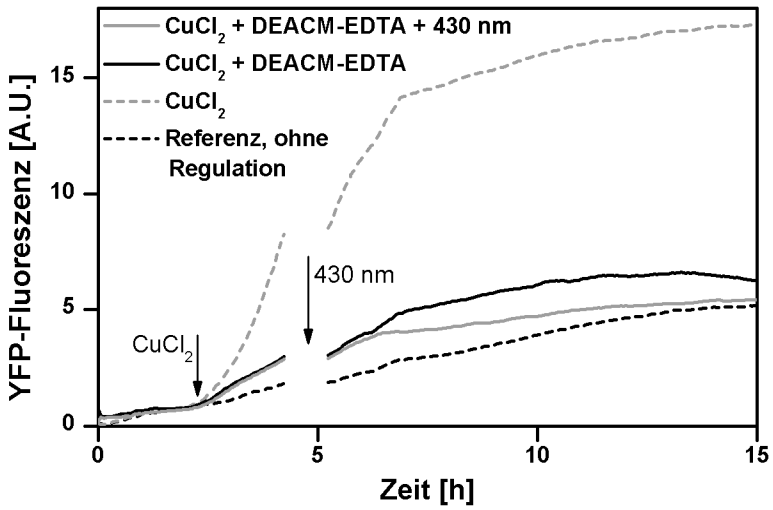


Abbildung 42: Anwendung von DEACM-EDTA zur lichtvermittelten Repression einer durch Cu^{2+}-Ionen induzierten Genexpression des Stammes S.c-pCUP1-YFP (BioLector Setup, SC-Medium, 30 °C). DEACM-EDTA Zugabe (100 µM) vor Kultivierungsbeginn, Cu^{2+} (50 µM) Zugabe nach Erreichen der exponentiellen Wachstumphase (2,5 h), Die Belichtung (λ_{max} = 430 nm, F_0 = 30 mW/cm^2) erfolgte für 20 min. Währenddessen war die Aufzeichnung der YFP-Fluoreszenz nicht möglich.

Die Verläufe der YFP-Fluoreszenzentwicklungen sind in Abbildung 42 dargestellt, wobei die Aufzeichnung der Fluoreszenz während der Belichtung ausgesetzt werden musste. Die Referenzkultur mit $CuCl_2$ Zugabe zeigt analog zur in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Charakterisierung des Cu^{2+}-basierten Expressionssystems (s. Abbildung 17) einen steilen Anstieg des Fluoreszenzsignals nach der Induktion. Im Vergleich dazu ist die Steigerung der Fluoreszenz bei der DEACM-EDTA-haltigen Zellkultivierungen deutlich schwächer und unterscheidet sich nur geringfügig von der nicht-induzierten Kontrollkultur. Dies deutet darauf hin, dass DEACM-EDTA einen negativen Einfluss auf die Cu^{2+}-Ionen-basierte Aktivierung des *CUP1*-Promotors hat. Betrachtet man dennoch den unterschiedlichen Verlauf des YFP-Fluoreszenzsignals nach der Belichtung, so ist erkennbar, dass die belichtete Probe ein leicht verringertes Fluoreszenzsignal aufweist. Dies deutet darauf hin, dass eine leichte Reprimierung der *CUP1*-Promotor-regulierten Genexpression erzielt werden konnte.

Die geringe Induktion der DEACM-EDTA-haltigen Zellkultivierungen nach $CuCl_2$ Zugabe ließ jedoch vermuten, dass es zu einer Komplexierung der Cu^{2+}-Ionen durch das intakte oder das aufgrund von Instabilität bereits autonom gespaltene DEACM-EDTA kam. Daher wurde die Stabilität des DEACM-EDTA mittels NMR Messungen zunächst in deuteriertem Wasser (D_2O, pH 5 und 7) gemessen. Dabei zeigte sich innerhalb von 48 h jedoch keine Bildung von Spaltprodukten, was für die Stabilität des DEACM-EDTA in neutralem und leicht saurem Wasser spricht.

Im Anschluss wurden deshalb ein möglicher Einfluss des Kultivierungsmediums und dessen Bestandteile untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass es bei der Zugabe von DEACM-EDTA zum Kultivierungsmedium zur direkten Bildung eines Niederschlags kam, der für die Bildung eines stabilen, schlecht löslichen Chelatkomplexes spricht. Daraufhin wurden wässrige Lösungen aller Kationen des Mediums (SCM) mit der gleichen Konzentration wie im Kultivierungsmedium hergestellt. Nach DEACM-EDTA Zugabe konnte bei Ca^{2+} und Mg^{2+} ebenfalls die Bildung eines Niederschlags festgestellt werden. Zusätzlich wurde eine $CuCl_2$ Lösung mit der standardmäßigen Induktionskonzentration (50 µM) getestet, was ebenfalls zur Bildung eines Niederschlags führte.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten somit darauf hin, dass die DEACM-Schutzgruppenstrategie die Affinität des *caged*-EDTA (DEACM-EDTA) zu zweiwertigen Kationen und insbesondere zu Cu^{2+}-Ionen nicht ausreichend vermindert. Die Blockierung der Carboxylat-Koordinierungsstellen durch Veresterung mit sterisch anspruchsvollen Schutzgruppen scheint daher nicht ausreichend, um eine Komplexierung von Cu^{2+}-Ionen zu verhindern. Daher kam es bei den DEACM-EDTA-haltigen Zellkultivierungen nach der $CuCl_2$ Zugabe vermutlich zu einer Komplexierung der Cu^{2+}-Ionen durch das intakte DEACM-EDTA, wodurch die Induktion der *CUP1*-Promotor-kontrollierten Gene verhindert wurde.

Zusammenfassend wurde also gezeigt, dass geschützte Derivate des Chelators EDTA generell geeignet sind, um die Expression von Cu^{2+}-Ionen induzierten Genen zu reprimieren. Die präsentierte Schutzgruppenstrategie mittels DEACM zeigte dabei geeignete photolytische Eigenschaften und eine spektroskopische Kompatibilität zum etablierten *caged*-Cu^{2+} (DMNP-EDTA-Cu^{2+}). Die Cu^{2+}-Ionen Affinität des Chelators EDTA konnte durch die verwendete photolabile Schutzgruppe jedoch nicht ausreichend gesenkt werden, wodurch die Cu^{2+}-Ionen vermittelte Induktion der Genexpression in Gegenwart von DEACM-EDTA ausblieb. Dennoch konnte das Potential dieser Strategie durch die leichte Reduktion der YFP-Fluoreszenzentwicklung nach der Belichtung demonstriert werden. Eine modifizierte Schutzgruppenstrategie basierend auf DEACM-Derivaten könnte daher sehr vielversprechend sein, um die angestrebte reversible Regulation der *CUP1*-Promotor-regulierten Genexpression einer Zwei-Wellenlängen-Strategie zu verwirklichen.

2.4 Lichtregulation (Repression) mittels *caged*-Methionin

Die folgenden Ergebnisse dieses Kapitels wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Christopher Propst und Dr. Georg Wandrey erzeugt und sind in eine gemeinsame Publikation eingegangen.[173] *Die Experimente zu Abbildung 46, Abbildung 47, Abbildung 48 und Abbildung 49, wurden von Dr. Christopher Probst im Rahmen einer Kooperation [BMBF, FKZ: 031A167A, Neue Optosensoren und Photoregulatoren zur lichtvermittelten Steuerung und Analyse molekularer Systeme (OptoSys)] durchgeführt. Details zur Versuchsdurchführung können der gemeinsamen Publikation*[173] *und dem Kapitel 5.3.3 entnommen werden.*
Die Experimente zu Abbildung 55, Abbildung 56 und *Abbildung 57, wurden im Rahmen dieser Dissertation zunächst als Vorversuche im BioLector Setup durchgeführt. Die dargestellten Daten der Abbildung 55, Abbildung 56, Abbildung 57, Abbildung 58 und Abbildung 60 beziehen sich auf Experimente die anschließend im Rahmen der bereits erwähnten Kooperation [BMBF, FKZ: 031A167A, Neue Optosensoren und Photoregulatoren zur lichtvermittelten Steuerung und Analyse molekularer Systeme (OptoSys)] von Dr. Georg Wandrey mit einem eigens konstruierten Screening-System durchgeführt wurden. Details zur Versuchsdurchführung können der gemeinsamen Publikation*[173] *und dem Kapitel 5.3.4 entnommen werden.*

Im Kapitel 2.2 wurde bereits die optische-regulierte Aktivierung der Genexpression mittels eines induzierbaren Promotors (*pCUP1*) erfolgreich demonstriert. Neben den induzierbaren Promotoren sind auch reprimierbare Promotoren interessant für biotechnologische Prozesse: Beispielsweise a) zur Drosselung einer Genexpression, falls diese die Zellvitalität beeinflusst, b) für heterologe Proteinproduktionen oder c) zur Erforschung von Genfunktion, bei denen die Zellen im Falle eines kompletten Gen-*Knockouts* nicht überlebensfähig wären.[174] Im Falle von *Saccharomyces cerevisiae* finden sich dazu Beispiele insbesondere unter Verwendung von *pMET17* und anderer mittels Methionin reprimierbarer Promotoren.[63,175–179]
Darüber hinaus sollte der *pMET17*-Promotor eine reversible Regulation der Genexpression ermöglichen, wobei die durch *S. cerevisiae* bedingte Metabolisierung des Repressormoleküls Methionin genutzt werden könnte. Dadurch sollte dem Expressionssystem das Effektormolekül nach optischer Freisetzung wieder „automatisch“ entzogen werden, ohne die Notwendigkeit ein zweites *caged compound* einzusetzen. Demnach hätte das *pMET17*-

basierte Expressionssystem den Vorteil, dass zur reversiblen Regulation der Genexpression im Gegensatz zur *pCUP1*-regulierten Genexpression (s. Kapitel 2.3) nicht zwei sonder lediglich ein *caged compound* notwendig wären.

Zur Erweiterung der optischen Expressionswerkzeuge sollte daher im folgenden Kapitel die optische Regulation des *MET17*-Promotors mit Hilfe eines *caged*-Methionin Derivates realisiert werden. Zudem sollte der Ansatz einer reversiblen Regulation untersucht werden, um die Etablierung von komplexen Regulationsmechanismen, wie in Kapitel 1.3 und 2.3 beschrieben, für biotechnologisch relevante Mikroorganismen voranzutreiben.

2.4.1 *Das pMET17*-basierte Expressionssystem

Zur Verwirklichung einer möglichst flexiblen Regulation der Genaktivität wurde der *MET17*-Promotor (*pMET17*) aus *S. cerevisiae* ausgewählt, auch bekannt als *MET25*-Promotor. Er ist Teil des *MET*-Regulationsnetzwerks (Abbildung 43) und unterliegt einer strikten Regulation, welche von der intrazellulären *S*-Adenosylmethionin (SAM) Konzentration abhängt. Methionin ist im Gegensatz zu SAM in hohem Reinheitsgrad und sehr preisgünstig [Methionin (Reinheit 99,5 %) ca. 2 €/g; SAM (Reinheit ≥75 %) ca. 1600 €/g; Sigma Aldrich, Stand 2017) erhältlich und kann ebenso zur Regulation genutzt werden. Dies ist möglich, da Methionin nach seiner Aufnahme in die Zellen äußerst schnell durch die Sam1/2p-katalysierte Adenosylierung in SAM umgewandelt wird.

Unter Methionin-Mangelbedingungen ist die *S. cerevisiae* Zelle darauf angewiesen, die Aminosäure eigenständig zu generieren. Dies wird hauptsächlich durch den Einbau von Sulfid in *O*-Acetylhomoserin mit Hilfe der Sulfhydrylase Met17p und anschießender Methylierung mittels Met6p gewährleistet. Daher ist bei einer geringen intrazellulären Methioninkonzentration der *MET17*-Promotor aktiv, was durch den Transkriptionsaktivator-Komplex Cbf1p-Met4p-Met28p garantiert wird. Steigt jedoch die intrazelluläre Methioninkonzentration, wird durch die rasche Umwandlung in SAM das Protein Met30p aktiviert, welches Teil des Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist. Dies führt zur Ubiquitinierung und zügigen Degradation des Cbf1-Met4-Met28p Transkriptionsaktivator-Komplexes durch das Proteasom. Darauf folgend wird der *MET17*-Promotor deaktiviert.[180–182]

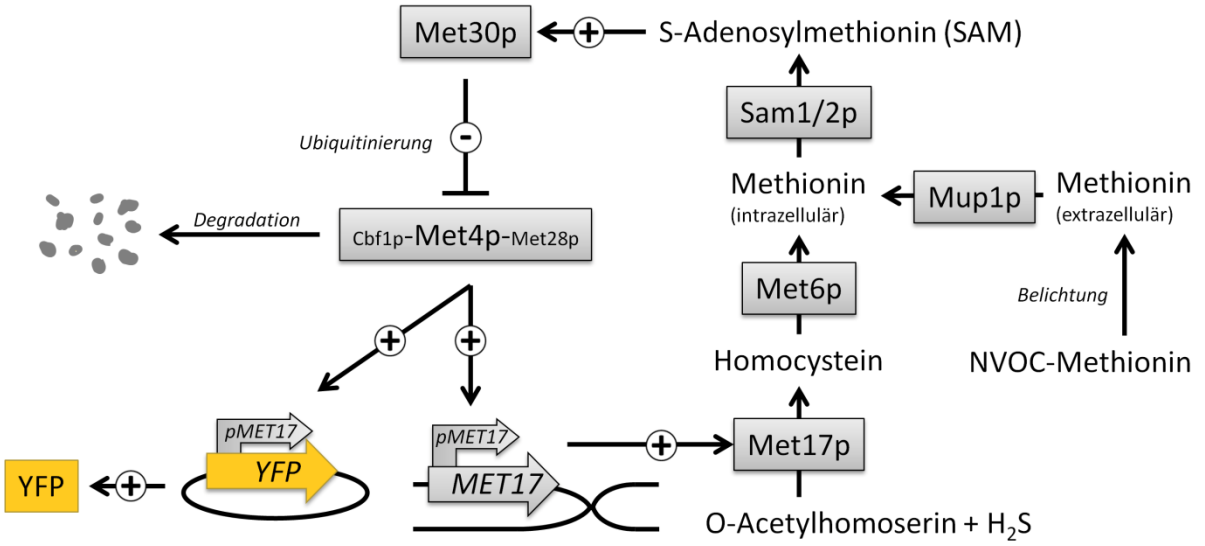


Abbildung 43: *Regulation der Genexpression im Reporterstamms S.c.-pMET17-YFP unter Vermittlung des SAM-Stoffwechselwegs. Die pMET17-kontrollierte Genexpression wird durch den Proteinkomplex Cbf1p-Met4p-Met28p reguliert. Die Konzentration dieses Transkriptionsaktivators wird über die Aktivität von Met30p durch Ubiquitinierung und anschließender Degradation gesteuert. Unter Methionin-Mangelbedingungen kann kein SAM gebildet werden, wodurch Met30p inaktiv bleibt und alle MET17-Promotoren durch den Transkriptionsaktivator aktiviert werden. Bei manueller oder photolytischer Zugabe von Methionin kommt es zur Sam1/2p-katalysierten Bildung von SAM. Dies führt zur einer Met30p-vermittelten Degradation des Transkriptionsaktivators und die Transkription der pMET17-regulierten Gene wird aktiviert. Dadurch wird die Bildung von weiterem Methionin und gegebenenfalls von YFP-Reporterprotein gestoppt.* [180–182]

Woher diese strikte Expressionskontrolle rührt, ist noch nicht vollends aufgeklärt. Vermutet werden kann aber, dass es einerseits der Schonung zellulärer Ressourcen dient und die Bildung überflüssiger Proteine vermieden wird. Andererseits wird die Belastung der Zellen durch die Reduktion potentiell toxischer Substanzen verringert. Dazu zählt zum einen S-Adenosylmethionin (SAM), als reaktives Methylierungs-Reagenz und zum anderen Schwefelwasserstoff (H_2S). Letzterer ist als Substrat für die Sulfhydrylase Met17p essentiell. Er wird mittels assimilatorischer Reduktion aus Sulfaten gebildet, wobei die Katalyse ebenfalls durch *MET*-Promotor-kontrollierte Gene betrieben wird.[181]

Das beschriebene S.c.-*pMET17-YFP Expressionssystem* erlaubt eine dynamische Regulation der Genexpression. Dies basiert darauf, dass der *MET17*-Promotor unter Methionin-Mangelbedingungen dereprimiert und somit aktiv ist. Wird jedoch Methionin zugegeben, wird der Promotor reprimiert und die Genexpression deaktiviert. Sinkt die Methioninkonzentration allerdings aufgrund von intrazellulärem Verbrauch wieder unter einen bestimmten Schwellenwert, wird der Promotor erneut dereprimiert und die Genexpression reaktiviert. Die Zugabe von Methionin kann somit genutzt werden, um die Expression von *pMET17*-kontrollierten Genen für einen bestimmten Zeitraum zu inhibieren.

Erweitert man dieses Vorgehen um eine lichtabhängige Freisetzung von Methionin, so könnte ein flexibles, lichtreguliertes Genexpressionssystem erzeugt werden. Das Prinzip einer solchen Regulation ist in Abbildung 44 dargestellt. Im Grundzustand liegt kein freies Methionin vor, da es kovalent an eine photosensitive Schutzgruppe (*cage*) gebunden ist. Folglich ist die Expression von *pMET17*-kontrollierten Genen aktiv (dereprimiert). Nach Bestrahlung mit UVA-Licht wird die Schutzgruppe abgespalten. Das freigesetzte Methionin führt zur Reprimierung des *MET17*-Promotors und die Genexpression wird deaktiviert. Anschließend führt der Abfall der Methioninkonzentration, bedingt durch intrazellulären Verbrauch, wieder zu einer Derepression des *MET17*-Promotors und einer Reaktivierung der Genexpression.

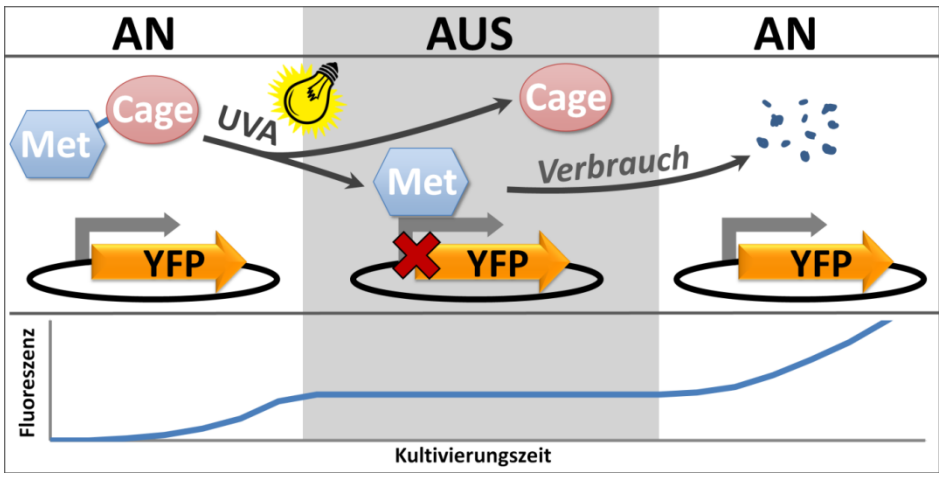


Abbildung 44: Prinzip einer MET17-Promotor-basierten dynamischen Expressionsregulation mittels caged-Methionin (caged-Met) am Beispiel von YFP. Im Grundzustand ist die Expression von pMET17-kontrollierten Genen aktiv. Durch Bestrahlung mit UVA-Licht wird die photosensitive Schutzgruppe (cage) vom Methionin abgespalten, wodurch mit Hilfe von Vermittlerproteinen der MET17-Promotor reprimiert (deaktiviert) wird. Anschließend wird das Methionin intrazellulär verbraucht bis nach Erreichen eines Schwellenwertes der MET17-Promotor wieder dereprimiert (aktiviert) wird. Die Dauer der Repression ist damit von der Menge an freigesetztem Methionin bzw. dessen Abbaugeschwindigkeit abhängig. Modifiziert nach Kusen et al.[173]

2.4.2 Charakterisierung von *S.c.-pMET17-YFP*

Die Experimente zu den folgenden mikrofluidischen Ergebnisse wurden in Kooperation von Dr. Christopher Probst durchgeführt.

Zu Beginn der Arbeiten wurde erneut ein *S. cerevisiae* Reporterstamm erzeugt. Ziel war es, ein YFP-Gen unter Kontrolle des *MET17*-Promotors mit Hilfe eines Plasmids heterolog zu exprimieren, um die spätere Expression fluoreszenzspektroskopisch quantifizieren zu können. Dazu wurde der *GAL1*-Promotor der Plasmids pPK1_*pGAL1-YFP* gegen den *MET*-Promotor ausgetauscht. Anschließend wurden Zellen des Stammes *S. cerevisiae Y10000*

mit diesem Vektor transformiert, um den Reporterstamm *S.c.-pCUP1-YFP* zu erzeugen. Die Verwendung des Stammes Y10000 war notwendig, da der bisher genutzte Stamm Y00000 über eine Methionin Auxotrophie verfügte. Die Zugabe dieser Aminosäure wäre für das Wachstum erforderlich, weshalb eine Regulation mittels Methionine für diesen Stamm ausgeschlossen war. Daher wurde der neue Stamm *S. cerevisiae* Y10000 angewendet, da in diesem die Methionin- gegen eine Lysin Auxotrophie ausgetauscht wurde.

Im Rahmen des Kooperationsprojektes erfolgte die initiale Charakterisierung des *MET*-Systems unter Anwendung von mikrofluidischen Einzelzell-Kultivierungen in Zusammenarbeit mit Dr. Christopher Probst (Forschungszentrum Jülich, Institut für Bio- und Geowissenschaften, IBG-1: Biotechnologie). Diese ermöglichten eine Kultivierung in mikroskopisch erfassten Kammern, wobei die Zellen kontinuierlich mit frischem Medium versorgt wurden. Dies hatte den Vorteil, dass das umgebende Medium eine konstante Zusammensetzung behielt und nicht durch den zellulären Abbau von Methionin beeinflusst wurde. Durch diese experimentellen Bedingungen sollte es möglich sein, den Schwellenwert der Methioninkonzentration für die Repression des MET17-Promotors exakt zu bestimmt. Zusätzlich erlaubte dieses Kultivierungssystem, die Resonanz des Expressionssystems bei unterschiedlichen sowie wechselnden Methioninkonzentrationen zu studieren. Eine schematische Darstellung der Kultivierungsbedingungen ist in Abbildung 45 zu sehen.

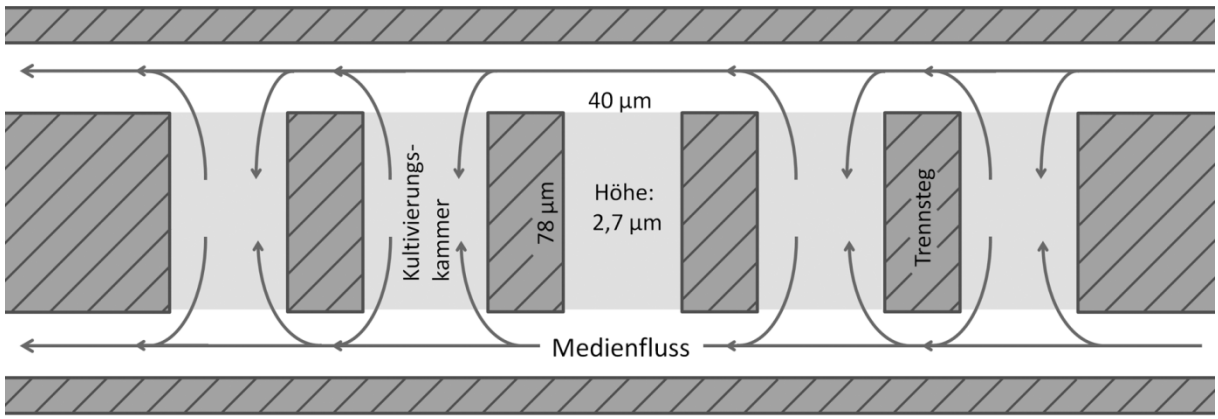


Abbildung 45: Schematische Darstellung der mikrofluidischen Kultivierungsbedingungen. Die Zellen wachsen in aneinander gereihten, sehr flachen (2,7 µm) Kultivierungskammern (hellgrau) mit einem Volumen von ca. 8,5 pL. Flankiert werden diese Kammern von zwei Versorgungskanälen (weiß), welche permanent mit Medium durchströmt werden. Aufgrund des geringen Volumens findet ein stetiger diffusionsgetriebener Austausch an Nährstoffen und Stoffwechselprodukten statt, wodurch sich die Zellen in quasi statischen Umgebungsbedingungen befinden.

Zu Beginn der mikrofluidischen Einzelzell-Kultivierungen stellte sich heraus, dass zunächst die Kammerhöhe optimiert werden musste. Dies war von besonderer Bedeutung

für die genaue Identifizierung von Einzelzellen und ermöglichte eine mikroskopische Verfolgung des Zellenwachstums und der Fluoreszenzentwicklung. Die Bedeutung der Kultivierungskammerhöhe ist in Abbildung 46 veranschaulicht. Die linke Seite (A) zeigt dabei eine mikroskopische Aufnahme der zu Beginn der Versuche verwendeten Kammern. Die Höhe dieser Kammern war deutlich größer als 2,7 µm. Als Folge dessen kam es zu einem mehrschichtigen Wachstum der Zellen und eine klare Fokussierung des Bildes war nicht möglich. Die Aufnahme veranschaulicht, dass eine deutliche Abgrenzung der Zellen unter diesen Bedingungen nicht sichergestellt werden konnte. Insbesondere die YFP-Fluoreszenzsignale, welche in gelber Farbe dargestellt sind, wurden stark diffus und konnten einzelnen Zellen nicht zugeordnet werden.

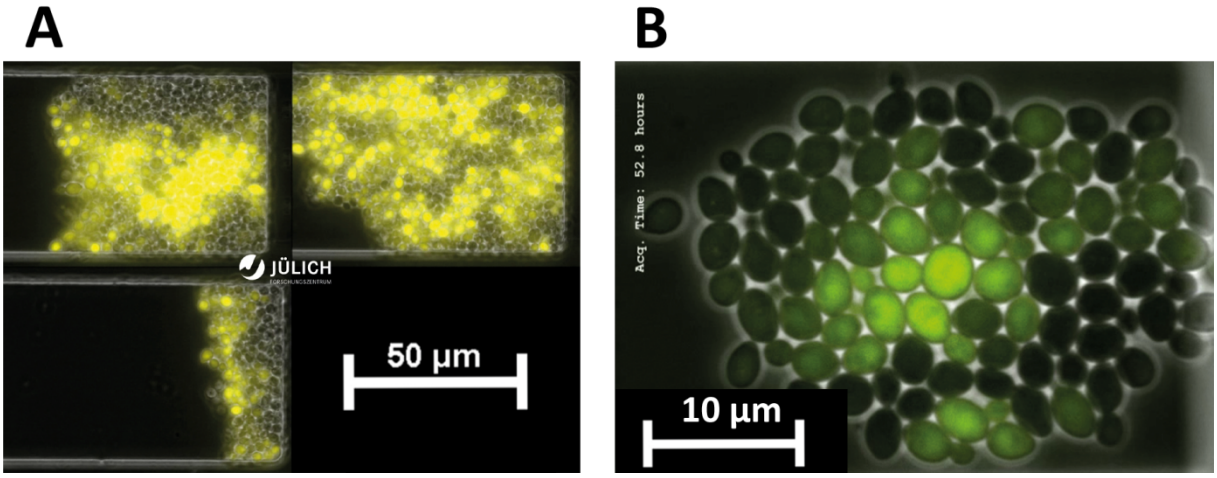


Abbildung 46: Mikrofluidische Kultivierung von S.c.-pMET17-YFP in Kultivierungskammern unterschiedlicher Höhe. Die Fluoreszenz des exprimierten YFP-Proteins ist in gelber bzw. grüner Farbe dargestellt. (A) Kammern mit einer Höhe deutlich über 2,7 µm führten zu einem mehrschichtigen Wachstum und einer schlechten Fokussierung. (B) Optimierte Kammer mit einer Höhe von 2,7 µm. Die Zellen wachsen einschichtig und können bestens fokussiert werden, wodurch eine genaue Identifizierung der Einzelzellen und eine genaue Zuordnung der Fluoreszenz möglich werden. Die Versuche zu dieser Abbildung wurden in Kooperation von Dr. Christopher Probst durchgeführt.

Im Anschluss an die Optimierung der Kammerhöhe konnten erste regulatorische Experimente zum *S.c.-pMET17-YFP* Expressionssystem durchgeführt werden. Dabei sollte zunächst der regulatorische Schwellenwert, also jener Konzentration mit der das Expressionssystem gerade noch zuverlässig reguliert werden kann, ermittelt werden. Dazu wurde das aktivierte *pMET17-YFP* Expressionssystem unterschiedlichen Methionin-konzentrationen ausgesetzt, mit dem Ziel, die notwendige Konzentration für eine vollständige Repression zu ermitteln.

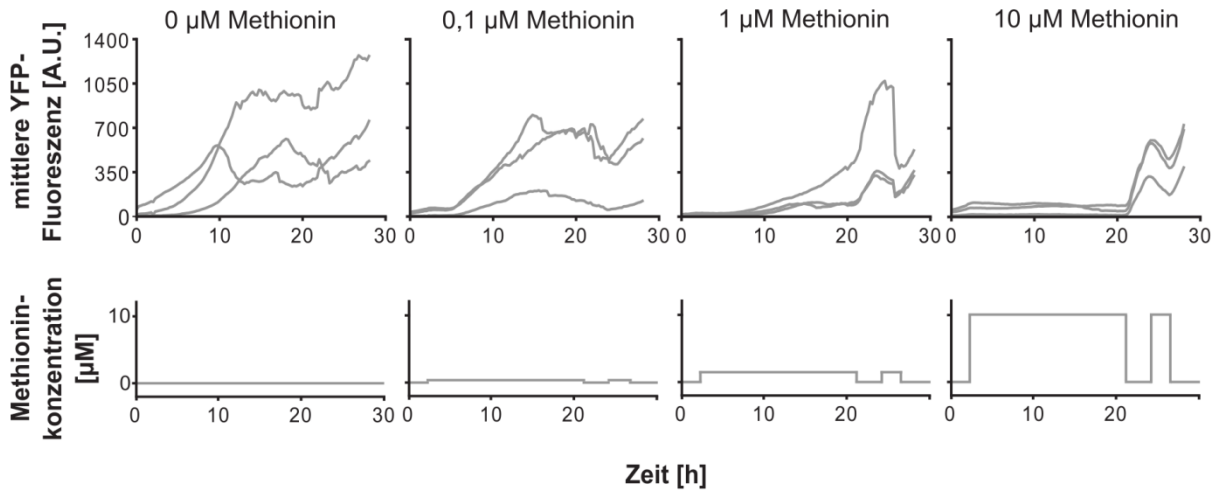


Abbildung 47: Mikrofluidische Kultivierung von S.c.-pMET17-YFP mit unterschiedlichen Methioninkonzentrationen. Die oberen Graphen zeigen den zeitlichen Verlauf der YFP-Fluoreszenzen bei Einsatz von unterschiedlichen Methioninkonzentrationen (0; 0,1; 1; 10 µM für jeweils drei exemplarische Kultivierungskammern. Die unteren Graphen geben dabei die „Schaltung" der jeweiligen Methionin-konzentrationen an. Die Versuche zu dieser Abbildung wurden in Kooperation von Dr. Christopher Probst durchgeführt. Modifiziert nach Kusen et al.[173]

Hierzu wurden Vorkulturen in Abwesenheit von Methionin in SC-Medium kultiviert, um die die *pMET17*-regulierte YFP-Expression zu aktivieren. Anschließend wurden die Kultivierungskammern mit einzelnen Zellen „beladen" und weitere drei Stunden ohne Methionin kultiviert, wobei die Promotoraktivität mittels YFP-Fluoreszenzmessungen kontrolliert wurde. Darauf folgend wurde auf Medien mit unterschiedlichen Methioninkonzentrationen (0; 0,1; 1; 10 µM; 3 - 21 h) gewechselt. Die entsprechenden Daten von jeweils drei beispielhaften Kulturen sind in Abbildung 47 veranschaulicht, wobei der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz in den oberen Graphen und die „Schaltung", d. h. die phasenweise Erhöhung bzw. Absenkung, der Methioninkonzentrationen in den unteren Graphen dargestellt ist. Als Folge des Medienwechsels nach drei Stunden war mit zunehmender Methioninkonzentration eine verstärkte Reduktion der YFP-Produktion im Vergleich zur Kontrolle (0 µM) zu beobachten. Einzig jedoch der Einsatz von 10 µM Methionin führte zu einer vollständigen Stagnation der YFP-Produktion, erkennbar an der Fluoreszenz-Plateauphase zwischen 3 h und 21 h. Dies lässt auf eine zuverlässige Repression des *MET17* Promotors schließen, weshalb der regulatorische Schwellenwert auf einen Konzentrationsbereich zwischen ca. 2 und 10 µM Methionin eingegrenzt werden konnte. Für weitere regulatorische Experimente mit dem S.c.-*pMET17-YFP* Expressionssystem wurde daher eine Konzentration von 10 µM Methionin verwendet, um eine vollständige Repression des Expressionssystems sicherzustellen.

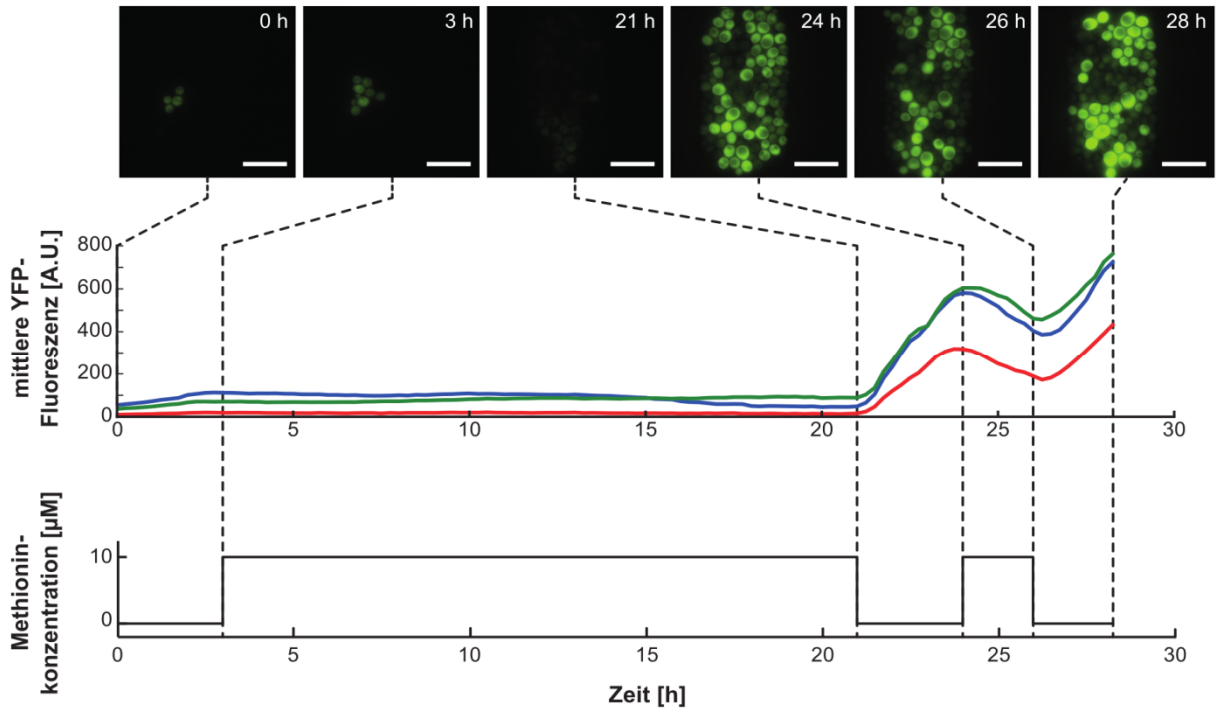


Abbildung 48: Mikrofluidische Kultivierung von drei beispielhaften S.c.-pMET17-YFP Kultivierungen mit wechselnden Methioninkonzentrationen (0 oder 10 µM; SC-Medium, 30 °C). Die oberen Graphen zeigen den zeitlichen Verlauf der YFP-Fluoreszenz für drei exemplarische Kultivierungskammern (grün, blau, rot). Die unteren Graphen geben dabei die Schaltung der Methioninkonzentrationen an. Die mikroskopischen Aufnahmen verdeutlichen das Wachstum und die Verteilung der YFP-Fluoreszenzintensität (grüne Zellanfärbung). Maßstab: 10 µm. Die Versuche zu dieser Abbildung wurden in Kooperation von Dr. Christopher Probst durchgeführt. Modifiziert nach Kusen et al.[173]

Nach erfolgreicher Repression wurde die Dynamik des Expressionssystem weiter untersucht. Dabei lag der Fokus auf der reversiblen Schaltung der Genexpression. In Abbildung 48 ist die mikrofluidische Analyse der Regulation mit 10 µM Methionin vergrößert dargestellt und mit mikroskopischen Aufnahmen ergänzt. Es ist zu erkennen, dass die erste Repressionsphase (3 - 21 h) aufrechterhalten wurde bis die Kultivierungskammern vollständig mit Zellen gefüllt waren. Anschließend wurde auf methioninfreies Medium (21 - 24 h) gewechselt. Die Fluoreszenzkurven zeigten daraufhin einen deutlichen Anstieg, was auf eine schnelle Reaktivierung der *YFP*-Genexpression schließen lässt. Der erneute Wechsel zu methioninhaltigem Medium (24 - 26 h) führte zu einer raschen Verringerung der Fluoreszenzintensität. Dies spricht für eine erfolgreiche erneute Repression der Genexpression. Im Vergleich zur ersten Repressionsphase (3 - 21 h), in der die Fluoreszenzintensität nahezu konstant auf niedrigem Niveau blieb, war die Kultivierungskammer nun vollständig mit Zellen gefüllt und zeigte daher eine Abnahme der Fluoreszenzintensität. Dies ist mit der Beobachtung zu erklären, dass die alten, fluoreszierenden Zellen durch neue reprimierte und damit nicht fluoreszierende Zellen

verdrängt wurden. Dies erklärt die Abnahme der Fluoreszenzintensität. Ein erneuter Wechsel zu methioninhaltigem Medium (26 - 28 h) bewirkte wiederum eine schnelle Steigerung der Fluoreszenzintensität. Dies zeigt, dass eine reversible Schaltung der *pMET17*-regulierten Genexpression durch den Wechsel zwischen methioninhaltigem und methioninfreiem Medium realisiert werden konnte.

Die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 48 (oben) zeigen neben der Beladungsdichte der Kultivierungskammern auch die Verteilung der Fluoreszenzintensität auf die Einzelzellen. Dabei konnte zu Beginn der Kultivierung (0 - 21 h) eine homogene Aufteilung der Fluoreszenz beobachtet werden. Mit zunehmender Kultivierungszeit stieg jedoch die Expressionsheterogenität der YFP-Produktion deutlich an. Aufgrund dessen wurde die Expressionsdynamik zusätzlich von einzelnen Zellen innerhalb einer Kultivierungskammer analysiert. Dabei wurde untersucht, ob das Ansprechverhalten der Genexpression einzelner Zellen trotz unterschiedlicher Magnituden die gleiche Dynamik aufweist. Experimentell wurde dazu geprüft, ob Zellen mit einem niedrigen bzw. hohen Fluoreszenzniveau verhältnismäßig gleich auf wechselnde Methioninkonzentrationen reagieren. In Abbildung 49 wird dazu der Verlauf der Fluoreszenzintensität zweier Einzelzellen mit einem hohen (blau) bzw. niedrigen (grün) Fluoreszenzniveau verglichen. Die Schaltung der Methioninkonzentrationen entspricht dabei der in Abbildung 48. Während der Kultivierungsphasen mit methioninfreiem Medium (21 - 24, 26 - 28 h) war bei beiden Zellen eine Zunahme der Fluoreszenzintensität, jedoch mit deutlich unterschiedlichen Raten, zu beobachten. Analog dazu verringerte sich die Intensität der Fluoreszenzintensität bei der Kultivierungsphase mit Methionin (10 µM). Daraus kann gefolgert werden, dass die Dynamik der Genregulation unabhängig von der Höhe der Fluoreszenzintensität der Einzelzellen war.

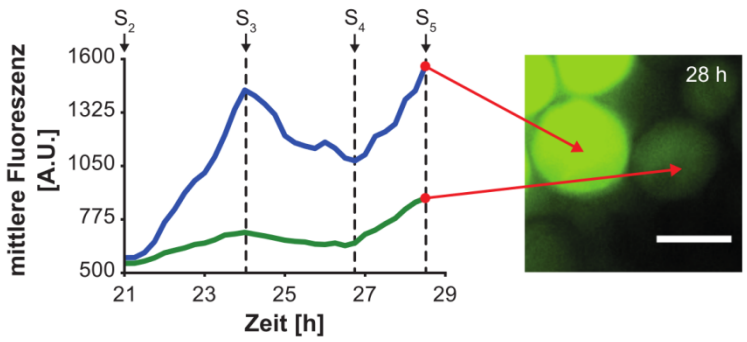


Abbildung 49: Mikrofluidische Analyse der Expressionsdynamik von Einzelzellen mit unterschiedlicher Fluoreszenzmagnitude (grün: niedriges Fluoreszenzlevel; blau: hohes Fluoreszenzlevel). Kultivierungsbedingungen und Änderung der Methioninkonzentration wie in Abbildung 48. Maßstab: 5 µm. Die Versuche zu dieser Abbildung wurden in Kooperation von Dr. Christopher Probst durchgeführt. Modifiziert nach Kusen et al.[173]

Zusammenfassend konnte die Charakterisierung der Genexpression mittels mikrofluidischer Einzelzell-Analysen zeigen, dass der Stamm *S.c.-pMET17-YFP* hervorragend geeignet ist für eine dynamische Regulation der *pMET17*-regulierten Genexpression. Es konnte ein regulatorischer Schwellenwert von 10 µM Methionin bestimmt werden, bei dessen Verwendung die Genexpression vollständig gestoppt bzw. pausiert werden konnte. Darüber hinaus zeigte das Expressionssystem eine exzellente Reversibilität beim mehrfachen Wechsel zwischen methioninfreiem und methioninhaltigem Medium. Dieses Reaktionsverhalten konnte trotz hoher Expressionsheterogenität insbesondere auch für Zellen mit sehr unterschiedlichem Expressionsniveau gleichermaßen gezeigt werden. Die Anpassung der Methioninkonzentration im Medium Konnte also genutzt werden, um die *YFP* Genexpression im *S.c.-pMET17-YFP* Reporterstamm mehrmals hintereinander ein- und auszuschalten.

2.4.3 Synthese und Charakterisierung von NVOC-Met (*caged*-Met)

Die Etablierung eines lichtregulierten Expressionssystems setzte neben der Charakterisierung eines geeigneten Reporterstammes auch der Entwicklung eines geeigneten *caged compound* voraus. Wie bereits in Kapitel 2.4.1 und Abbildung 44 ausführlich erläutert, beinhaltet das Konzept des angestrebten Expressionssystems die lichtvermittelte Freisetzung von Methionin. Durch diese Form der Freisetzung sollte die Regulation der Methioninkonzentration im Medium mittels Belichtung ermöglicht werden. Dies sollte, wie im vorherigen Kapitel 2.4.2 gezeigt, folglich auch die Schaltung der Genexpression im *S.c.-pMET17-YFP* Reporterstamm bewirken.

Zur photosensitiven Freisetzung von Methionin wurde erneut die Verwendung eines *caged compounds* angestrebt (Abbildung 50). Dabei kam ein ursprünglich für die Peptidsynthese entwickeltes Methionin-Derivat **61** mit der Abkürzung NVOC-Met [(*S*)-*N*-(4,5-Dimethyl-2-nitrobenzyl-oxycarbonyl)methionin] zur Anwendung.[183] Es besteht aus der Aminosäure Methionin (**59**), welche über die Aminogruppe mittels eines Carbamates an die photolabile Schutzgruppe 6-Nitroveratrylcarbonylchlorid (**60**) (NVOC) gekoppelt wurde. Die Synthese wurde nach einem einstufigen Verfahren zur Herstellung von NVOC-Threonin [(*S*)-*N*-(4,5-dimethyl-2-nitrobenzyl-oxycarbonyl)-Threonin] von Chen *et al.*[184] adaptiert und erbrachte eine Ausbeute von 65 %.

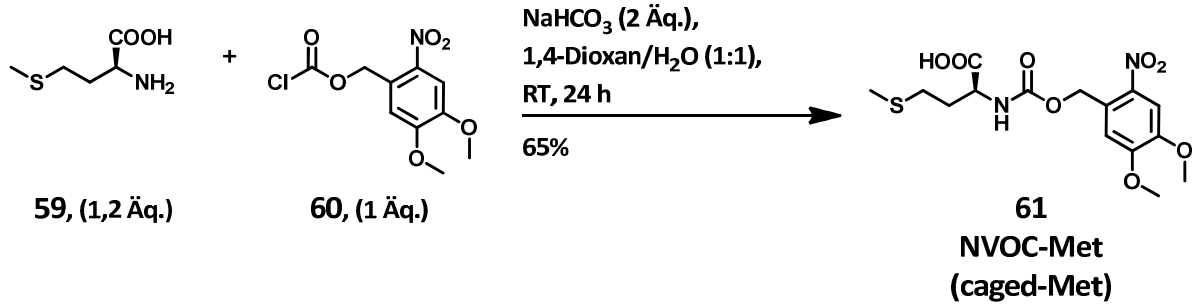


*Abbildung 50: Synthese von (S)-N-(4,5-Dimethyl-2-nitrobenzyl-oxycarbonyl)-methionin (NVOC-Met, **61**), modifiziert nach Chen et al.*[184]

Dabei wurde zunächst die Aminosäure (**59**) zusammen mit zwei Äquivalenten $NaHCO_3$ in einem Gemisch aus Dioxan und Wasser (1:1) vorgelegt. Anschließend wurde 6-Nitroveratrylcarbonyl-Chlorid (**60**) unter starkem Rühren zugegeben, um eine Addition dessen an die Aminogruppe der Aminosäure in einer SN_2-Reaktion unter Abspaltung von Chlorwasserstoff zu ermöglichen. Der geringe Syntheseaufwand (eine Reaktion und eine säulenchromatographischen Reinigung) ermöglichte damit trotz moderater Ausbeuten einen schnellen und einfachen Zugang zu den *caged compound* NVOC-Met (**61**).

Die Eignung des synthetisierten NVOC-Met zur photosensitiven Regulation des *pMET17-Expressionssystems* hing maßgeblich von zwei Faktoren ab. Zum einen musste das *caged compound* unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen stabil vorliegen. Ansonsten käme es zu einer ungewollten Entschützung, was zu einer unkontrollierbaren Beeinflussung des Expressionssystems führen würde. Zum anderen war eine kontrollierte photolytische Freisetzung des Methionins unter definierten Belichtungsbedingungen essentiell. Dieser Vorgang musste reproduzierbar und mit angemessener Belichtungszeit realisierbar sein, um

die präzise Kontrolle über das Expressionssystem zu erlangen ohne die Zellen durch übermäßige Bestrahlung zu schädigen.

Im Folgenden wurde NVOC-Met daher unter Berücksichtigung dieser beiden Aspekte genauer charakterisiert. Zur Untersuchung der Stabilität wurde NVOC-Met (0,8 mM) sowohl in sterilem SC-Medium, als auch in einer *S. cerevisiae-pMET17-YFP* Kultur inkubiert. Während der Kultivierung wurde die Konzentration an NVOC-Met mittels RP-HPLC Messungen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 dargestellt und zeigen deutlich, dass die Konzentration über eine Dauer von fünf Tagen konstant blieb. Der leichte Anstieg der Werte innerhalb der Standardabweichungen war vermutlich auf eine leichte Verdunstung des Mediums während der Kultivierung zurückzuführen. Der Versuch macht deutlich, dass NVOC-Met im SC-Medium und in *S. cerevisiae* Kultur stabil vorlag und somit bei nachfolgenden Experimenten keine unkontrollierte Freisetzung von Methionin zu erwarten war.

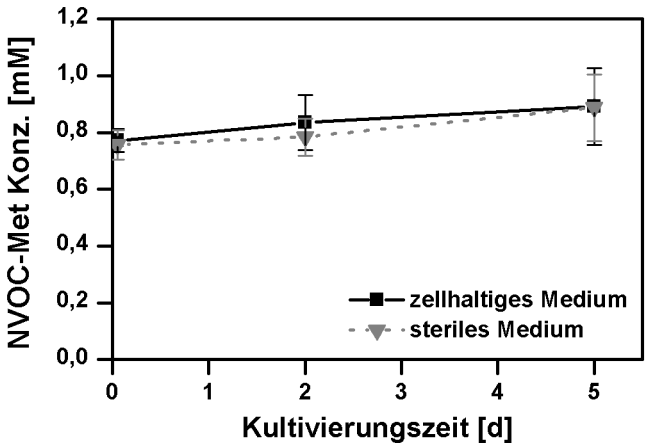


Abbildung 51: Stabilitätsmessung von NVOC-Met (0,8 mM zu zugegeben) in zellhaltigem und sterilem Medium bei Kultivierung in SC-Medium bei 30 °C im BioLector Setup. Die Konzentrationen wurden als Triplikate mittels RP-HLPC bestimmt. Modifiziert nach Kusen et al.[173]

Ebenso wichtig wie allgemeine Stabilität war jedoch auch die kontrollierte photolytische Zersetzung des NVOC-Met (**61**). In Abbildung 52 ist der Mechanismus dieser Reaktion dargestellt, dem der allgemein anerkannte Mechanismus der photolytischen Spaltung von 4,5-Dimethyl-2-nitrobenzyl-Schutzgruppe zugrunde liegt und auf die photolytische Spaltung von NVOC-Met übertragen wurde.[126,185,186]

Die photochemische Anregung von **61** führt vermutlich zunächst zur Bildung eines Isoxazolidins und somit zur Zwischestufe **62.** Bei der anschließenden Auflösung der

fünfgliedriegen Ringstruktur kommt es zur Abspaltung der Schutzgruppe als 2-Nitroso-3,4-dimethoxybenzaldehyd (**63**) und zu einer spontanen Decarboxylierung von **64**, wodurch das Methionin (**65**) freigesetzt wird. Zur Charakterisierung dieses Prozesses wurde zunächst ein Absorptionsspektrum von NVOC-Met (**61**) aufgenommen, um eine geeignete Wellenlänge für die Belichtung zu definieren.

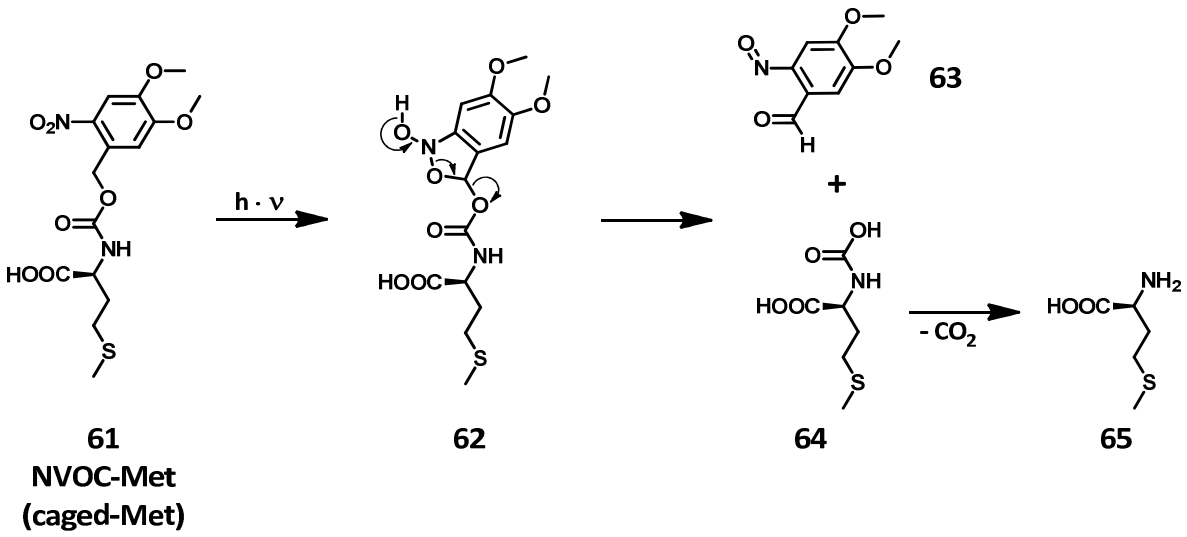


*Abbildung 52: Photolyse des (S)-N-(4,5-Dimethyl-2-nitrobenzyl-oxycarbonyl)-Methionin (NVOC-Met, **61**) unter Einwirkung von UVA-Licht nach dem allgemein anerkannten Mechanismus für 4,5-Dimethyl-2-nitrobenzyl-Schutzgruppen (NVOC) übertragen auf NVOC-Met.*[126,185,186]

Das Spektrum in Abbildung 53, A zeigt, dass das Absorptionsmaximum bei ca. 350 nm lag. Als Belichtungswellenlänge wurde daher 365 nm ausgewählt, da diese einen guten Zugang zu kommerziell erhältlichen Lichtquellen garantierte, und weiterhin 90 % des Absorptionsmaximums adressierte. Im Folgenden konnte dann eine photolytische Zerfallskinetik von NVOC-Met bestimmt werden. Dazu wurden NVOC-Met Proben (1,75 mM) in gepuffertem Wasser (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) für unterschiedlich lange Zeit bestrahlt (365 nm, 3 mW/cm^2) und die Konzentration mittels RP-HPLC gemessen. Die Leistung der Belichtungsapparatur war dabei geringer als bei der späteren Kultivierung im BioLector. Sie ermöglichte aber eine definiertere und homogenere Belichtung, weshalb zugunsten der Datenqualität auf eine direkte Vergleichbarkeit verzichtet wurde.

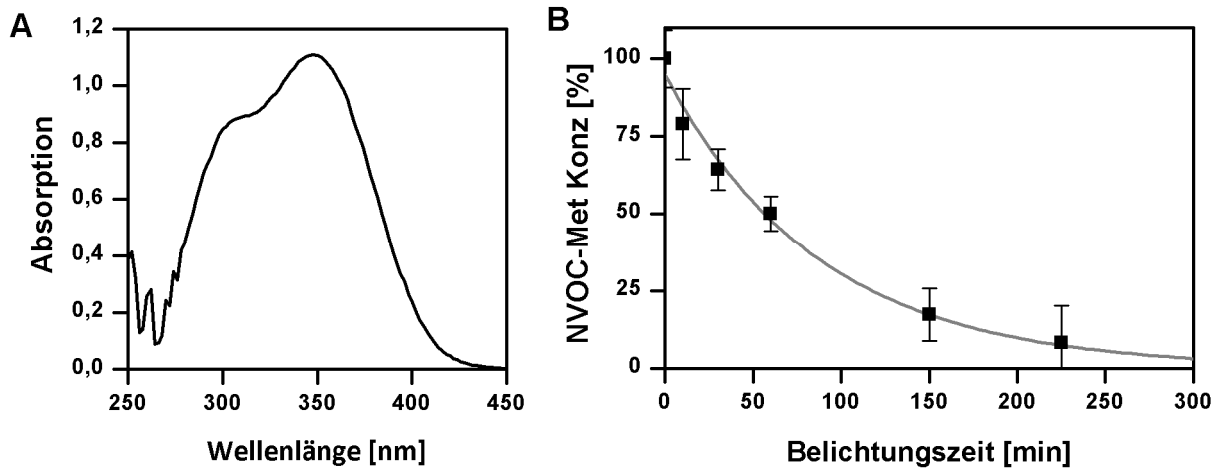


Abbildung 53: Photochemische Charakterisierung von NVOC-Met. (A) Absorptionsspektrum (0,1 mg/mL NVOC-Met) gemessen in gepuffertem Wasser (50 mM Tris-HCl, pH 7,4). (B) Photolyse-Kinetik von NVOC-Met (1,75 mM) unter UVA-Belichtung (λ_{max} = 365nm, F_0= 3 mW/cm^2) in gepuffertem Wasser (50 mM Tris-HCl, pH 7,4). Die Konzentrationen von NVOC-Met wurden als Triplikate mittels RP-HLPC bestimmt. Modifiziert nach Kusen et al.[173]

In Abbildung 53, B sind die Daten der photolytischen Kinetik dargestellt. Sie zeigen, dass die Konzentration an NVOC-Met mit zunehmender Belichtungsdauer in einem exponentiellen Verlauf abnahm. Die Hälfte der Ausgangskonzentration (875 µM) war bereits nach ca. 60 min erreicht und der vollständige Zerfall (1,75 mM) nach 300 min. Auf Basis dieser Daten kann von einer vollständigen und effizienten Photolyse des NVOC-Met unter den späteren experimentellen Bedingungen ausgegangen werden, insbesondere unter Berücksichtigung der geringeren Konzentration und der erhöhten Belichtungsintensität.

Die Regulierung des Expressionssystems konnte, wie bereits beschrieben, mit deutlich geringeren Konzentrationen von 10 µM erreicht werden (vgl. Kapitel 2.4.2). Zieht man die ca. 18-mal höhere Belichtungsintensität des späteren Kultivierungssetups (BioLector, F_0= 53 mW/cm^2, λ_{max} = 368 nm) in Betracht, so sollte die Belichtungsdauer zur Freisetzung von ausreichenden Mengen Methionin im Bereich von Sekunden bis wenigen Minuten liegen. Eine Regulierung des Genexpression des *S.c.–pMET17-YFP* Stammes sollte daher unter Verwendung von NVOC-Met ohne photolytische Schädigung der Zellen möglich sein.

2.4.4 Untersuchungen zu möglichen Toxizitäten

Die Behandlung von Mikroorganismen mit hohen Aminosäurekonzentrationen und UVA-Strahlung könnte das Wachstumsverhalten beeinträchtigen. Damit ein Expressionssystem zuverlässig eingesetzt werden kann, sollten Beeinflussungen durch die dazugehörigen Regulatoren jedoch möglichst gering sein. Dies reduziert mögliche Kreuzkorrelationen und erlaubt es, beobachtete Effekte auf die tatsächliche Expression zurückzuführen. Daher wurden Untersuchungen zur Toxizität der Regulatoren (Methionin, UVA-Strahlung) im Folgenden vorgenommen.

In Abbildung 54 sind Wachstumskurven zu den Kultivierungen dargestellt, welche zur Untersuchung der Vitalität durchgeführt wurden (SC-Medium, 30 °C, BioLector *Setup*). Diese Experimente wurden im Photo-BioLector *Setup* durchgeführt, um den späteren Versuchsbedingungen der optischen Regulation des Expressionssystems (Kapitel 2.4.5) zu entsprechen.

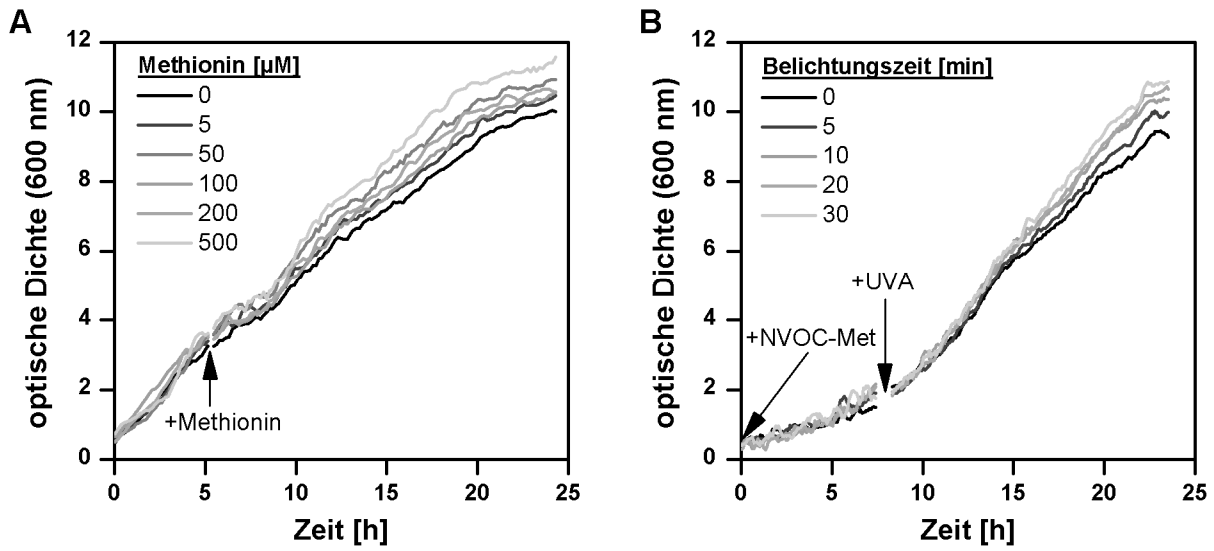


Abbildung 54: Untersuchungen zur möglichen Toxizität von Methionin, NVOC-Methionin, NVOC-Methionin-Zerfallsprodukten und UVA-Bestrahlung auf den Reporterstamm S.c.-pMET17-YFP. (A) Wachstumskurven des genannten Stammes im BioLector Setup (SC-Medium, 30 °C) bei Zugabe von unterschiedlichen Methioninkonzentrationen (0 - 500 µM) nach 5 h Kultivierungszeit. (B) Wachstumskurven bei Belichtung mit UVA-Strahlung (0 - 30 min, 3 mW/cm2) nach 8 h Kultivierungszeit in NVOC-Met haltigem (500 µM) SC-Medium (BioLector Setup, 30 °C)). Modifiziert nach Kusen et al.[173]

Die Abbildung 54, A zeigt zunächst die Auswirkung der Zugabe von nicht-modifiziertem Methionin. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden den Kulturen unterschiedliche Konzentrationen (0, 5, 50, 100, 200 und 500 µM) der Aminosäure zugegeben. Wie man anhand der optischen Dichte verfolgen kann, war kein negativer Effekt

auf das Wachstum zu beobachten. Alle untersuchten Kulturen wiesen ähnliche, sogar leicht gesteigerte Wachstumsraten im Vergleich zur uninduzierten Referenz (*S.c.-pMET-YFP*, 0 µM Methionin) auf. Darauffolgend wurde die Auswirkung der Bestrahlung in NVOC-Met-haltigem Medium untersucht. In Abbildung 54, B sind die Wachstumskurven des Reporterstammes *S.c.-pMET17-YFP* in NVOC-Met-haltigem SC-Medium (500 µM) gezeigt, wobei die Kulturen nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase unterschiedlich langen Belichtungen (0, 5, 10, 20 und 30 min, 3 mW/cm^2) ausgesetzt wurden. Durch den Einsatz des Regulators ohne und mit Belichtung konnte keine Verringerung des Wachstums beobachtet werde. Daher scheinen sowohl NVOC-Met als auch dessen Spaltprodukte keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der Hefezellen zu haben.

Die Versuche zur möglichen Toxizität konnten daher sicherstellen, dass NVOC-Methionin und UVA-Bestrahlung die Vitalität des Reporterstammes *S.c.-pMET17-YFP* unter den getesteten Bedingungen nicht beeinträchtigten.

2.4.5 Optische Repression der *pMET17*-regulierten Genexpression

Die Experimente zur optischen Regulation der Genexpression wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Georg Wandrey durchgeführt.

Im Anschluss an die Toxizitätsuntersuchungen sollte die optische Regulation der *pMET17*-regulierten Geneexpression untersucht werden. Dies erforderte zunächst die Charakterisierung dieser Geneexpression bei manueller Zugabe von Methionin unter vergleichbaren Kultivierungsbedingungen. Hierdurch sollte eine Referenz für einen Vergleich von optischer und „manueller“ Methioninzugabe erzeugt werden. Eine erneute Charakterisierung des Expressionssystems bei „manueller“ Methioninzugabe war nötig, da die folgenden Untersuchungen zum *S.c.-pMET17-YFP* Expressionssystem im BioLector *Setup* (s. Kapitel 5.3.4) durchgeführt werden sollten. Die mittels mikrofluidischer Kultivierungen gewonnenen Ergebnisse zur Charakterisierung der *pMET17*-regulierten Geneexpression konnte somit nicht verwendet werden, da die Kultivierungsbedingungen deutlich vom BioLector *Setup* abweichen.

Der größte Unterschied lag in den Bedingungen des umgebenden Mediums. Bei der mikrofluidischen Kultivierung handelt es sich um einen kontinuierlichen Betrieb, bei dem die Zellen stetig mit frischem Medium versorgt werden. Daher kann es weder zur extrazellulären Akkumulation von Stoffwechselprodukten, noch zu einer abbaubedingten

Konzentrationsverringerung einer Mediumkomponente kommen. Im Vergleich dazu handelt es sich bei der Kultivierung im BioLector *Setup* um einen *Batch*-Betrieb. Dabei werden die Kultivierungskammern einmalig mit Medium befüllt und bleiben anschließend geschlossen. Folglich kann es während der Fermentation zur Akkumulation von Stoffwechselprodukten und dem Abbau von Mediumbestandteilen kommen.

Zur Erstellung einer Referenz wurde daher zunächst eine bestrahlungsfreie Charakterisierung des *S.c.-pMET17-YFP* Expressionssystems bei Zugabe von nicht-modifiziertem Methionin im BioLector *Setup* durchgeführt. Die Daten dieser Charakterisierung sind in Abbildung 55, A dargestellt.

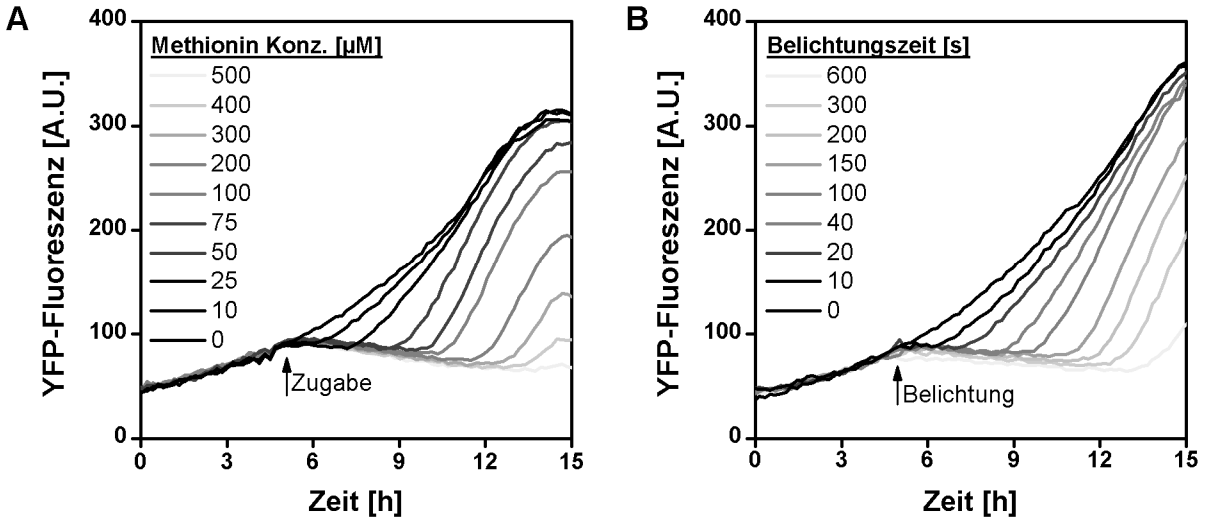


Abbildung 55: Echtzeitmessung der YFP-Protein Bildung bei „manueller" und optischer Repression. Diese erfolgte durch (A) Zugabe von Methionin (0 - 500 µM) und durch (B) Belichtung (0 - 600 s UVA, 368 nm, 53 mW/cm) von zu Beginn der Kultivierung (BioLector Setup, SC-Medium, 30 °C) zugegebenem NVOC-Met (500 µM). Die Fluoreszenz des YFP-Proteins wurde online durch die Photo-BioLector Apparatur aufgezeichnet. Messung der Daten von Georg Wandrey. Modifiziert nach Kusen et al.[173]

Dazu wurden Zellen des Reporterstammes *S.c.-pMET17-YFP* zunächst ohne Zusatz von Methionin kultiviert, wodurch das Expressionssystem im aktiven (dereprimiert) Zustand vorlag. Daher kam es zur Bildung von YFP-Protein erkennbar am Anstieg des YFP-Fluoreszenzsignals. Nach fünf Stunden Inkubation befanden sich die Kultur am Anfang der exponentiellen Wachstumsphase (Daten nicht gezeigt) und die manuelle Zugabe von unterschiedlichen Methioninkonzentrationen wurde durchgeführt. Deutlich zu erkennen ist, dass es nahezu ohne Zeitverzögerung zu einer Stagnation des YFP-Fluoreszenzsignals kam, dass, wie erwartet, auf eine Deaktivierung (Repression) des Expressionssystems schließen lässt. Auffällig ist jedoch, dass es nach einer gewissen Dauer, abhängig von der Methioninkonzentration, wieder zu einem steilen Anstieg des Fluoreszenzsignals kam. Dabei

nahm die Dauer der Repression mit der Höhe der eingesetzten Methioninkonzentration zu. der erneute Anstieg der YFP-Fluorenzenz lässt vermuten, dass die intrazellulär verfügbare Methioninkonzentration aufgrund von zellulärem Abbau/Umwandlung mit der Zeit wieder abnahm. Fiel die Konzentration dann wieder unter einen bestimmten Schwellenwert (vermutlich zwischen 1 und 10 µM, vgl. dazu Kapitel 2.4.2) wurde das Expressionssystem aktiviert (dereprimiert) und es kam zur erneuten Bildung von YFP-Protein. Die Zugabe von Methionin bewirkte also ein temporäres Pausieren der *pMET17*-regulierten Genexpression, wobei die Dauer der Pause von der eingesetzten Methioninkonzentration abhängig ist.

Im Anschluss an die Charakterisierung der „manuellen" Methioninzugabe konnte die Regulierung des *S.c.-pMET17-YFP Expressionssystems* mittels NVOC-Met-basierter photolytischer Freisetzung von Methionin untersucht werden. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind im Abbildung 55, B dargestellt. Hierzu wurden Kultivierungen des Reporterstammes *S.c.-pMET17-YFP* analog zum Charakterisierungsversuch (Abbildung 55) gestartet. Dabei wurden den Kulturen jedoch zu Beginn bereits NVOC-Met (500 µM) zugegeben. Wiederum nach fünf Stunden Inkubation wurden die Hefekulturen für unterschiedlich lange Zeit belichtet (365 nm; 53 mW/cm^2), um eine Freisetzung von Methionin zu bewirken. In Abbildung 55, B ist deutlich zu erkennen, dass es durch die Belichtung zu einem sehr ähnlichen Expressionsverhalten wie bei der manuellen Zugabe von Methionin kam. Unmittelbar nach der Belichtung kam es zu einer Unterbrechung der YFP-Proteinbildung, wobei die Dauer diesmal direkt von der Belichtungszeit abhängig war.

In Abbildung 56 wird die Übereinstimmung des Expressionsverhaltens bei manueller Methioninzugabe und NVOC-Met Bestrahlung noch deutlicher. In dieser Abbildung ist die Dauer der Expressionspause (d.h. die Phase annähernd konstanten Fluoreszenzsignals nach Zugabe/Belichtung) gegen die eingesetzte Methioninkonzentration (obere, graue X-Achse) bzw. gegen die Belichtungszeit (untere, schwarze X-Achse) aufgetragen. Wie zu erkennen ist, sind die beiden Graphen nahezu deckungsgleich. Daher konnte unter den gegeben Bedingungen eine Korrelation angegeben werden, bei der 1 s UVA-Belichtung (368 nm, 53 mW/cm) äquivalent war zur manuellen Zugabe von 1 µM Methionin.

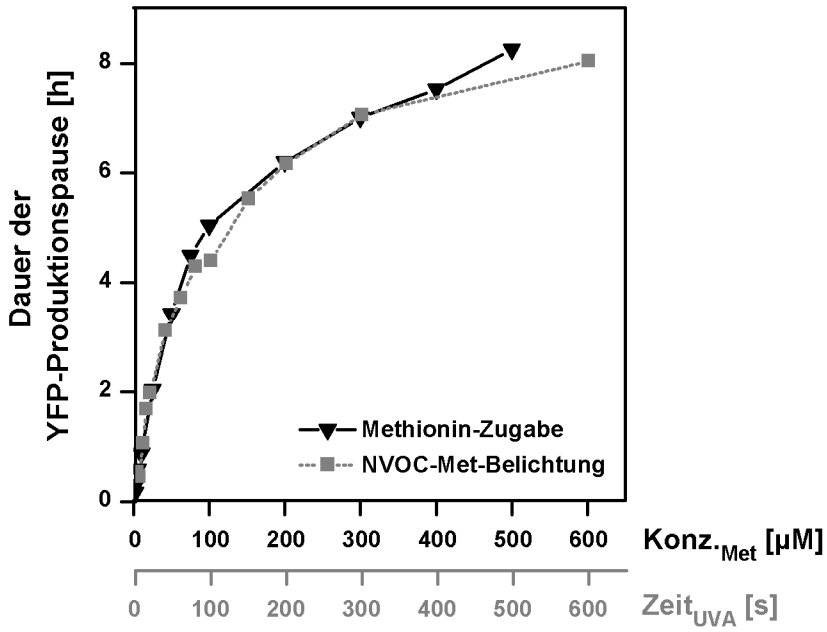


Abbildung 56: Repressionsdauer der in Abbildung 55 dargestellten Expressionsverläufe in Abhängigkeit von der eingesetzten Belichtungszeit bzw. Methioninkonzentration. Dargestellt ist die Korrelation zwischen der Repressionsdauer (Länge der Plateauphasen zwischen 5 und 15 h Kultivierungszeit in Abbildung 55, A und B) und der zugegeben Methioninkonzentration (obere, schwarze X-Achse) bzw. der eingesetzten UVA-Belichtungsdauer (368 nm, 53 mW/cm; untere, graue X-Achse). Kultivierungs- und Belichtungsbedingungen bei Abbildung 55 angegeben. Modifiziert nach Kusen et al.[173]

Es lässt sich zusammenfassen, dass die optische Regulation des *S.c.-pMET17-YFP Expressionssystems* erfolgreich war. Dabei konnte in Hefekulturen Methionin aus NVOC-Met mittels Photolyse freigesetzt werden, was zur raschen Repression der *pMET17-regulierten Genexpression* führte. Dies konnte unter Verwendung von zellkompatiblen Belichtungsdauern (10 s - 10 min) realisiert werden, wodurch eine strahlungsbedingte Schädigung der Zellen möglichst gering gehalten werden konnte. Zusätzlich zeigte sich ein reversibles Regulationsverhalten, bei dem die Dauer der Deaktivierung durch die Belichtungszeit gesteuert werden konnte. Dies ergab sich wahrscheinlich aus dem zellulären Abbau des photolytisch freigesetzten Methionins und der daraus resultierenden Reaktivierung der *pMET17*-regulierten Genexpression. Demzufolge eröffnet sich die Möglichkeit einer dynamischen Regulation durch wiederholte Belichtung, bei der die *pMET17*-regulierten Genexpression reversibel und beliebig häufig aktiviert bzw. deaktiviert werden kann. Untersuchungen dazu wurden daher in den folgenden Abschnitten unternommen.

Optische Regulation von Expressions-Pausen

Wie bereits erwähnt, ermöglicht die reversible Repression der *pMET17*-kontrollierten Genexpression die Möglichkeit einer wiederholten Regulation. Daher wurde untersucht, ob die YFP-Produktion innerhalb einer Kultivierung mehrfach deaktiviert und reaktiviert werden konnte.

Dazu wurde zunächst ein *Screening* durchgeführt mit dem Ziel, die lichtinduzierte Repressionsdauer für unterschiedliche Zeitpunkte der Kultivierung zu charakterisieren. Dies war notwendig, da die Dauer der Repression sehr stark von der Kultivierungszeit abhing. Je höher die Zelldichte war, desto schneller kam es vermutlich zur Metabolisierung des photolytisch freigesetzten Methionins und folglich auch zur schnelleren Reaktivierung (Derepression) des *pMET17*-kontrollierten Genexpression. Die Ergebnisse des *Screenings* sind in Abbildung 57 veranschaulicht.

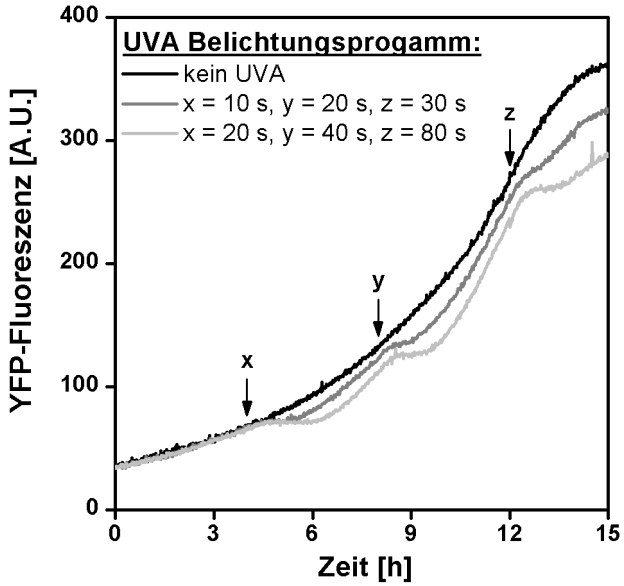


Abbildung 57: Mehrfache reversible Repression der YFP-Produktion durch Photolyse von NVOC-Met (BioLector Setup, SC-Medium, 30 °C, 500 µM NVOC-Met). Die Belichtung der S.c-pMET17-YFP Kulturen erfolgte nach 4, 8 und 12 Stunden (Pfeile bei x, y, z). Die Dauer der UVA-Belichtung (368 nm, 53 mW/ cm) zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten kann der Legende entnommen werden Messung der Daten von Georg Wandrey. Modifiziert nach Kusen et al.[173]

Wie an den Markierungen (x, y, z) zu erkennen ist, wurden die Kultivierungen jeweils zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (5, 8, 12 h) belichtet. Dabei zeigen die dunkel- und hellgrauen Graphen die YFP-Fluoreszenzintensitäten für zwei unterschiedliche Belichtungsprogramme und der schwarze Graph eine Kontrolle ohne Belichtung. Die Belichtung wurde nach folgendem Programm durchgeführt: dunkelgrauer Graph: 10 s nach

5 h, 20 s nach 8 h, 30 s nach 12 h; hellgrauer Graph: 20 s nach 5 h, 40 s nach 8 h, 80 s nach 12 h.

Der Verlauf der YFP-Fluoreszenz zeigt, dass nach jeder Belichtung eine rasche Stagnation der YFP-Produktion erfolgte unabhängig von Kultivierungszeitpunkt. Die Belichtungsdauer musste jedoch mit fortschreitender Kultivierungszeit erhöht werden, um eine vergleichbare Repressionsdauer zu erzielen. Nach jeder Stagnationsphase kam es zu einer Reaktivierung der Produktion, erkennbar an einem steilen Anstieg des YFPYFP-Fluoreszenzsignals. Durch eine Verlängerung der Belichtungszeit konnte auch zu späteren Kultivierungszeitpunkten Einfluss auf die Dauer der Produktionspause genommen werden.

Als Fazit kann also vermerkt werden, dass die optische Regulation des S.c.-*pMET17-YFP* Expressionssystem eine reversible dynamische Regulation der Genexpression ermöglichte. Die *pMET17*-kontrollierten Genexpression konnte durch UVA-Belichtung von NVOC-Met wiederholt hintereinander deaktiviert werden, wobei der Zeitpunkt der Reaktivierung durch die Dauer der UVA-Belichtung reguliert werden konnte. Die Dauer der Deaktivierung war hierbei von der photolytisch freigesetzten Methioninkonzentration und dem zelldichte-abhängigen, vermutlich durch zelluläre Metabolisierung bedingten, Methioninverbrauch bestimmt.

Optische Regulation des Expressions-Starts

Bei den vorangegangenen Experimenten zur optischen Regulation war es nur möglich, eine von Beginn an aktivierte Expression zu deaktivieren. Somit konnte der Start der *pMET17*-regulierten Genexpression während einer Kultivierung in den vorherigen Kapiteln nicht regulieren. Gerade für biotechnologische Anwendungen kann eine verzögerte Induktion der Genexpression während einer Kultvierung aber von großem Interesse sein. Dies könnte beispielsweise der Fall sein, wenn die homo- bzw. heterologe Überexpression von Proteinen eine nennenswerte Belastung für den Expressionswirt darstellt, etwa durch die Beanspruchung zellulärer Ressourcen, oder aufgrund von Toxizitätsproblemen.[187] Andere Anwendungen könnten in der sequenziellen Ganzzell-Biotransformation von Zielmolekülen liegen, wobei die einzelnen Umwandlungsstufen gezielt nacheinander geschaltet werden müssten. Aufgrund dessen kann es von Interesse sein, die Genexpression z. B. erst nach Erreichen einer geeigneten Zelldichte zu aktivieren.[188] Daher wurde im Folgenden

untersucht, ob eine optische Regulation des Expressionsstarts auch im *S.c.-pMET17-YFP* Expressionssystem möglich ist.

Experimentell sollte dies durch kurze sequentielle Belichtungen in festgelegten Intervallen zu Beginn der Kultivierung versucht werden. Ziel war es, gerade genug Methionin freizusetzen, um die Expression bis zum nächsten angedachten Belichtungszeitpunkt zu reprimieren. Somit ergäben sich vor jedem Belichtungszeitpunkt zwei unterschiedliche Möglichkeiten: Erstens die Fortsetzung der sequentiellen Belichtung, womit die Repression weiter aufrechterhalten würde. Zweitens die Beendigung der sequentiellen Belichtung, das zum Start (zur Derepression) der Genexpression führen würde, bedingt durch das rasche Absinken der Methioninkonzentration unter den reprimierenden Schwellenwert aufgrund des intrazellulären Verbrauchs.

In Abbildung 58 sind die Ergebnisse zur optischen Regulation des Expressionsstarts nach diesem Prinzip dargestellt. Die Graphen im oberen Diagramm zeigen dabei die Entwicklung der YFP-Fluoreszenzintensität, wobei die Belichtungsschemata in der unteren Abbildungshälfte veranschaulicht sind. Die schwarz gestrichelte Linie in der oberen Abbildungshälfte stellt eine Referenzkultur ohne Belichtung dar. Die anderen vier Hefekulturen wurden jeweils sequenziell alle halbe Stunde belichtet, wobei die Dauer mit fortschreitender Inkubationszeit graduell erhöht wurde (von 4 s bei 0 h auf 15 s bei 8 h). Dies war nötig, um die steigende Methionin-Metabolisierungsrate bedingt durch die wachsende Zelldichte zu kompensieren. Die sequentielle Belichtung wurde bei den vier Kultivierungen nach unterschiedlicher Inkubationszeit (2, 4, 6 und 8 h) gestoppt.

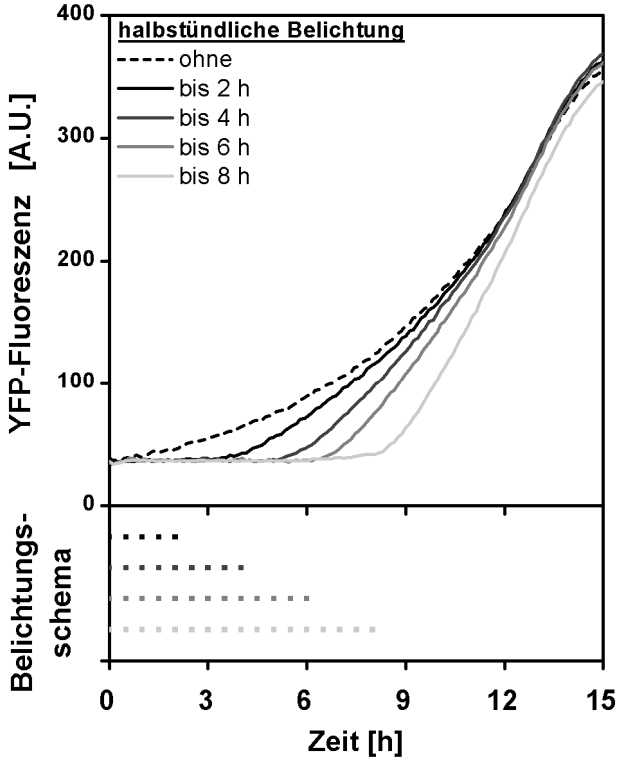


Abbildung 58: Optische Regulation des Expressionsstarts einer Kultivierung des Reporterstammes S.c.-pMET17-YFP (BioLector Setup, SC-Medium, 30 °C, 500 µM NVOC-Met). Jeweils halbstündige Repressionen der pMET17-regulierten Genexpression zu Beginn der Kultivierung durch kurze Belichtungen (368 nm, 53 mW/ cm). Bleibt nach einer halben Stunde eine erneute Belichtung aus, wird die Genexpression aktiviert (dereprimiert). Zeitpunkte der Belichtungen (graduelle Erhöhung 4 s bei 0 h auf 15 s bei 8 h) im unteren Schema veranschaulicht. Messung der Daten von Georg Wandrey. Modifiziert nach Kusen et al.[173]

Die Verläufe der Fluoreszenzintensitäten zeigen deutlich, dass die Expression bei den belichteten Kultivierungen im Gegensatz zur der unbelichteten Referenz zu Beginn der Kultivierung erfolgreich reprimiert werden konnten. Der Vergleich der Belichtungsschemata mit den Fluoreszenzintensitäten macht deutlich, dass es nach Beendung der sequentiellen Belichtung zu einer Derepression der *pMET17*-regulierten Genexpression mit nur geringer Verzögerung kam. Dies ist an einem steilen Anstieg der Fluoreszenzintensität kurz nach dem letzten Belichtungsvorgang zu beobachten.

Zusammenfassend kann daher festgehalten werden, dass eine optische Regulierung des Expressionsstarts im *S.c.-pMET17-YFP* Expressionssystem nach der Methode der sequentiellen Belichtung erfolgreich durchgeführt werden konnte. Zu Beginn der Kultivierung konnte die Repression der Expression durch kurze sequentielle Belichtungen aufrechterhalten werden. Dabei wurde die Genexpression durch die jeweils freigesetzte Methioninkonzentration nur für eine halbe Stunde unterdrückt. Somit konnte halbstündig entschieden werden, ob die Repression fortgesetzt oder die Genexpression gestartet werden

sollte. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Expressionsstart durch die gezielte Verwendung der Expressionsrepression reguliert werden kann. Dies wurde durch die präzise Methioninfreisetzung, ermöglicht, welche sich aus der photolytische NVOC-Met Spaltung ergibt.

Optische Regulation der Expressions-Rate

In den vorherigen Kapiteln konnte bereits erfolgreich demonstriert werden, dass die optische Regulation der *pMET17*-regulierten Genexpression eine präzise Kontrolle über Expressionsstart, -stopp und -pause erlaubt. Bei diesen „klassischen" Expressionsparametern einer homo- bzw. heterologen Genexpression handelt es sich um „statische" Parameter, welche jeweils nur einen einmaligen Schaltvorgang benötigen. Diese Expressionsparameter können daher vielfach auch bei nicht-optischen regulierbaren Expressionssystemen gesteuert werden, wobei die Regulation jedoch meistens irreversibel ist. Die Expressionsrate stellt dagegen einen „dynamischen" Parameter dar, welche eine anhaltende Regulation mit vielfachen Schaltvorgängen erfordert. Unter Expressionsrate ist im Folgenden eine konstante Zunahme der Proteinkonzentration gemeint. Definiert ist dies in den folgenden Versuchen als konstante Steigung der Fluoreszenzintensität während einer Kultivierung. Diese Definition ist klar zu unterscheiden von einer graduellen Expressionsausbeute, welche bei der *caged*-Cu^{2+} Regulation erreicht werden konnte (vgl. Kapitel 2.2.4 sowie Wandrey *et al.*[120]) Dabei korreliert die Endkonzentration des Zielproduktes/-proteins direkt mit der Menge/Stärke eines eingesetzten Effektors. Dazu werden z. B. ansteigende Induktor-konzentrationen verwendet, um eine zunehmende Endkonzentration des Produktes zu erhalten. Die jeweiligen Produktionsprozesse stellen dabei in der Regel aber annähernd sigmoidale Verläufe mit sich wandelnden Produktionsraten dar.

Zur Regulation der Expressionsrate wurde eine EDV-basierte, automatische Steuerung der Belichtung angestrebt. Ziel war es, die Rate der YFP-Fluoreszenzzunahme über einen definierten Zeitraum anhand von vorgegebenen Werten konstant zu halten. Dazu wurde ein geschlossener Regelkreis genutzt, bei dem die aktuelle Rate YFP-Fluoreszenzzunahme mit einem zuvor vom Anwender vorgegebenen Wert verglichen wurde (Abbildung 59). Überstieg der aktuelle Wert die Anwendervorgabe, so sollte von der Software eine zeitlich befristetet Belichtung eingeleitet werden, um die Expressionsrate zu begrenzen.

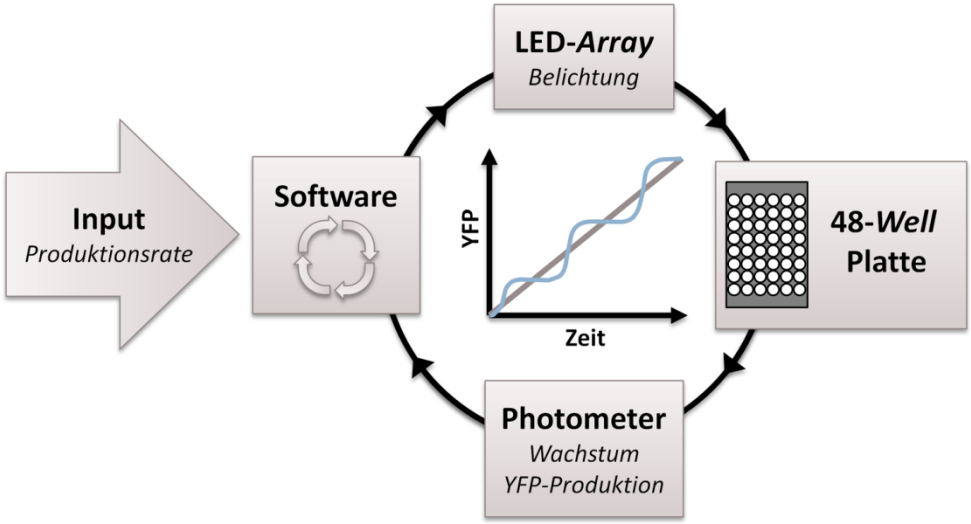


Abbildung 59: Schematische Darstellung des geschlossenen Regelkreises zur Generierung von konstanten YFP-Produktionsraten mit dem S.c.-pMET17-Expressionssystem und vorgelegtem NVOC-Met. Die Software-Schnittstelle erhält Echtzeitdaten über die YFP-Produktion und schaltet die LED-Beleuchtung (und damit die Repressorfreisetzung) automatisiert ein, sobald die vorgegebene Expressionsrate überschritten wird. Die Produktionsrate sinkt danach zeitweise bis zu Reaktivierung der Expression nach Verbrauch des freigesetzten Methionins.

Die Ergebnisse dieses Prozesses sind in Abbildung 60 veranschaulicht. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Entwicklung der YFP-Fluoreszenzintensität bei der Vorgabe einer bestimmten Produktionsrate. Die korrespondierenden gestrichelten Linien in derselben Farbe machen dabei die vorgegebenen Produktionsraten im Zeitraum von 3 - 13 h sichtbar. Die schwarze Linie stellt die Fluoreszenzentwicklung einer nicht-regulierten Referenzkultur dar.

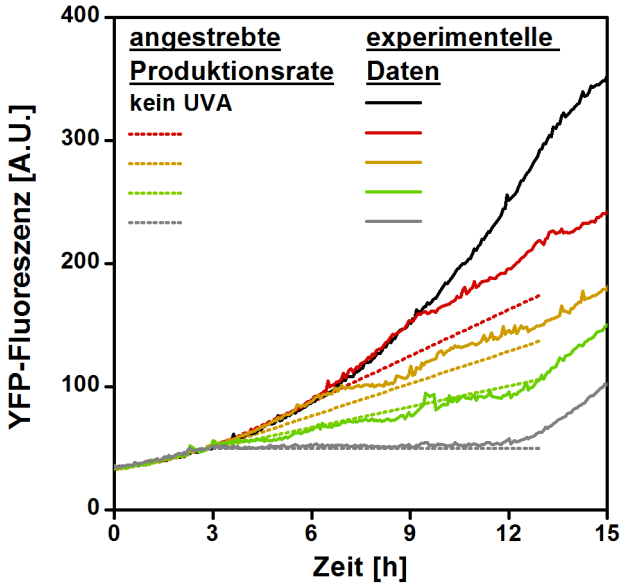


Abbildung 60: Automatisierte Kontrolle der YFP-Produktionsrate in einem geschlossenen Regelkreis unter Verwendung einer autonomen Software zur Regulation der Belichtung. Bei Überschreitung eines festgelegten Schwellenwertes für die Produktionsrate wurde eine Belichtung eingeleitet, um die YFP-Produktion temporär zu reprimieren. Gestrichelte Linien repräsentieren die vorgegeben Produktionsrate im gesetzten Regulationszeitraum (3 - 13 h). Durchgehende Linien geben die YFP-Fluoreszenz der einzelnen Kultivierungen wieder. Kultiviert wurde der Reporterstamm S.c.-pMET17-YFP in SC-Medium im BioLector Setup bei 30 °C und einer Anfangskonzentration an NVOC-Met von 500 µM. Messung der Daten von Georg Wandrey. Modifiziert nach Kusen et al.[173]

Erkennbar ist zunächst, dass die tatsächlichen Fluoreszenzsignale in Regulationszeitraum (3 - 13 h) sehr ähnlich zu den vorgegeben linearen Produktionsraten verlaufen, mit geringen Abweichungen bei der größten vorgegebenen Produktionsrate (roter und gelber Graph). Es konnte erreicht werden, dass die Hefekulturen beim Überschreiten der vorgegebenen Produktionsrate automatisch belichtet wurden. Dadurch wurde die Genexpression temporär reprimiert und ein weiteren Anstieg der Fluoreszenz verhindert. Anschließend erfolgte, vermutlich nach Metabolisierung des Repressors Methionin, eine Reaktivierung des Expressionssystems. Die YFP-Proteinproduktion wurde damit bis zur nächsten Überschreitung der vorgegebenen Produktionsrate fortgesetzt. Somit konnte ein alternierende Aktivität der Genexpression erzielt werde, die einen definierten, annähernd konstanten Anstieg der YFP-Produktion ermöglichte. Insbesondere bei den grünen und grauen Graphen ist nach Ablauf des Regulierungszeitraums (3 - 13 h) ein steiler Anstieg des Fluoreszenzsignals zu erkennen, wodurch die Wirksamkeit der Regulation zusätzlich verdeutlicht wird.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die angestrebte Begrenzung der Expressionsrate durch eine automatisierte Belichtungssteuerung des *S.c.-pMET17-YFP*

Expressionssystems erfolgreich war. Dabei zeigte sich, dass ein Belichtungsmodul aus prozesstechnischer Sicht bestens geeignet ist, um vielfache Schaltvorgänge während einer Expressionskultivierung zu ermöglichen. Die nicht-invasive Schaltung der Genexpression durch eine integrierte Belichtungseinheit könnte daher genutzt werden, um Kontaminationen zu reduzieren und eine Limitierung der Schaltfrequenz wie beim mechanischen Pipettieren zu umgehen.

Desweiteren könnte die optische Regulation der *pMET17*-kontrollierten Genexpression angewendet werden, um Limitationen bei der mikrobiellen Produktion von Proteinen und Chemikalien zu vermeiden, welche durch ungehinderte Maximierung der Expressionsrate von hetero- bzw. homologen Genexpression auftreten. Die ungehinderte Maximierung kann dabei zu zellulären Belastungen bedingt durch Fehlfaltung oder Akkumulation von Proteinen sowie Anreicherung von toxischen Intermediaten führen, wodurch die Produktivität gemindert wird.[187,188] Eine gezielte Drosselung der Expressionsrate, wie bei der optischen Regulation der S.c.-*pMET17-YFP* Expresssionssystems gezeigt, könnte daher helfen diese Probleme bei der hetero- oder homologen Genexpression zu umgehen.

3 Zusammenfassung

Im Verlauf dieser Arbeit wurden optische Expressionssysteme in *S. cerevisiae* entwickelt, die eine nichtinvasive Regulation der Genexpression mittels Belichtung ermöglichen. Wie in Abbildung 61 schematisch dargestellt, wurden dabei sogenannte *caged compounds* eingesetzt. Diese photolabilen Verbindungen zerfallen bei Belichtung und setzen ein spezifisches Effektormolekül zur Regulation des jeweiligen Expressionssystems frei. Dabei wurde ein Gen des *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) als Zielgen verwendet, um den Verlauf der Expression anhand von Fluoreszenzmessungen verfolgen zu können.

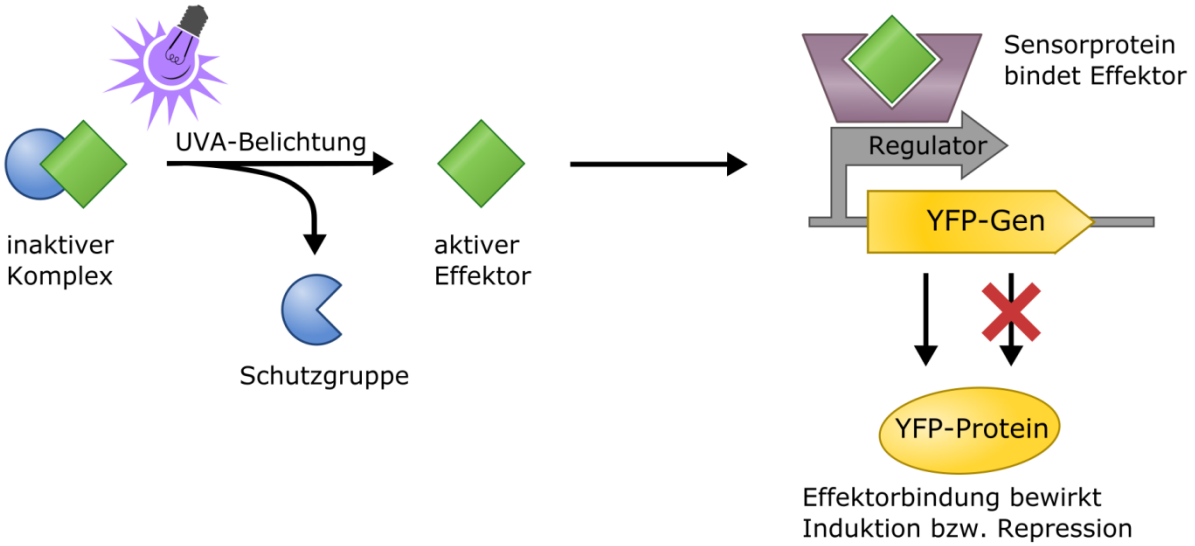


Abbildung 61: Allgemeines Schema zur lichtvermittelten Regulation der Genexpression mittels caged compounds. Modifiziert nach Kusen et al.[92]

Die lichtregulierte Freisetzung von Effektormolekülen zur Regulation der Genexpression konnte bereits an einigen Beispielen erfolgreich demonstriert werden (s. Kapitel 1.5).[83,88,90] Dabei bietet diese Technologie interessante Eigenschaften, wie eine genaue Dosierbarkeit, eine Verringerung des mechanischen Aufwandes und eine minimal-invasive Applikation, wodurch eine sterile Arbeitsweise und konstante atmosphärische Bedingungen ermöglicht werden können.[120,173]

Trotz dieser Vorteile hat die *caged compound* Strategie zur lichtregulierten Genexpression in der (industriellen) Biotechnologie noch keine breite Anwendung gefunden. Ein Grund dafür könnte der Mangel an bereits etablierten *caged compound* basierten Expressionssystemen sein. Einige Beispiele für *E. coli,* bei denen weit verbreitete genetische

Expressionssysteme erfolgreiche mittels *caged compounds* reguliert werden konnten, zeigen bereits das Potential dieser Technologie. Sie wurden aber erst während der Forschungsarbeiten zu dieser Dissertation oder in der letzten Dekade veröffentlicht und decken nur ein kleines Spektrum der bekannten Expressionssysteme ab.[97,98,103,105,189]

Für *S. cerevisiae* gibt es bisher keine Anwendungsbeipiele von *caged-compound*-basierten genetischen Expressionssystemen. Aufgrund dessen lag der Fokus dieser Dissertation auf der Entwicklung von *caged compound* basierten Expressionssystemen in *S. cerevisiae.* Als Grundlage sollten bio(techno)logisch relevante Promotoren und kommerziell oder synthetisch leicht zugängliche *caged compounds* gewählt werden, um die Verbreitung und Anwendbarkeit dieser Technologie zu fördern.

Eine Übersicht der verwendeten *caged compounds* sowie der dazugehörigen Promotoren mit ihren jeweiligen Funktionsweisen wird in Tabelle 8 gegeben. Auf genetischer Ebene wurden die in *S. cerevisiae* häufig zur heterologen Genexpression angewendeten Promotoren *pGAL1*, *pCUP1* und *pMET17* verwendet. Diese variieren zum einen in der Expressionsstärke und zum anderen in der Funktionsweise, die eine Induktion bzw. Repression der Genexpression erlaubt.[63,69] Hierdurch sollte eine möglichst große Bandbreite an lichtregulierten Expressionssystemen geschaffen werden, um eine vielseitige Anwendbarkeit zu gewährleisten.

Die beiden *caged compounds* NVOC-Methionin und DMNP-EDTA-Cu^{2+} konnten erfolgreich eingesetzt werden, um eine nichtinvasive Regulation der Genexpression mittels Belichtung zu ermöglichen. Dabei konnte sowohl eine lichtvermittelte Repression mit Hilfe des *MET17*-Promotors als auch eine lichtvermittelte Induktion der Genexpression unter Verwendung *CUP1*-Promotor, erreicht werden. Bei der Entwicklung der lichtvermittelten Regulation des *GAL1*-Promotors und bei der lichtvermittelten Repression des *CUP1*-Promotors konnten die Reporterstämme erfolgreich erstellt und charakterisiert werden. Dabei führte der Einsatz der für diese Systeme getesteten, neuartigen Effektoren NPip-Galaktose und DEACM-EDTA jedoch noch nicht zur erfolgreichen Regulation mittels Belichtung, weshalb eine weitere Optimierung dieser *caged compound* Strategien notwendig ist.

Tabelle 8: In dieser Arbeit untersuchte Systeme zur lichtregulierten Genexpression mittels caged compounds. NVOC-Methionin und DMNP-EDTA-Cu^{2+} konnten erfolgreich zur Regulation der Genexpression in S. cerevisiae eingesetzt werden.

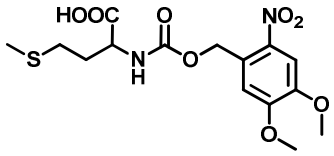
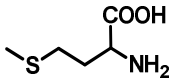
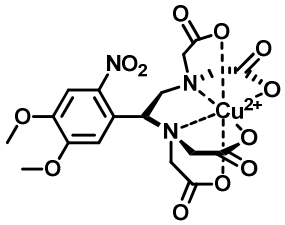
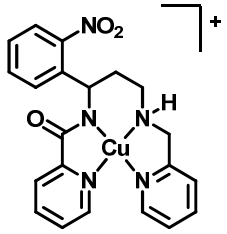
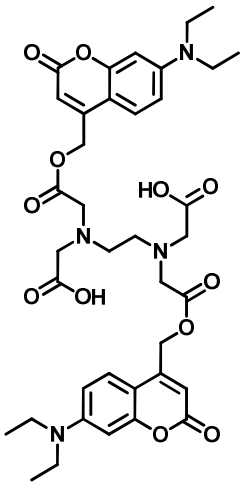
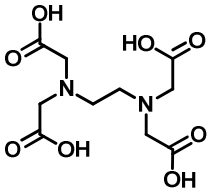
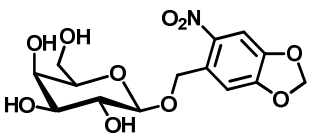
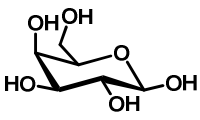
Caged compound	**Effektor**	**Promotor**	**Expressionsregulation**
 NVOC-Methionin (**61**)	 Methionin (**59**)	*pMET17*	Repression (reversibel)
 DMNP-EDTA-Cu^{2+} (**39**)	Cu^{2+} Cu^{2+}-Ionen	*pCUP1*	Induktion
 *3Gcage*-Cu^{2+} (**42**)	Cu^{2+} Cu^{2+}-Ionen	*pCUP1*	Induktion
 DEACM-EDTA (**58**)	 EDTA (**66**)	*pCUP1*	Repression
 NPip-Galaktose (**35**)	 Galaktose (**37**)	*pGAL1*	Induktion

Tabelle 9 enthält eine Übersicht zu den Eigenschaften der photolytischen Zerfälle sowie zu den regulatorischen Konzentrationen der einzelnen *caged compounds*, die in dieser Arbeit charakterisiert wurden. Vergleicht man die photolytischen Eigenschaften, sollten die folgenden Ergänzungen beachtet werden: Bei NVOC-Methionin ermöglichte die gute Löslichkeit den Einsatz von Konzentrationen, welche 50-fach über dem regulatorischen Schwellenwert lagen. Dadurch konnte die notwendige Belichtungszeit trotz eines $t_{1/2}$-Wertes (Bestrahlungszeiten für die halbmaximale photolytische Spaltung) von 60 min auf wenige Minuten reduziert werden. Bei DEACM-EDTA kann aufgrund des niedrige $t_{1/2}$-Wertes von einer ausreichend schnellen photolytische Spaltung ausgegangen werden. Stattdessen führten Komplexbildungen des intakten DEACM-EDTA, trotz Veresterung von zwei Koordinierungsstellen, zu einem Löslichkeitsproblem. Durch diesen Prozess ist vermutlich auch die mangelnde Kontrolle über die regulatorische Wirkung des DEACM-EDTA zu erklären. Bei NPip-Galaktose kann dagegen vermutet werden, dass der langsame photolytische Zerfall für das Ausbleiben der Induktion verantwortlich war. Darauf deuten einerseits die hohen Werte für die $t_{1/2}$-Bestrahlungszeiten und für die regulatorisch wirksame Konzentration hin und andererseits die Beobachtung, dass die Anwendung von zellkompatiblen Belichtungszeiten nicht zu einer Induktion der Genexpression führte.

Zieht man diese Beobachtungen in Betracht, kann ein Richtwert für den Einsatz von *caged compounds* in *S. cerevisiae* angegeben werden: Zur Anwendung in optogenetischen Systemen sollte die Freisetzung von regulatorisch wirksamen Effektorkonzentrationen unter Beachtung der Löslichkeit und photolytischen Zerfallsgeschwindigkeit (bei 365 nm, 3 mW/cm²) innerhalb von maximal ca. 30 min möglich sein. Dies deckt sich auch mit den hier vorgestellten Untersuchungen zur Phototoxizität der UVA-Bestrahlung bei *S. cerevisiae* (siehe Kapitel 2.1.3), bei denen eine deutliche Beeinträchtigung der Zellvitalität ab einer Belichtungszeit von mehr als 30 min (365 nm, 3 mW/cm²) beobachtet werden konnte.

Eine genauere Betrachtung der einzelnen Expressionssysteme und der dazugehörigen *caged compounds* erfolgt in den nachfolgenden Unterkapiteln.

Tabelle 9: Vergleich der photolytischen Zerfallsgeschwindigkeiten bei Bestrahlung mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge Angegeben sind jeweils die Bestrahlungszeiten für die halbmaximale photolytische Spaltung ($t_{1/2}$) und die Konzentrationen des jeweiligen caged compound bei der Ermittlung dieses $t_{1/2}$-Wertes sowie die regulatorisch wirksame Konzentration des nach Belichtung freigesetzten Effektors.

caged compound	**Bestrahlungszeiten für die halbmaximale photolytische Spaltung ($t_{1/2}$) [min]**					**regulatorisch wirksame Konzentration des freien Effektors [µM]**
	300 nm 1 mW/cm²	**365 nm 3 mW/cm²**	**368 nm 53 mW/cm²**	**375 nm 11 mW/cm²**	**430 nm 30 mW/cm²**	
NVOC-Methionin (caged-Met) [1750 µM]	nd	60[a]	(3,4)*	nd	nd	5 - 10
DMNP-EDTA-Cu^{2+} (caged-Cu^{2+}) [80 µM]	8,3 ± 0,7	(32)*	(1,8)*	8,7 ± 0,1	7,5 ± 0,9	0 - 50
DEACM-EDTA (*caged*-EDTA) [100 µM]	60 ± 6	(2)*	(0,1)*	0,53 ± 0,9	0,83 ± 0,07	100
NPip-Galaktose (*caged*-Gal) [5000 µM]	nd	170	(10,2)*	35	nd	1000 - 5000

** Näherungsweise berechnet aus Daten von 365 bzw. 375 nm*

[a] *Reduzierung der Bestrahlungszeit auf wenige Minuten möglich durch Einsatz von 500 µM NVOC-Met [50-fach über regulatorischem Schwellenwert (10 µM)].*

3.1 Lichtregulation mittels *caged*-Galaktose

Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit sollte ein optisches Expressionssystem auf Basis des *GAL1*-Promotors entwickelt werden. Dazu wurde der Expressionsstamm *S.c.*-ΔGAL1-*pGAL1-YFP* als Grundlage verwendet, welcher auf einem Reporterstamm der vorangegangenen Masterarbeit basiert.[119] Das *S.c.-pGAL1-YFP* Expressionssystem wies jedoch eine zu geringe Sensitivität auf, die den Einsatz von ca. 100 mM Galaktose für eine vollständige Induktion voraussetzte.[119] Zu diesem Zeitpunkt wurde vermutet, dass die photolytische Freisetzung solch hoher Konzentrationen mittels eines *caged compounds* eine intensive Belichtung mit mutmaßlich phototoxischer Wirkung erforderte. Daher wurde ein optimierter Expressionsstamm getestet, welcher eine Deletion des *GAL1*-Gens. Durch diesen Schritt wurde das Gen für eine essentielle Kinase des Galaktose-Stoffwechsels entfernt. Auf diesem Weg wurde die Metabolisierung von Galaktose in dem neu erzeugten Expressionsstamm *S. c.*-ΔGAL1-*pGAL1-YFP* unterbunden. Abbildung 62 zeigt einen Vergleich der maximalen YFP-Produktionen von beiden Stämmen bei Induktion mit unterschiedlichen Galaktose-

Konzentrationen. Es ist zu erkennen, dass die Schwellenkonzentration zur maximalen Induktion des *GAL1*-Promotors von 100 auf 5 mM Galaktose gesenkt werden konnte. Folglich konnte die zur maximalen Induktion des Expressionssystems notwendige Konzentration durch Einführung der *GAL1*-Deletion um das 20-fache erhöht werden.

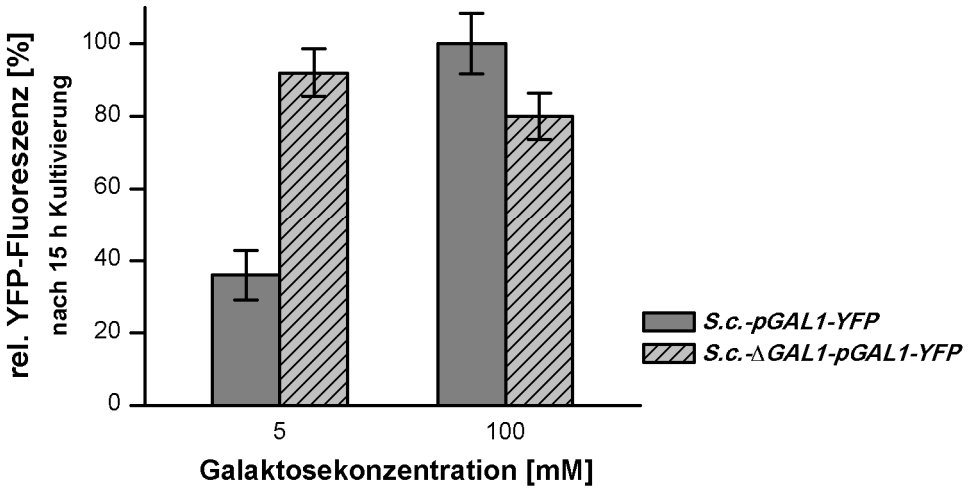


Abbildung 62: Auswirkung der Deletion des GAL1-Gens auf die konzentrationsabhängige Induktion der pGAL1-kontrollierten Genexpression. YFP-Produktion nach 15 h Kultivierung mit unterschiedlichen Galaktose Konzentrationen. Kultivierung in galaktosehaltigem [2 % (w/v), 111 mM] SC-Medium, BioLector Setup, 30 °C.

Die optische Regulation der Genexpression sollte durch den Einsatz einer *caged*-Galaktose Verbindung vermittelt werden. Dazu wurde NPip-Gal (**35**; 6-Nitropiperonyl-*β-D*-galactopyranosid; s. Tabelle 8) eingesetzt, welches von Dr. Claus Bier im Rahmen einer Kooperation synthetisiert und zur Verfügung gestellt wurde.[110] Die Charakterisierung der photolytischen Spaltung von NPip-Galaktose (5 mM) zeigte, dass eine Bestrahlungszeit ($t_{1/2}$) von ca. 180 min notwendig war, um eine halbmaximale photolytische Spaltung zur erreichen (λ_{max} = 365 nm, F_0 = 3 mW/cm^2, siehe Tabelle 9). Diese lange Belichtungsdauer war zum einen ungeeignet, eine zeitlich definierte Induktion zu gewährleisten, und führte zum anderen durch phototoxische Effekte zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Zellvitalität. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Erhöhung der NPip-Galaktosekonzentration in Betracht gezogen, um eine größere Menge Galaktose bei der gleichen Belichtungszeit freizusetzten. Dies war aufgrund der schlechten Löslichkeit von NPip-Galaktose jedoch nicht möglich, da bereits die Konzentration von 5 mM NPip-Galaktose nur unter Verwendung der maximal einsetzbaren Kosolvent-Konzentration von 2 % DMSO erzielt werden konnte.

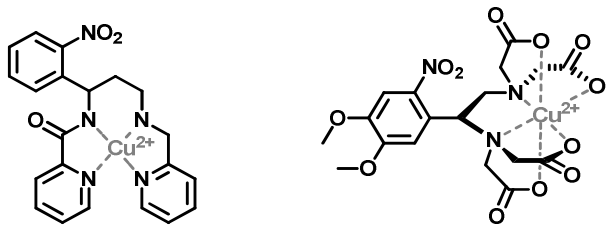
Somit steht eine erfolgreiche optische Regulation des *pGAL1*-Expressionssystems, trotz der Fortschritte bei der Senkung der Schwellenkonzentration zur maximalen Induktion, noch

aus. Aussichtsreiche Ansätze, wie eine weitere Verbesserung des *pGAL1*-Expressionssystems zur Senkung der Galaktose-Sensitivität oder eine Beschleunigung der photolytischen Galaktosefreisetzung durch Optimierung der *caged*-Galaktose Verbindung, stehen für eine Weiterentwicklung noch zur Verfügung.

3.2 Lichtregulation mittels *caged*-Cu^{2+}

Im folgenden Teilprojekt wurde die Anwendung eines alternativen Promotors betrachtet, um die lichtregulierte Genexpression mittels *caged compounds* zu etablieren. Dabei sollte die Problematik einer zu geringen Promotorsensitivität vermieden werden, nachdem dies als eines der Hauptprobleme beim *pGAL1*-Expressionssystem identifiziert wurde. Aus diesem Grund wurde der *CUP1*-Promotor ausgewählt. Dieser lässt sich durch Cu^{2+}-Ionen mit Konzentrationen im mikromolaren Bereich (50 - 100 µM) regulieren.[132] Damit sollte dieser ca. 100 bis 1000-mal sensitiver sein, als der *GAL1*-Promotor, welcher auf Galaktose-Konzentrationen im millimolaren Bereich (5 - 100 mM) (s. Abbildung 13, Kapitel 2.1.2) anspricht.

Im ersten Schritt wurde ein neuer Expressionsstamm, *S.c.-pCUP1-YFP*, analog zum Stamm *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* durch Austauschen des Promotors im Expressionsplasmid erstellt und anschließend charakterisiert. Die optische Regulation des Expressionssystems sollte erneut durch die Verwendung eines *caged compounds* realisiert werden. Dazu wurden zwei unterschiedliche Verbindungen als mögliche *caged*-Cu^{2+} Verbindungen getestet, welche in Abbildung 63 dargestellt sind.



42 **3Gcage-Cu^{2+}** **39** **DMNP-EDTA-Cu^{2+}**

*Abbildung 63: Getestete caged-Cu^{2+} Verbindungen.[78,165] DMNP-EDTA-Cu^{2+} (**32**) konnte erfolgreich zur optischen Regulation des CUP1-Promotors eingesetzt werden, 3G-caged-Cu^{2+} (**29**) dagegen nicht.*

Beide Verbindungen unterscheiden sich von „klassischen“ *caged compounds*, da der Effektor (Cu^{2+}) nicht über eine kovalente Bindung mit einer photolabilen Schutzgruppe verknüpft wird. Stattdessen erfolgt die Maskierung über die Koordination innerhalb eines photolabilen Chelatormoleküls, welches an einer zentralen Position innerhalb der Grundstruktur mit einer photosensitiven Schutzgruppe versehen ist. Letzteres führt bei Bestrahlung nicht zur üblichen Abspaltung der photosensitiven Schutzgruppe, sondern zur Spaltung des gesamten Chelators in zwei Teilmoleküle, wodurch die Cu^{2+}-Ionen freigesetzt werden. Das *caged compound* 3G*cage*-Cu^{2+} (**42**) wurde zunächst nach einer modifizierten Methode von Kumbhar *et al.*[166] in drei Schritten mit einer Gesamtausbeute von 36 % synthetisiert. Die anschießende Anwendung zeigte jedoch, dass die Verbindung keine ausreichende Maskierung der Cu^{2+}-Ionen bewirkte, wodurch eine Induktion der Genexpression bereits ohne Belichtung erfolgte (vgl. Abbildung 33, Kapitel 2.2.6). Zusätzlich wurde das kommerziell erhältliche DMNP-EDTA als Alternative getestet, welches in Kombination mit Cu^{2+}-Ionen den Komplex DMNP-EDTA-Cu^{2+} (**39**) bildet. Der photosensitive Chelator in Kombination mit Ca^{2+}-Ionen wurde in Form von DMNP-EDTA-Ca^{2+} bereits vielfach zur Stimulierung von Nervenzellen in der neuronalen Forschung eingesetzt.[81] Im Rahmen dieser Arbeit wurde DMNP-EDTA jedoch erstmals in Verbindung mit Cu^{2+}-Ionen charakterisiert. Dabei konnte eine Photolysekinetik (365 nm, F_0 = 3 mW/cm^2, siehe Tabelle 9) mit einer Bestrahlungszeit von ca. 30 min für die halbmaximale photolytische Spaltung ($t_{1/2}$) beobachtet werden.

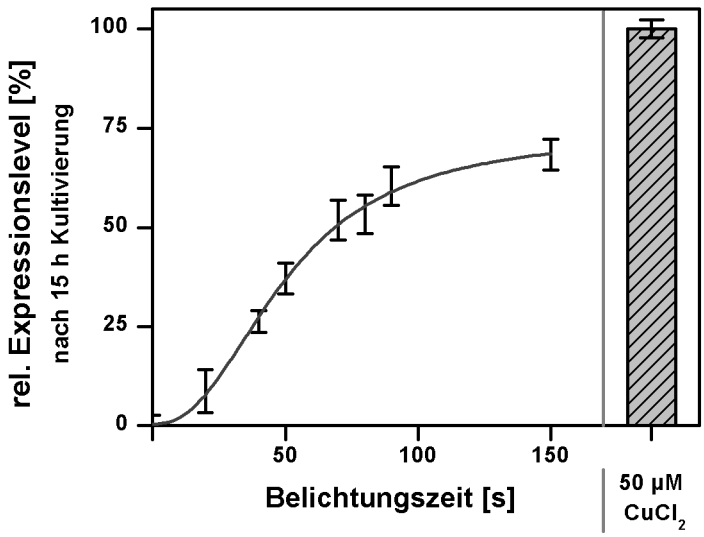


Abbildung 64: Maximale YFP-Produktion (erreicht nach 15 h Kultivierung) bei optischer Regulation des S.c.-pCUP1-YFP Expressionsstammes mittels DMNP-EDTA-Cu^{2+}. Optische Induktion zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (ca. 5 h) mit variierender Belichtungsdauer (F_0= 53 mW/cm^2, λ_{max} = 368 nm) und anschließender Weiterkultivierung bis zur stationären Wachstumsphase. Zu Vergleichszwecken wurden alle Werte auf das maximal mittels $CuCl_2$-Zugabe (50 µM) erreichbare Expressionslevel normiert. SC-Medium, BioLector Setup*. 30 °C.*

Anschließend wurde DMNP-EDTA-Cu^{2+} in Kombination mit dem Expressionstamm *S. c.-pCUP1-YFP* getestet. Dabei konnte die optische Induktion des *pCUP1*-kontrollierten YFP-Gens erfolgreich demonstriert werden (siehe Abbildung 64).

Hierzu wurden Belichtungszeiten von 20 bis 150 s (λ_{max} = 368 nm, F_0 = 53 mW/cm) eingesetzt. Die Belichtung zeigte, ebenso wie die verwendeten Konzentrationen an freien Cu^{2+}-Ionen, keinen negativen Einfluss auf die Vitalität des Expressionsstamms (vgl. Abbildung 25, Kapitel 2.2.4,). Im Vergleich zur manuellen Cu^{2+}-Ionen-Zugabe konnten mittels Belichtung allerdings nur 70 % der maximalen Expressionsstärke erreicht werden. Ursächlich dafür könnten Photoprodukte des DMNP-EDTA, wie z.B. Iminodiessigsäure (IDA), sein, welche bei der Photolyse von DMNP-EDTA-Cu^{2+} (**39**) entstehen (siehe Abbildung 22, Kapitel 2.2.3). Diese verfügen weiter über jeweils drei potentielle Koordinationsstellen für Cu^{2+}-Ionen und könnten für eine partielle Verringerung der Cu^{2+}-Ionen-Verfügbarkeit verantwortlich sein. Hinweise darauf gaben Affinitätsuntersuchungen, bei denen Iminodiessigsäure (IDA) eine deutliche Komplexbildung mit Cu^{2+}-Ionen aufzeigte (Abbildung 27, Kapitel 2.2.4).

Im Anschluss daran wurde eine automatisierte Charakterisierung des Induktionszeitpunktes im eigens dafür entwickelten Photo-BioLector[105,131,173] von Dr. Georg Wandrey durchgeführt, um die Übertragbarkeit der optischen Genregulation auf Hochdurchsatz-*Screenings* zu demonstrieren. Dadurch konnte eine Steigerung der maximalen Produktion

um 8 %, im Vergleich zur Induktion ab Beginn der Kultivierung (0 h) bzw. um 6 % im Vergleich zum bisher verwendeten Standard-Belichtungszeitpunkt (5 h), erzielt werden.

Das erfolgreiche Übertragen der optischen Genregulation mittels *caged compounds* auf ein automatisiertes *Screening* ermöglichte die schnelle Charakterisierung des Induktionszeitpunktes. Im Vergleich zu klassischen *Screening*-Methoden, welche Pipettierroboter einsetzen, konnte der mechanische Aufwand deutlich reduziert und die Unterbrechung der Kultivierung sowie die Penetration der Sterilbarriere vermieden werden. Mit dem beschriebenen *S.c.-pCUP1-YFP* Expressionssystem könnten anstelle von YFP ebenfalls andere Proteine produziert werden. Somit könnte die optische Induktion *via caged*-Cu^{2+} genutzt werden, um die Produktion von alternativen Proteinen schnell und detailliert zu charakterisieren.

3.3 Lichtregulation mittels *caged*-EDTA

Nachdem die optogenetische Induktion des *pCUP1*-Systems gezeigt wurde, sollte der parallele Einsatz eines zweiten *caged compound* zur optischen Repression des *CUP1*-Promotors getestet werden. Dabei sollte die Induktion und die Repression durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen „Lichtfarben“ selektiv reguliert werden. Die dazu entwickelte Strategie ist in Abbildung 65 verdeutlicht. Sie beruht darauf, dass die Genexpression von p*CUP1*-regulierten Genen durch die Zugabe von EDTA reprimiert werden kann, da die Cu^{2+}-Ionen durch Komplexierung entzogen werden. Die selektive Regulation sollte durch die Verwendung von zwei antagonistischen *caged compounds* realisiert werden: Dem bereits etablierten *caged*-Cu^{2+} (DMNP-EDTA-Cu^{2+}) das Cu^{2+}-Ionen bei Bestrahlung mit UVA-Licht zunächst freisetzt, und einem *caged*-EDTA, das bei Blaulicht-Bestrahlung den Chelator EDTA freisetzen soll, wodurch die Cu^{2+}-Ionen wieder komplexiert werden.

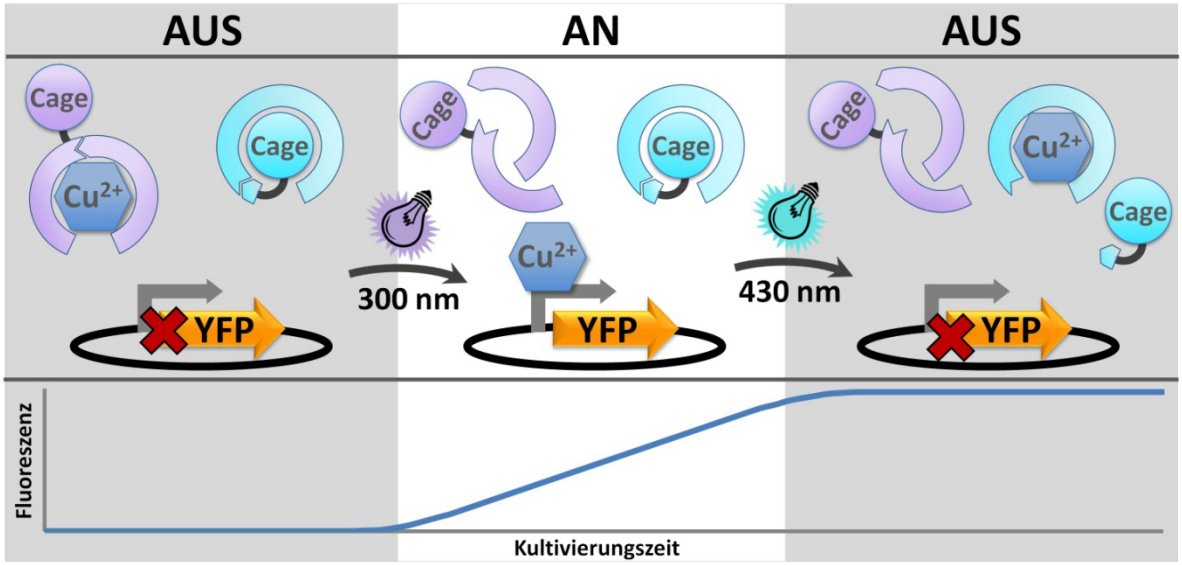


Abbildung 65: Vereinfachte schematische Darstellung der reversiblen Regulation des pCUP1-Expressionssystems mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen. Die Bestrahlung mit ca. 300 nm sollte zur selektiven Spaltung des caged-Cu^{2+} und damit zur Freisetzung von Cu^{2+}-Ionen, welche die Induktion des CUP1-Promotors vermitteln, führen. Die anschließende Bestrahlung mit ca. 430 nm sollte die Schutzgruppe vom caged-EDTA abspalten, wodurch ein Cu^{2+}-Chelator freigesetzt würde. Dieser würde die die Cu^{2+}-Ionen komplexieren und die Genexpression damit wieder ausschalten würde.

Im ersten Schritt wurde die reversible Regulation durch den Einsatz von Cu^{2+}-Ionen und EDTA untersucht. Dabei wurde eine Kultur von *S.c.-pCUP1-YFP* zunächst mit $CuCl_2$ induziert und anschließend mit EDTA behandelt. Dabei bewirkte der freie Chelator eine rasche Stagnation der Genexpression (Abbildung 35, A, Kapitel 2.3.1). Somit konnte gezeigt werden, dass eine reversible Deaktivierung des *CUP1*-Promotors mittels freiem EDTA möglich ist.

Die optische Regulation sollte durch die beiden in Abbildung 66, A dargestellten *caged compounds* DEACM-EDTA und DMNP-EDTA-Cu^{2+} realisiert werden. Der erfolgreiche Einsatz von DMNP-EDTA-Cu^{2+} zur optischen Freisetzung von Cu^{2+}-Ionen wurde bereits in vorherigen Kapiteln (vgl. Kapitel 3.2 bzw. 2.2.4) gezeigt. Ergänzend dazu erfolgte die Synthese von DEACM-EDTA zur lichtregulierten Freisetzung von EDTA. Die Synthese verlief durch basische Veresterung von EDTA-Anhydrid mit 7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-cumarin (DEACM-OH) mit einer Ausbeute von in 76 % (s. Kapitel 2.3.2 und 5.6.4).

Die Ergebnisse der photolytischen Untersuchungen sind in Abbildung 66, B dargestellt. Sie zeigen einen zügige Photolyse des DEACM-EDTA bei 430 nm (F_0= 30 mW/cm^2, $t_{1/2}$= 0,83 min) und einen stark verlangsamte Photolyse bei 300 nm (F_0= 1 mW/cm^2, $t_{1/2}$= 60 min). DMNP-EDTA-Cu^{2+} zerfällt dagegen bei einer Bestrahlungswellenlänge von 430 nm (F_0= 1 mW/cm^2, $t_{1/2}$= 7,5 min) ca. 9-mal schneller und bei 300 nm (F_0= 30 mW/cm^2, $t_{1/2}$= 8,3 min) ca. 7-mal langsamer.

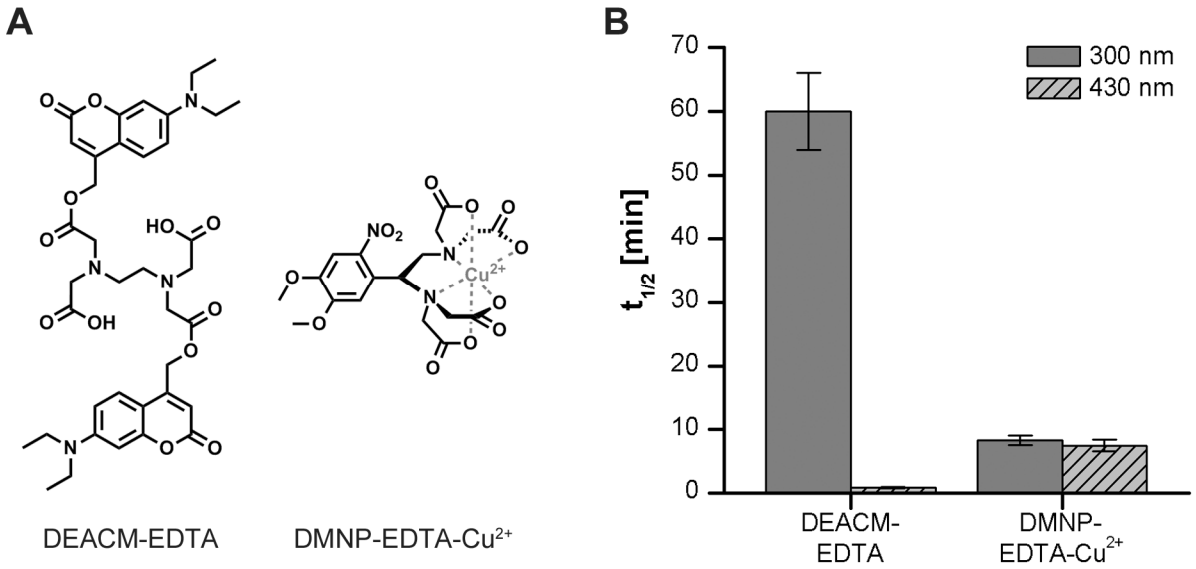


Abbildung 66: Selektive Photolyse von DEACM-EDTA (caged-EDTA) und DMNP-EDTA (caged-Cu^{2+}) mittels unterschiedlicher Belichtungswellenlängen (300 bzw. 430 nm). (A) Chemische Struktur der eingesetzten caged compounds. (B) Vergleich der Bestrahlungszeiten für die halbmaximale photolytische Spaltung ($t_{1/2}$) bei verschiedenen Belichtungen: λ_{max} = 300 nm, F_0= 1 mW/cm^2 bzw. λ_{max} = 430 nm, F_0= 30 mW/cm^2. 100 µM DEACM-EDTA bzw. 80 µM DMNP-EDTA + 100 µM $CuCl_2$, alle in gepuffertem Wasser (MOPS, 10 mM, pH 7). Standardabweichungen ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen.

In einem Gemisch aus DMNP-EDTA-Cu^{2+} und DEACM-EDTA sollte es daher möglich sein, zuerst Cu^{2+}-Ionen durch eine Belichtung mit 300 nm freizusetzen und anschließend mittels einer Bestrahlungswellenlänge von 430 nm über die Freisetzung von EDTA wieder zu komplexieren.

Die anschließende Charakterisierung der optischen Repression des *S.c.-pCUP1-YFP Stammes* mittels DEACM-EDTA konnte jedoch nicht durchgeführt werden. Grund dafür war eine stark verminderte Induktion des *pCUP1*-kontrollierten YFP-Gens bei $CuCl_2$ Zugabe, welche in Anwesenheit von DEACM-EDTA auftrat. Daraufhin wurden Untersuchungen zur Löslichkeit vorgenommen, welche die Bildung eines Niederschlages bei Kombination von DEACM-EDTA mit Cu^{2+}-, Mg^{2+}- oder Ca^{2+}-Ionen aufzeigten. Dies deutet darauf hin, dass es nach der $CuCl_2$ Zugabe vermutlich zu einer Komplexierung der Cu^{2+}-Ionen durch das intakte DEACM-EDTA kam, wodurch die Induktion der *pCUP1*-kontrollierten Gene verhindert wurde. Somit war die Schutzgruppenstrategie der DEACM-Veresterung vermutlich nicht erfolgreich war, da die Affinität des DEACM-EDTA zu zweiwertigen Kationen und insbesondere zu Cu^{2+}-Ionen nicht ausreichend vermindert werden konnte.

Eine reversible optische Regulation der *pCUP1*-kontrollierten Gene mittels unterschiedlicher „Lichtfarben“ konnte bis dato daher noch nicht realisiert werden. Entscheidende Voraussetzungen, wie die reversible Deaktivierung des *CUP1*-Promotors

mittels EDTA und die optische Kompatibilität der DMNP- und DEACM-Schutzgruppen zur reversiblen Effektorfreisetzung, konnten jedoch demonstriert werden. Somit erscheint eine Weiterentwicklung der beschriebenen Strategie durchaus aussichtsreich. Weiterführende Arbeiten sollten sich daher auf die Optimierung der *caging*-Strategie von DEACM-EDTA oder der Entwicklung eines alternativen DEACM-geschützten Cu^{2+}-Chelators konzentrieren, um eine effiziente Maskierung der Cu^{2+}-Ionen Affinität zu erzielen.

3.4 Lichtregulation mittels c*aged*-Met

Im letzten Teilprojekt lag der Fokus auf der Etablierung einer lichtregulierten Repression der Genexpression. Dadurch sollte das Portfolio der optogenetischen Werkzeuge erweitert werden, nachdem die optische Induktion bereits mittels *caged*-Cu^{2+} demonstriert werden konnte. Die genetische Grundlage für die Repression wurde durch den reprimierbaren *MET17*-Promotor geschaffen. Dieser ist in methioninfreiem Medium aktiv und kann durch die Zugabe von Methionin rasch reprimiert werden. Eine Besonderheit dieses Systems ist, dass Methionin als Repressor-Molekül anschließend intrazellulär abgebaut wird. Dadurch kommt es zum Absinken der Methioninkonzentration, bis der Promotor bei Unterschreiten einer Schwellenkonzentration wieder reaktiviert wird. Die Expression der nachgeschalteten Gene wird somit reversibel reguliert.

Zur Beginn der Arbeiten wurde ein geeigneter Reporterstamm durch Austauschen des *GAL1*-Promotor gegen einen *MET17*-Promotor im Expressionsplasmid erstellt. Die anschließende Charakterisierung des neuen Reporterstammes *S.c.-pMET17-YFP* wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Christopher Probst mittels mikrofluidischer Experimente durchgeführt. Diese zeichnen sich durch die Kultivierung in mikroskopischen Kammern aus, die stetig mit frischem Medium versorgt werden. Dadurch befinden sich die Zellen permanent in einem Medium mit konstanter Zusammensetzung, wodurch die Methioninkonzentration trotz zellulärem Abbau konstant gehalten werden kann. Aufgrund dieser experimentellen Bedingungen konnte der Schwellenwert für die Repression des *MET17*-Promotors auf 10 µM Methionin bestimmt werden. Zudem ermöglichte das mikrofluidische Kultivierungssystem ein schnelles Wechseln zwischen methioninhaltigem und methioninfreiem Medium. Dadurch konnte demonstriert werden, dass die Genexpression des *pMET17*-kontrollierten YFP-Gens durch wechselnde Methioninkonzentration mehrfach ein- und ausgeschaltet werden kann.

Die optische Repression der Genexpression sollte durch eine *caged*-Methionin Verbindung erreicht werden. Dazu wurde NVOC-Methionin ((*S*)-*N*-(4,5-Dimethyl-2-nitrobenzyl-oxycarbonyl)-methionin) nach einer modifizierten Methode von Chen *et al.*[184] mittels 6-Nitroveratryloxycarbonylchlorid (NVOC-Cl) und Methionin in einer Ausbeute von 65 % synthetisiert (s. Abbildung 50, Kapitel 2.4.3). Dies ermöglichte einen schnellen und synthetisch einfachen Zugang zu NVOC-Methionin.

Die Charakterisierung der Photolyse (λ_{max} = 365 nm, F_0= 3 mW/cm) ergab einen im Vergleich zu *caged*-Cu^{2+} relativ langsamen Zerfall mit einer Belichtungszeit von ca. 60 min für die halbmaximale photolytische Spaltung ($t_{1/2}$). Aufgrund der hohen Sensitivität des *MET17*-Promotors (10 µM) konnte eine zügige Freisetzung von regulatorisch wirksamen Effekotorkonzentrationen aber innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten UVA-Bestrahlung sichergestellt werden.

Anschließend wurde die optische Regulation der Genexpression mittels NVOC-Methionin in Kooperation durch Dr. Georg Wandrey per PhotoBioLector charakterisiert. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 67 zusammengefasst. Dabei wurde der Reporterstamm *S.c.-pMET17-YFP* in Gegenwart von NVOC-Met (500 µM) in methioninfreiem SC-Medium kultiviert. Die Abwesenheit von Methionin führte von Beginn an zu einer Aktivierung der Genexpression. Darauf wurde die optische Repression unter Verwendung von Belichtungszeiten von 10 s bis 10 min untersucht. Dies führte nach ca. 20 min zu einer Unterbrechung der YFP-Zunahme, was auf ein Aussetzen der *YFP*-Genexpression zurückzuführen ist. Nach einer gewissen Zeitspanne, wahrscheinlich nach Verbrauch des freigesetzten Methionins, kam zu einem erneuten Anstieg des YFP-Fluoreszenzsignals und folglich zu einer Reaktivierung der Genexpression. Die Dauer der Repression war dabei von der eingesetzten Belichtungszeit und der Zelldichte bzw. der Kultivierungsdauer abhängig. Sie ergab unter den angegebenen Bedingungen eine Korrelation, bei der 1 s UVA-Belichtung äquivalent zur manuellen Zugabe von 1 µM Methionin war. Somit konnte eine Repression von 20 min bis maximal 12 Stunden, also die gesamte Wachstumsphase der Kultivierung, erzielt werden. Die optische Repression mittels NVOC-Methionin ermöglichte also, wie in Abbildung 67, C veranschaulicht, einen gezielten Expressions-Stopp des *pMET17*-kontrollierten YFP-Gens.

Anschließend konnte, wie Abbildung 67, B verdeutlicht, eine Aneinanderreihung von mehreren Repressions- und Produktionsphasen ermöglicht werden. Dazu wurde nach jeder

Produktionsphase eine kurze Belichtung (Dauer an die Zelldichte angepasst) durchgeführt, um die Expression für jeweils ca. 1,5 h zu unterbrechen. Dadurch konnte zusätzlich ein Pausieren der Genexpression durch optische Repression mittels NVOC-Methionin demonstriert werden.

Die Kultivierung in methioninfreiem Medium führte bereits zu Beginn der Kultivierung zu einer nichtregulierten Aktivierung der Genexpression. Die Regulation des Expressionsstarts kann jedoch ein wichtiger Faktor bei der homo- bzw. heterologen Expression von Proteinen sein. Die verstärkte Produktion von Proteinen oder Metaboliten kann zu einer starken Belastung des Expressionswirts führen, da zum einen zelluläre Ressourcen beansprucht werden und zum anderen Toxizitätseffekte auftreten können.[187,188] Aufgrund dessen wird die Kultivierung von Expressionswirten häufig in eine Wachstumsphase ohne Expression und eine anschließende Produktionsphase eingeteilt. Daher wurde die optische Repression außerdem genutzt, um die Expression der *pMET17*-kontrollierten *YFP*-Gens zu Beginn der Kultivierung zu unterdrücken. Wie in Abbildung 67, A veranschaulicht, wurden dazu kurze Belichtungspulse in halbstündigen Abständen verwendet.

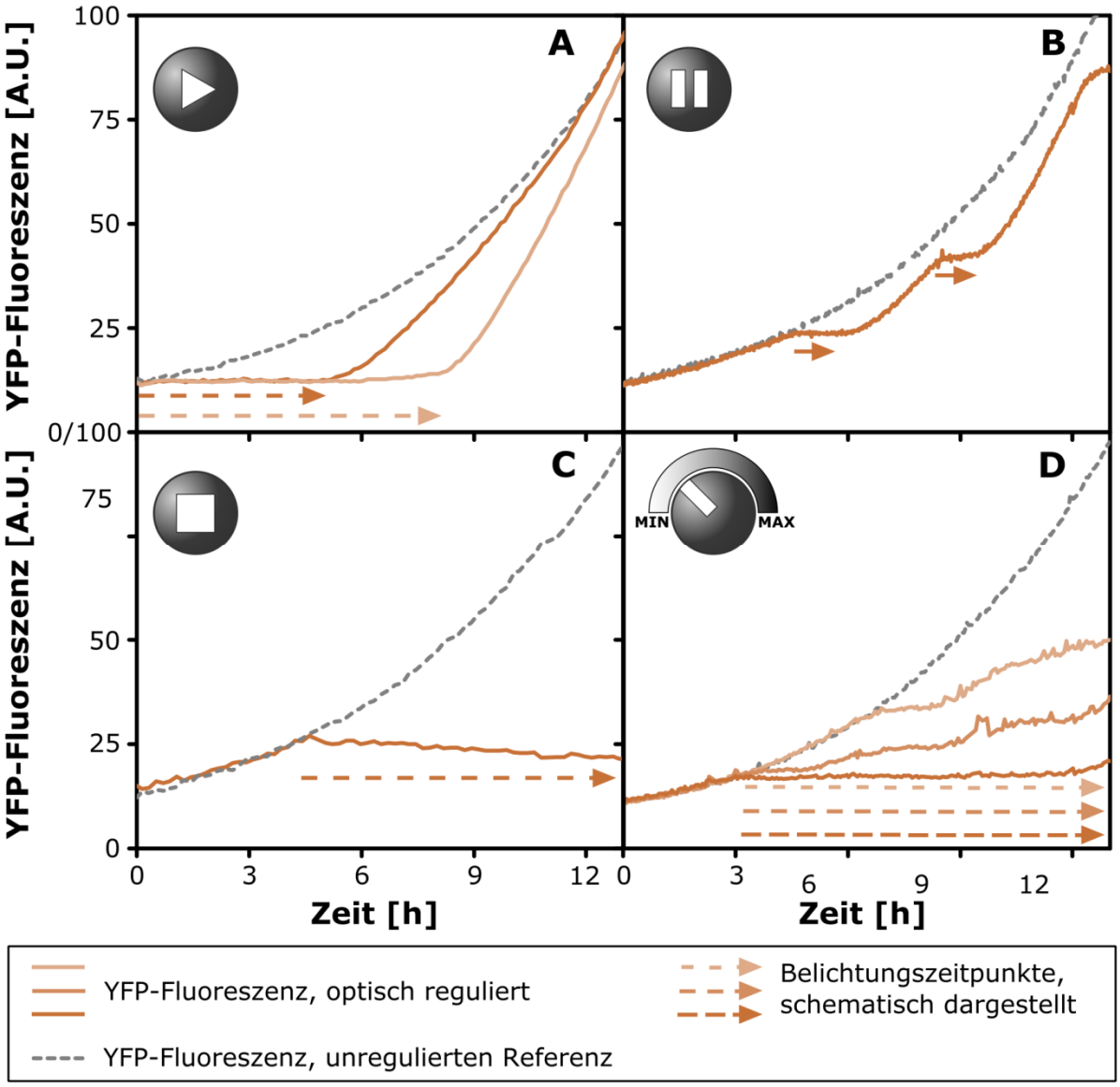


Abbildung 67: Optische Regulation von A) Expressions-Start, C) -Stopp, B) -Pause, und D) –Rate. Diese wurde durchgeführt bei einem pMET17-kontrollierten YFP-Gens unter Anwendung von NVOC-Methionin und selektiver Belichtung. Die Regulation aller Expressionsparameter wurde unter Anwendung eines einzigen caged compounds durch das Zusammenspiel von optischer Freisetzung und anschließender intrazellulärer Metabolisierung von Methionin ermöglicht. Die gestrichelten Pfeile repräsentieren die Belichtungszeitpunkte und -dauern in schematischer Weise. Reporterstamm S.c.-pMET17-YFP, methioninfreies SC-Medium, BioLector Setup, 30 °C, 500 mM NVOC-Methionin; λ_{max} = 368 nm, F_0 = 53 mW/cm.

Die Dauer der Belichtungspulse wurde in Abhängigkeit von der Zelldichte bzw. Kultivierungsdauer so gewählt, dass die YFP-Expression jeweils nur ca. eine halbe Stunde reprimiert wurde. Dadurch konnte zum einen eine konstante Repression vom Beginn der Kultivierung an erzeugt werden. Zum anderen konnte die Genexpression durch Auslassen der Belichtung innerhalb von einer halben Stunde gezielt aktiviert werden. Die optische Repression mittels NVOC-Methionin konnte somit genutzt werden, um den Expressionsstart des *pMET17*-kontrollierten *YFP*-Gens zu regulieren.

Als letzter Parameter sollte die Expressionsrate, also die konstante Zunahme der Proteinkonzentration, gesteuert werden. Dieser Parameter ist besonders interessant, da die Anpassung der Expressionsrate bei hetero- bzw. homologen Genexpressionen von Vorteil sein kann. Beispielsweise um Limitationen bei der mikrobiellen Produktion von Proteinen und Chemikalien durch Akkumulation von Proteinen oder Anreicherung von toxischen Intermediaten zu vermeiden. Bei der Expressionsrate handelt es sich um einen dynamischen Parameter, welcher eine dauerhafte Überwachung der Genexpression und eine hochfrequente Regulation erfordert. Daher wurde eine EDV-basierte, automatische Steuerung der Belichtung entwickelt. Diese beinhaltete einen geschlossenen Regelkreis, welcher die aktuelle YFP-Fluoreszenzzunahme permanent mit einem vorgegebenen Wert verglich. Bei Überschreitung dieses Wertes reagierte der Regelkreis mit einer zeitweisen Belichtung, die zur kurzzeitigen Repression und damit zum Abflachen der YFP-Produktion führte. Abbildung 67, D zeigt, dass die automatisierte Belichtungsregulation so zur Drosselung der Expressionsrate auf den vorgegebenen Wert führte. Die optische Repression mittels NVOC-Methionin konnte somit auch zur Regulation der Expressionsrate erfolgreich eingesetzt werden. Dabei stellt die letzte Anwendung die Vorteile der lichtregulierten Genregulation besonders anschaulich dar.

Im Gegensatz zu einer wiederholten mechanischen Zugabe des Effektors zur Induktionsregulation vermeidet die optische Schaltung ein Unterbrechen der Durchmischung sowie eine mechanische Einwirkung auf den Kultivierungsraum. Dadurch wird eine permanente Sterilität, ein konstanter Gastransfer und eine Reduzierung der Verdunstung und Verdünnung bei gleichzeitig hoher Regulationsfrequenz erreicht. Zusätzlich ergab sich eine gute Dosierbarkeit des Effektors NVOC-Met und eine Reduktion des mechanischen Aufwandes im Vergleich zu Pipettierrobotern.

4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte die erfolgreiche Anwendung von zwei *caged compounds* zur Regulation der Genexpression beschrieben werden. Die photolytische Freisetzung von Methionin mittels NVOC-Methionin sowie die photolytische Freisetzung von Cu^{2+}-Ionen mittels DMNP-EDTA wurden etabliert. Die dadurch zugänglich gemachten Effektoren Methionin und Cu^{2+} sind jedoch nicht auf die Anwendung in *S. cerevisiae* beschränkt. Vielmehr handelt es sich hierbei um omnipräsente Stoffe, deren Handhabung in den meisten Organismen eine genetische Regulation voraussetzt. Beispielsweise finden sich auch Promotorsysteme in *E. coli,* die durch Cu^{2+}-Ionen induziert werden, sowie Promotorsysteme in *C. glutamicum,* die durch Methionin induziert werden.[190,191] Eine Anwendung von NVOC-Methionin und DMNP-EDTA-Cu^{2+} in anderen biotechnologisch relevanten Hefesystemen (*P. pastoris*, *H. polymorpha, etc.*) und Prokaryonten (*E. coli*, *C. glutamicum*, *B. subtilis*, etc.) wäre daher denkbar, um so die lichtregulierte Genexpression auch auf andere Organismen und Promotorsysteme zu übertragen.

caged-Galaktose

Die Arbeiten zur *caged*-Galaktose konnten drei Faktoren aufzeigen, die eine Umsetzung der lichtregulierten Genexpression bisher noch verhinderten. Die Kombination aus i) geringer *GAL1*-Promotorsensitivität, ii) langsamer NPip-Galaktose-Photolyse und schlechter NPip-Galaktose-Löslichkeit erforderte toxische Strahlungsmengen, um regulatorisch wirksame Mengen Galaktose freizusetzen. Die schlechte Sensitivität des *GAL1*-Promotors erforderte mit ca. 100 mM Galaktose eine deutlich höher Effektorkonzentration als bei den erfolgreich angewendeten Promotoren *pCUP1* (50 µM) und *pMET17* (10 µM). Die Verwendung eines optimierten *S. cerevisiae* Stammes, bei dem eine Deletion des *GAL1*-Gens vorlag, ergab bereits eine Erhöhung der Sensitivität um den Faktor 20 von 100 auf 5 mM. Diese Erhöhung war jedoch nicht ausreichend, zeigt aber auf, dass eine weitere Optimierung der Promotorsensitivität denkbar ist. Diese könnte beispielsweise durch die Überexpression der Gene der Regulatoren Gal1p und Gal4p erreicht werden, oder über die Erhöhung der Galaktose Aufnahme durch Überexpression des Gens der Galaktose-Permease Gal2p.[192]

Ein zusätzlicher Ansatz wäre eine Modifikation der bisher verwendeten *caged*-Galaktose Verbindung (NPip-Gal, **36**), wie in Abbildung 68 dargestellt. Dabei könnte z.B. eine Beschleunigung der Photolyse durch den Einsatz von alternativen photolabilen Schutzgruppen erzielt werden. Denkbar wäre beispielsweise der Einsatz von DEACM [7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)coumarin)] zur Synthese von Verbindung **67**. Die Anwendung der DEACM-Schutzgruppe könnte dabei von Vorteil sein, da sich diese Gruppe im Teilprojekt caged-Cu^{2+} in Kombination mit EDTA als besonders photolabil mit einem $t_{1/2}$-Wert (375 nm, 11 mW/cm^2) von ca. 0,5 min (vgl. Tabelle 7, Kapitel 2.3.2) herausgestellt hat. Zudem konnte diese photolabile Schutzgruppe auch bei Wellenlängen von ca. 430 nm in kurzer Zeit abgespalten werden. Somit könnte die Bestrahlungsdauer ohne das Auftreten von Toxizitätseffekten weiter erhöht werden, sollte sich die Photolabilität der *caged*-Galaktose durch den Einsatz von DEACM wider Erwarten nicht erhöhen. Außerdem könnte die Verwendung einer DEACM-geschützten Galaktose (**67**) die Kombination mit anderen *caged compounds,* wie z.B. NVOC-Methionin und DMNP-EDTA-Cu^{2+} nach dem Prinzip der Zwei-Wellenlängen-Regulation (vgl. Kapitel 2.3), ermöglichen.

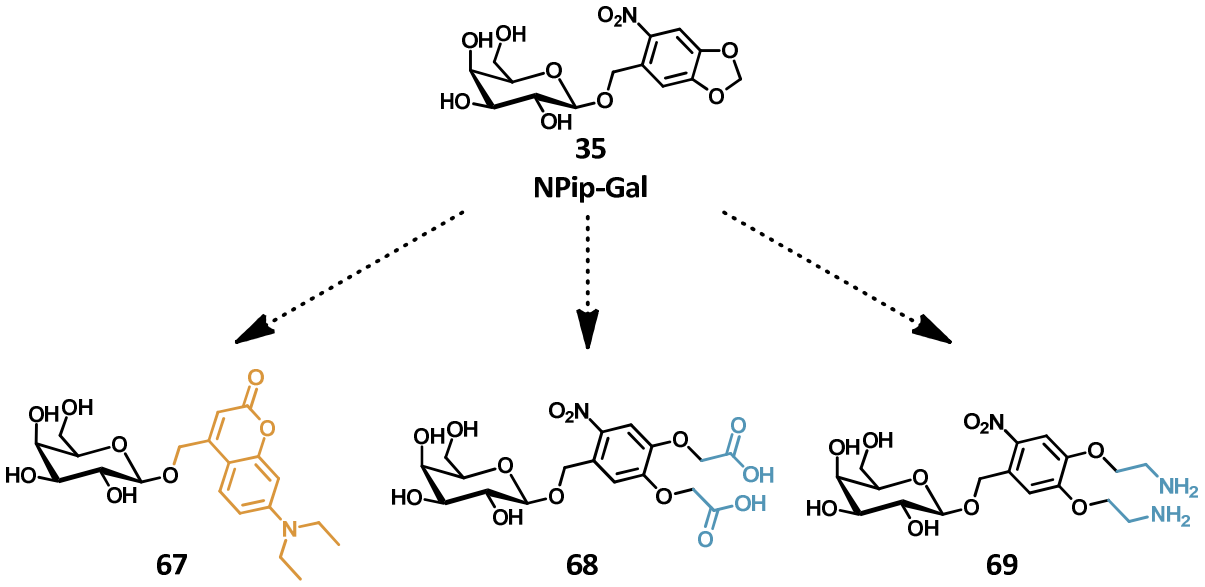


*Abbildung 68: Mögliche alternative caged-Galaktose Verbindungen. DEACM-Galaktose (DEACM in orange, **57**) zur Beschleunigung der Photolyse, DMNP-Galaktose Derivate (**58**) und (**59**) mit Löslichkeitstags (blau) zur Erhöhung der Löslichkeit.*

Alternativ zu Einsatz der DEACM Schutzgruppe könnte die DMNP-Schutzgruppe auch mit polaren Gruppen ergänzt werden, um die Löslichkeit der *caged*-Galaktose Verbindung zu erhöhen. Abbildung 68 zeigt dafür zwei Beispiele, bei denen Carboxyl- (**68**) bzw. Amino-Gruppen (**69**) hinzugefügt wurden. Die Verwendung von Aminogruppen könnte in diesem

Fall einen größeren Effekt haben, da das Kulturmedium (SC-Medium) der Hefekulturen einen leicht sauren pH-Wert von 5 - 6 aufweist. Die Erhöhung der Löslichkeit von *caged*-Galaktose könnte dann genutzt werden, um im Medium eine *caged*-Galaktose-Konzentration deutlich über dem regulatorischen Schwellenwert einzusetzen. Letzteres wurde bereits bei NVOC-Methionin (vgl. Kapitel 2.4.5) eingesetzt und ermöglichte die Reduktion der Belichtungszeit, da nur ein geringer Anteil des eingesetzten *caged-compound*s freigesetzt werden musste.

Eine reversible optische Regulation des *GAL1*-Promotors könnte bei weiterführenden Arbeiten ebenfalls angestrebt werden. Als Basis dafür könnte die sogenannte Katabolitrepression genutzt werden. Dieser Mechanismus beschreibt die Repression von Saccharid-abhängigen Promotoren in Gegenwart von Glukose.[117,118] Im ersten Schritt müsste die optische Induktion mittels *caged*-Galaktose etabliert werden. Anschließend könnte dann eine *caged*-Glukose Verbindung genutzt werden, um die zuvor induzierte Genexpression aufgrund der Katabolitrepression reversibel wieder auszuschalten. Dabei wäre der Einsatz von optisch kompatiblen Photoschutzgruppen von Vorteil, um eine unabhängige optische Regulation nach dem Prinzip der Zwei-Wellenlängen-Regulation (vgl. Kapitel 2.3) realisieren zu können. Erste Anwendungen einer *caged*-Galaktose in *E. coli* wurden in der Arbeitsgruppe dieser Dissertation bereits veröffentlicht und konnten die prinzipielle Anwendbarkeit solcher Verbindungen aufzeigen.[110]

caged-EDTA

Eine reversible optische Regulation des *CUP1*-Promotors sollte durch die Komplexierung der zuvor aus dem DMNP-EDTA-Cu^{2+}-Komplex freigesetzten Cu^{2+}-Ionen erreicht werden. Dabei konnte demonstriert werden, dass EDTA generell geeignet ist, um die *pCUP1*-vermittelte Zielgenexpression nach Induktion durch Cu^{2+}-Ionen erneut zu reprimieren. Ebenso wurde gezeigt, dass DEACM aufgrund seiner photolytischen und spektroskopischen Eigenschaften optisch kompatibel ist zum für das Cu^{2+}-*caging* bereits etablierten DMNP-EDTA. Daher sollte die Kombination von DMNP- und DEACM-Schutzgruppen eine unabhängige Freisetzung von Cu^{2+}-Ionen sowie EDTA durch die Belichtungen mit 300 bzw. 430 nm ermöglichen. Die Anwendung von DEACM-EDTA zeigte aber, dass die Cu^{2+}-Affinität des Chelators EDTA durch die Veresterung mit der DEACM-Schutzgruppe nicht ausreichend reduziert werden konnte. Dies führte zur einer Komplexierung von Cu^{2+}-Ionen durch das

intakte DEACM-EDTA. Eine Induktion der Genexpression durch Cu^{2+}-Ionen-Zugabe aus war somit in Gegenwart von DEACM-EDTA nicht möglich (vgl. Abbildung 42, Kapitel 2.3.3).

Zukünftige Arbeiten zu diesem Thema sollten sich daher auf eine Modifizierung der Schutzgruppen-Strategie fokussieren, mit dem Ziel die Cu^{2+}-Affinität eines *caged*-EDTA oder anderen *caged*-Chelators zu senken. Dies ist notwendig, um eine Komplexierung der Cu^{2+}-Ionen erst nach der Belichtung sicherzustellen. Zwei mögliche Ansätze zur Modifizierung von *caged*-EDTA sind Im Folgenden dargestellt. Beide zielen darauf ab, den sterischen Anspruch der Schutzgruppen zu erhöhen und die freie Beweglichkeit der EDTA-Struktur einzuschränken.

Der erste Ansatz (Abbildung 70, unten) sieht zunächst die Dimerisierung von 7-Amino-4-hydroxymethylcumarin (**73**) über eine Verbindung der Amino-Funktionalitäten mittels 1,2-Dibromethan (**72**) vor. Die anschließende Veresterung des Dimers **71** mit EDTA-Anhydrid (**57**) sollte zur zyklischen Verbindung **70** führen, welche die Beweglichkeit der EDTA-Struktur einschränken soll. Die photolytische Spaltung sollte zur Spaltung der Esterbindungen von Verbindung **70** und damit zur Freisetzung von EDTA (**66**) führen.

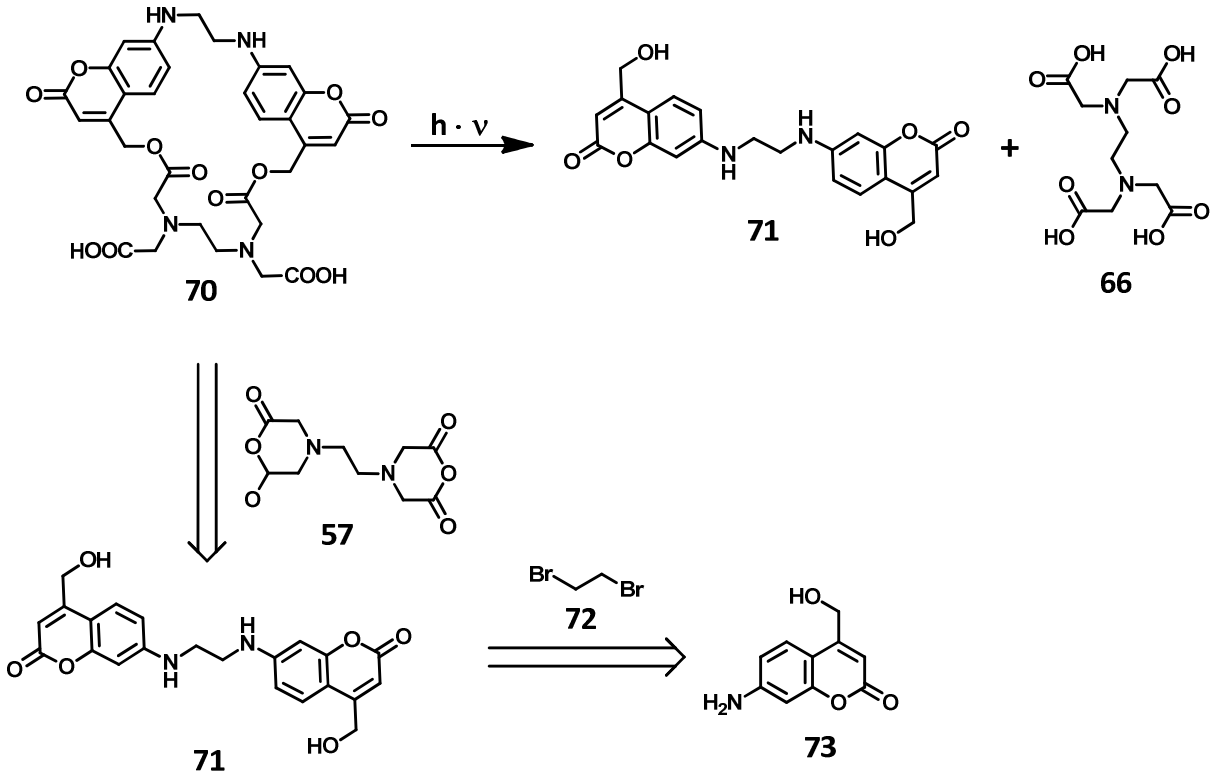


Abbildung 69: Retrosynthese (oben) und photolytische Spaltung (unten) von einer alternativen caged-EDTA Verbindungen zur Reduzierung der Cu^{2+}-Ionen-Affinität.

Für den zweite Ansatz (Abbildung 70, unten) müsst zunächst ein Aminoethan-*Linker* an das Cumarin **73** angefügt werden. Über diesen *Linker* könnte das Cumarin **76** dann anschließend über eine dauerhafte - nicht photolabile - Bindung an EDTA mittels dessen Anhydrids **57** geknüpft werden, um Verbindung **75** zu erzeugen. Die nicht photolabile Amid-Verbindung zwischen Cumarin und EDTA in dieser Verbindung **75** sollte keinen großen Einfluss auf die Komplexierung von Cu^{2+}-Ionen haben, da der in dieser Dissertation beschriebene DEACM-EDTA-Ester (vgl. Kapitel 2.3.3) ebenfalls eine hohe Affinität zu Cu^{2+}-Ionen aufwies.

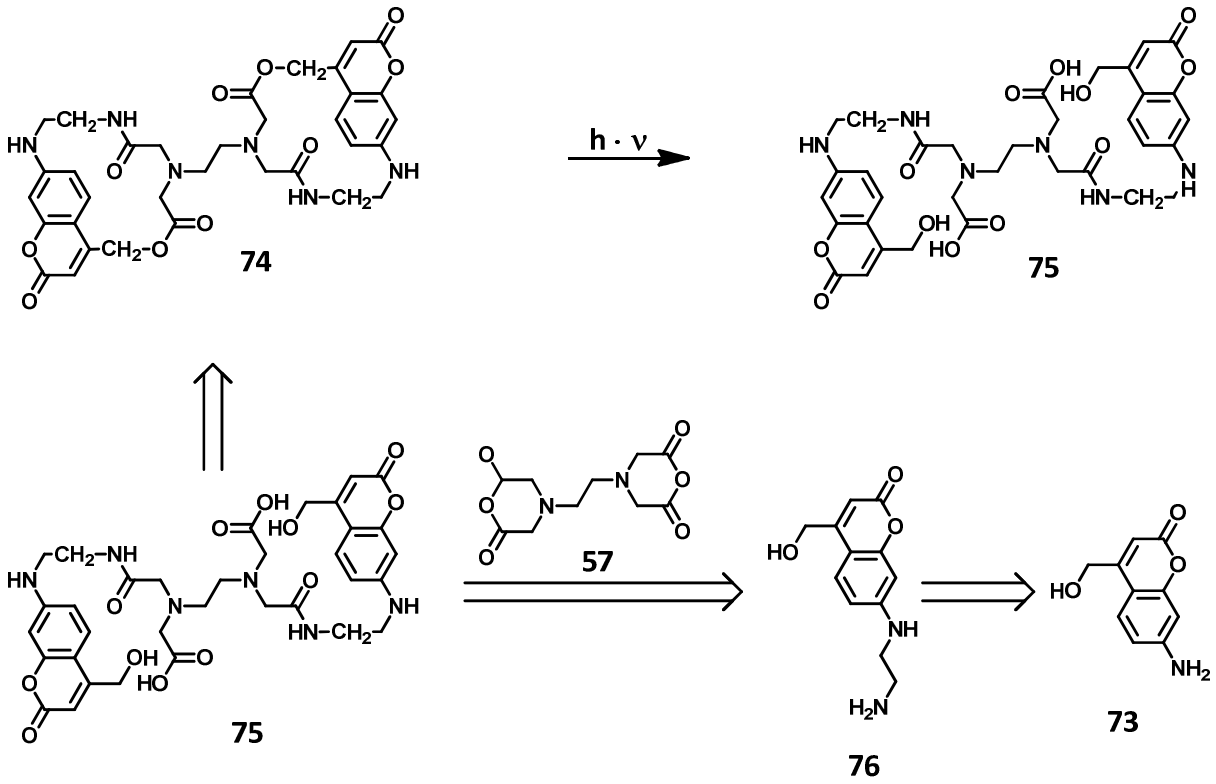


Abbildung 70: Retrosynthese (oben) und photolytische Spaltung (unten) von einer alternativen caged-EDTA Verbindungen zur Reduzierung der Cu^{2+}-Ionen-Affinität.

Die Verwendung des beschriebenen *Linkers* ist wahrscheinlich notwendig, da eine direkte Amidierung der phenylischen Aminogruppe der Verbindung **73** vermutlich das elektronischen System des Cumarins und damit auch dessen photolytische Eigenschaften negativ verändern würden. Im nächsten Schritt würde dann eine zweite, nun jedoch photolabile Bindung zwischen den EDTA- und Cumarin-Teilstrukturen durch eine intramolekuläre Veresterung von Verbindung **75** entstehen. Dadurch würde die Beweglichkeit der Carboxylgruppen des alternativen *caged*-EDTA **74** eingeschränkt, wodurch die Cu^{2+}-Affinität der EDTA-Struktur möglicherweise gesenkt werden könnte.

Caged-α-Faktor als alternative Effektormolekülklasse

Durch die erfolgreiche Maskierung von Cu^{2+}-Ionen und Methionin konnten sowohl photolabil geschützte Metallionen als auch niedermolekulare Biomoleküle erfolgreich zur optischen Regulation der Genexpression eingesetzt werden. Ebenfalls denkbar wäre der Einsatz eines photolabil geschützten Peptides zur Regulation des *FUS1*-Promotors. Dadurch könnte die Bandbreite an Effektormolekülklassen zur optischen Genregulation nochmals erweitert werden. Induziert wird der *FUS1*-Promotor durch eine Regulationskaskade, die durch die Bindung des sogenannten α-Faktors (kleines Signalpeptid) an ein membranständiges Sensorprotein aktiviert wird.[193,194] Der α-Faktor (**77**) ist in Abbildung 71 in Form eines linearen Peptids von 13 Aminosäuren (TRP-HIS-TRP-LEU-GLN-LEU-LYS-PRO-GLY-GLN-PRO-MET-TYR) dargestellt.[195,196]

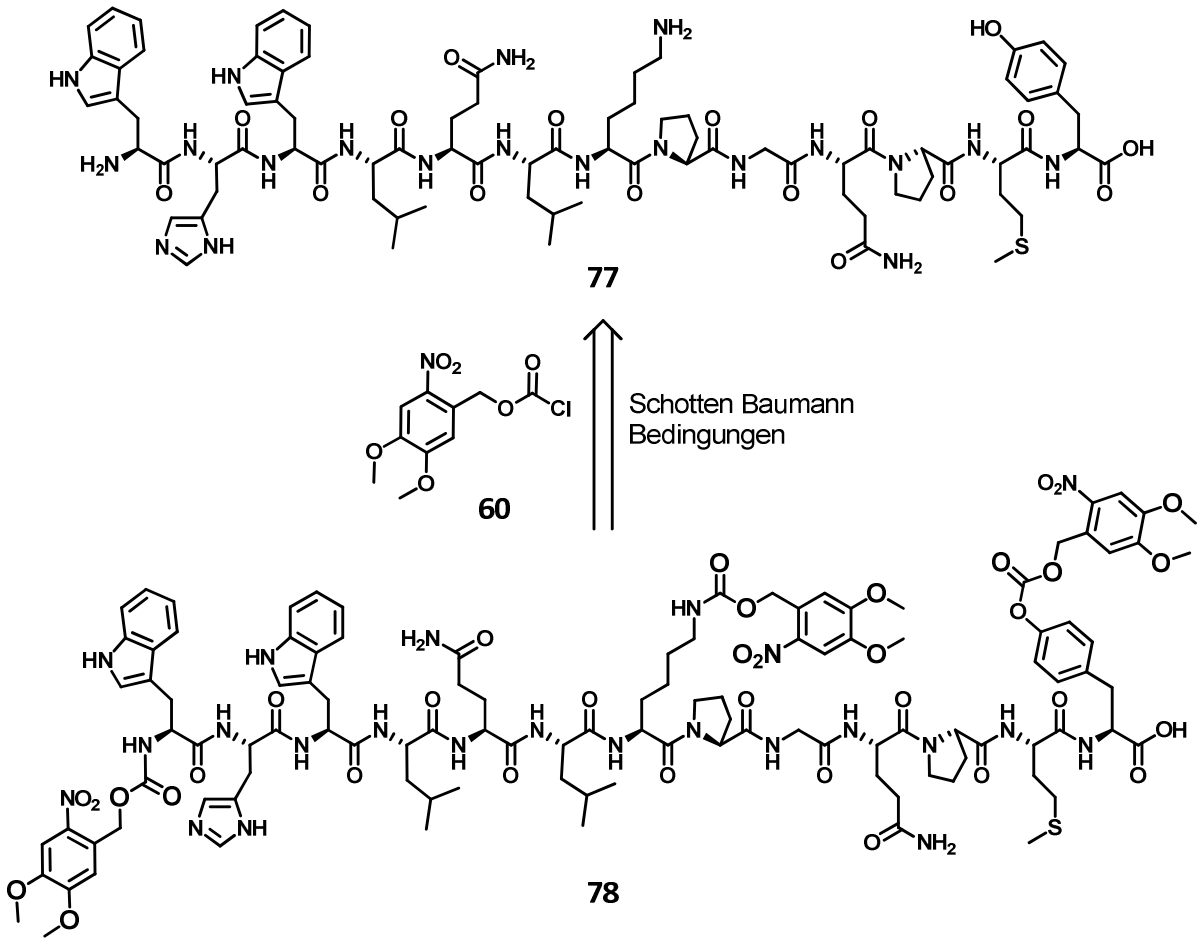


Abbildung 71: Potenzielle Strategie zur Synthese des caged-α-Faktors.

Zwei Aminosäurereste sowie der N-Terminus verfügen über nukleophile Gruppen. Diese könnten, ähnlich wie bei *caged*-Methionin, durch den Einsatz von NVOC-Cl [(S)-N-(4,5-Dimethyl-2-nitrobenzyl-oxycarbonyl)-Chlorid; **60**] mit photolabilen Schutzgruppen versehen werden. Dies würde darauf zielen, die räumliche Struktur des Peptids zu verändern, um eine Erkennung des *caged*-α-Faktors (**78**) durch die Sensorporteine[197,198] im geschützten Zustand zu verhindern.

In seiner natürlichen Funktion spielt der α-Faktor als Peptidhormon eine entscheidende Rolle beim sogenannten *Mating* (Englisch für „Paarung“). Dieser Prozess beschreibt die sexuelle Reproduktion von *S. cerevisiae*, bei dem haploide Zellen mit unterschiedlichem Paarungstyp (*MATα* oder *MATa*) fusionieren, um eine einzelne Zelle mit diploidem Chromosomensatz zu bilden. Der α-Faktor wird dabei von α-Typ-Zellen sekretiert und dient der Stimulation von möglichen *Mating*-Partnern, den sogenannten a-Typ-Zellen. Eine Erkennung des α-Faktors erfolgt also von Zellen des a-Typs. Dadurch wird zum einen ein Längenwachstum in Richtung der Signalerkennung erzeugt und zum anderen eine Arretierung des Zellzykluses als Vorbereitung auf die Zellfusion.[194,199] Die Freisetzung des α-Faktors würde also nicht nur die Genexpression der *pFUS1*-kontrollierten Gene beeinflussen. Stattdessen hätte dies auch einen großen Einfluss auf die Morphologie[200–202] und das Wachstum[203] der *S. cerevisiae* Zellen, was für ein allgemeines Expressionssystem unvorteilhaft wäre.

Aufgrund dieser Annahme wurden erste Versuche unternommen, um die Beeinflussung von Morphologie und Wachstum durch den α-Faktor zu reduzieren. Die Änderungen der Morphologie sowie des Wachstums werden beide durch ein zentrales Regulatorprotein mit der Bezeichnung Far1p aktiviert.[203–205] Daher wurde eine *ΔFAR1*-Mutante von *S. cerevisiae* untersucht, bei der eine Deletion des *FAR1*-Gens vorlag (*S. cerevisiae Y01268, von* EUROSCARF, siehe Kapitel 5.3.1, Tabelle 18) mit dem Ziel die Auswirkungen der Deletion auf die Morphologie zu charakterisieren. Dazu wurde die *ΔFAR1*-Mutante im Vergleich zum Referenzstamm (*S. cerevisiae Y00000*) in α-Faktor-haltigem (10 µM) SC-Medium (Zymo Research) kultiviert und die Morphologie mikroskopisch analysiert. Abbildung 72 zeigt jeweils vier exemplarische Aufnahmen zu jeder Bedingung. Deutlich zu erkennen ist die längliche Verformung der Zellen des Referenzstammes bei Wachstum in Anwesenheit des α-Faktors. Die Δ*FAR1*-Mutante zeigte dagegen nur marginale Veränderungen der Zellform und neigte leicht zur vermehrten Zellagglomeration.

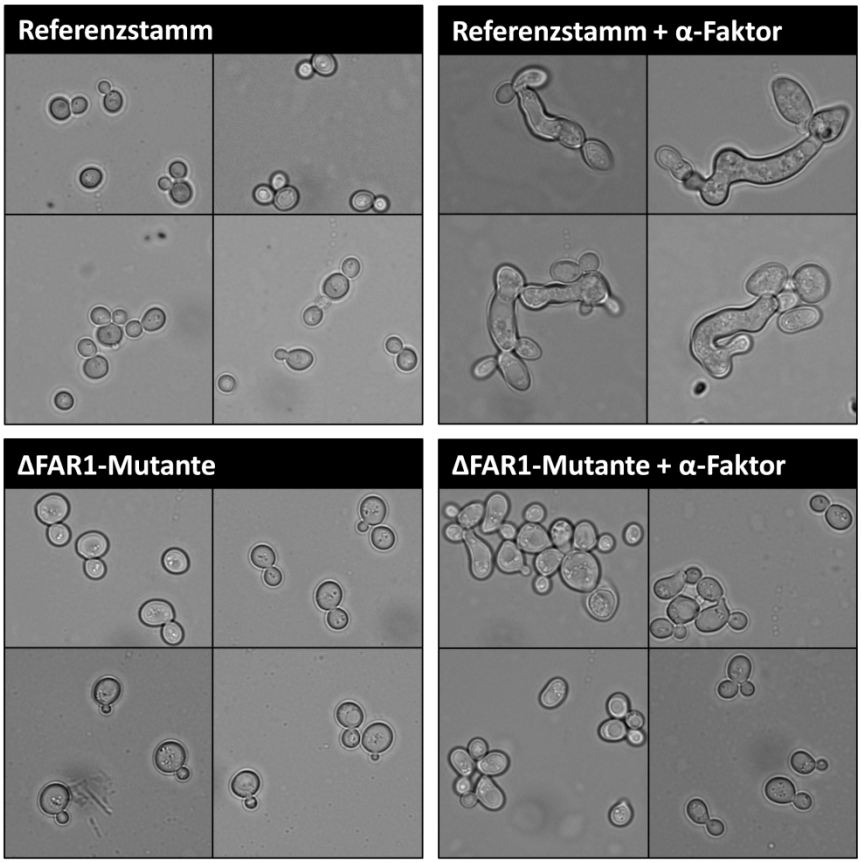


Abbildung 72: Erste Ergebnisse zum Einfluss des α-Faktors auf die Morphologie von S. cerevisiae Y00000 (Referenzstamm) und S. cerevisiae Y01268 (ΔFAR1-Mutante). Jeweils vier exemplarische Aufnahmen pro Bedingung. Die Zellen wurden jeweils in SC-Medium im BioLector Setup bei 30 °C in Anwesenheit von 10 µM α-Faktor (zu Beginn zugegeben).

Ergänzend dazu wurden Kultivierungsexperimente durchgeführt, um den literaturbekannten Einfluss des α-Faktors auf das Zellwachstum näher zu charakterisieren. Dazu wurde die Entwicklung der Zelldichte von Referenzstamm und *ΔFAR1* Mutante während einer Standardkultivierung in BioLector *Setup* (SC-Medium, 30 °C) unter Ausschluss und in Gegenwart des α-Faktors (10 µM) aufgezeichnet. Die Daten sind in Abbildung 73 dargestellt und verdeutlichen, dass das Wachstum des Referenzstammes in Anwesenheit des α-Faktors deutlich gehemmt wurde und erst mit ca. 15 h Verzögerung einsetzte. Das Wachstum der *ΔFAR1*-Mutante zeigte bei Zugabe des α-Faktors nur eine geringe Verlängerung der *lag*-Phase (Anlaufphase) von ca. 3 h. Ohne Zusatz des α-Faktors verhielten sich beide Stämme dagegen bis zum Erreichen der ersten Plateauphase nahezu identisch.

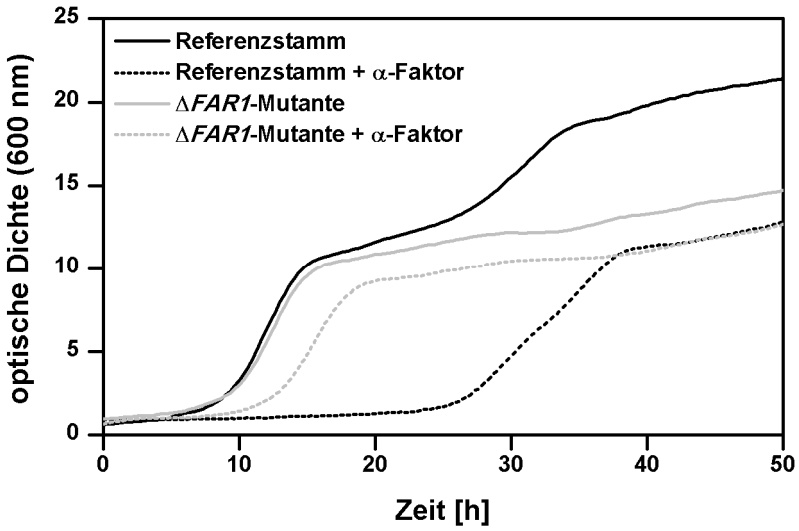


Abbildung 73: Einfluss des α-Faktors auf das Wachstum von S. cerevisiae Y00000 (Referenzstamm) und S. cerevisiae Y01268 (ΔFAR1-Mutante). Standard Kultivierungsbedingungen: SC-Medium, BioLector Setup, 30 °C.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass der Einsatz der *S. cerevisiae-ΔFAR1* Mutante die störenden Einflüsse des α-Faktors auf Zellwachstum und Morphologie deutlich reduzieren konnte. Somit wäre eine lichtregulierten Genexpression auf Basis einer *S. cerevisiae ΔFAR1*-Mutante mittels eines *caged*-α-Faktors als weitere Effektorklasse generell möglich. Zur Umsetzung eines solches Expressionssystems müsste zunächst eine geeignete Expressionskassette generiert werden, die eine α-Faktors-spezifische Induktion eines Reportergens (beispielsweise *YFP*) ermöglicht. Dabei könnte auf bereits publizierte Arbeiten zur Charakterisierung des *FUS1*-Promotors[71,193] und zur Erstellung von α-Faktors-induzierbaren Expressionssystemen auf Grundlage des *FUS1*-Promotors[206–209] zurückgegriffen werden. Die Weiterentwicklung einer lichtvermittelten Genregulation auf Basis des *FUS1*-Promotors mittels eines *caged*-α-Faktors scheint damit möglich.

5 Material und Methoden

5.1 Verwendete Materialien

5.1.1 Geräte und Software

Im Laufe dieser Arbeit wurden, falls nicht anders angegeben, die in Tabelle 10 und Tabelle 11 aufgeführten Geräte und Software verwendet.

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Name	**Fima**
Eppendorf Research, Pipette 0,1-2,5 µL	*Eppendorf* AG, Hamburg
Eppendorf Research, Pipette 1-10 µL	*Eppendorf* AG, Hamburg
Eppendorf Research, Pipette 10-100 µL	*Eppendorf* AG, Hamburg
HLC MKR23 Schüttelblock	*Ditabis* AG, Bovenden
Nano Drop 2000c	*Thermo Scientific* Corp., MA, USA
Shimadzu UV-1800, Spektrophotometer (CPS-240A)	*Shimadzu Europa GmbH*, Duisburg
VWR Doppio, *Gradienten-PCR-Cycler*	*VWR International* GmbH, Darmstadt
Invitrogen Novex MiniCell, Gelektrophoresesystem für *Invitrogen precast SDS-PAGE-gels*	*Invitrogen* GmbH, Darmstadt
BioLector	*m2p-labs GmbH*, Baesweiler
UVIKON 922 Spektrophotometer	Kontron AG, Augsburg
Microplate Reader Infinite M1000 PRO	Tecan
VL-315.BL Lampe	*Vilber Lourmat Deutschland* GmBH
MixMate Schüttler	*Eppendorf* AG
Lumos 43 Belichtungsapperatur	Atlas-Photonics SARL

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Software.

Name	**Firma**	**Anwendung**
ChemDraw 14,0	*PerkinElmer*	Erstellung von Abbildungen mit chemischen Strukturen
CloneManager 9,0	*Sci-Ed*	Simulation von Clonierungsstrategien,
Excel 2013	*Microsoft*	Bearbeitung von Datensätzten
Inkscape 0,48	*Inkscape Community*	Bearbeitung von Grafiken
MestReNova	*Mestrelab research*	Analyse von NMR-Spektren
OriginPro 8,6G	*OriginLab*	Auswertung von Datensätzen, Erstellung von lineare und nicht-lineare Funktionen Erstellung von Abbildungen mit Graphen, Funktionen und Interpolationen
Word 2013	*Microsoft*	Erstellung und Bearbeitung von Textdokumenten
Zotero	*Center for History and New Media, George Mason University*	Erstellung von Zitationen in Textdokumenten

5.1.2 Chemikalien, Enzyme und Lösungen

Chemikalien wurden – soweit unten nicht anders angegeben – von folgenden Firmen bezogen und verwendet: *Carl Roth* GmbH + Co KG. (Karlsruhe), *Sigma Aldrich* (München), *Fermentas* GmbH (St. Leon-Rot), *Cambridge Isotope Laboratories* (Saarbrücken). Pfu-Polymerase, T4-Ligase, Restrinktionsendonukleasen, dNTPs wurden bei Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und Phusion-Polymerase bei *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA) bezogen.

6-Nitropiperonyl β-D-galactopyranosid (NPip-Gal bzw. caged-Gal, 26) wurde von Dr. Claus Bier im Rahmen einer Kooperation [BMBF, FKZ: 031A167A, Neue Optosensoren und Photoregulatoren zur Licht-vermittelten Steuerung und Analyse molekularer Systeme (OptoSys)] hergestellt[110] und für die Versuche zur Verfügung gestellt.

Alle Nähr- und Testmedien wurden für 20 min bei 121 °C und 200 kPa autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wie Antibiotika, Hefe-Stickstoff Basismedium und Aminosäuren wurden sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter: 0,22 µm Porendurchmesser) und dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur unterhalb von 60 °C nachträglich zugesetzt.

Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen

Medium	**Bestandteile**	**pH-Wert**	**Referenz**
LB-Medium	10 g/L Trypton, 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefeextrakt, Beim Festmedium wurden zusätzlich 15 g/L Agar zugegeben.	pH = 7, mit NaOH eingestellt	
YPD	20 g/L Pepton, 10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Glukose (Die Glukose wurde separat autoklaviert und anschließend hinzugegeben.) Bei Festmedium wurden zusätzlich 20 g/L Agar zugegeben.		
SC-Medium (*synthetic complete medium*)	7 g/L Hefe-Stickstoff Basismedium, 20 g/L Glukose, Supplemente (s. Tabelle 19) Beim Festmedium wurden zusätzlich 20 g/L Agar zugegeben. Bei der Kultivieung der Stämme *S.c.-pGAL1-YFP* und *S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP* wurden 16 g/L Glycerin und 4 g/L Laktat als alternative Kohlenstoffquelle anstelle von Glukose zugegeben.	pH 5,6, mit KOH oder NaOH eingestellt	
TFB1 (t*ransformation buffer 1*)	30 mM KAc, 50 mM $MnCl_2$, 100 mM PbCl, 10 mM $CaCl_2$, 15 %(*v/v*) Glycerin anschließend sterilfiltriert		[210]
TFB2 (t*ransformation buffer 2*)	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2$, 15 % (*v/v*) Glycerin, autoklaviert, Glycerin separat autoklaviert		[210]
50x TBE	2 M TRIS, 0,9 M Eisessig; 0,05 M EDTA	pH 8	
Transformationsmix (T-Mix)	33,3 % (*w/v*) Polyethylenglycol (PEG) 3500, 0,1 M Lithiumacetat, 277 ng/ mL zu transformierende Plasmid-DNA, 227 mg/ mL einzelsträngige Lachs-Sperma-DNA [wurde kurz vor Zusammensetzung des T-Mixes denaturiert (5 min 99 °C)]		[211]
5x DNA-Probenpuffer	100 mM EDTA, 43 % (*v/v*) Glycerin; 0,05 % (*w/v*) Bromphenolblau		
50x TAE Puffer	2 M TRIS; 0,9 M Eisessig; 0,05 M EDTA Vor der Verwendung wurde diese Stammlösung ggf. mit demineralisiertem Wasser auf 1x TAE verdünnt.	pH 8	

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch die Verwendung des *innuPREP Plasmid Mini Kit™* der Firma *Analytik Jena* (Jena) nach Herstellerangaben. Zur Isolation aus *S. cerevisiae* wurde das *Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II* Kit der Frima *Zymo Research* (Irvine, CA, USA) ebenfalls nach Herstellerangaben angewendet. Die Konzentration von DNA-Präparationen wurde photometrisch mittels eines *Nanodrop* der Firma *Thermo Fisher Scientific* bestimmt.

5.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCRs zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden nach Saiki *et al.* durchgeführt.[212] Es wurden standardmäßig PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µL angesetzt, die sich wie folgt zusammensetzten: 1 ng Plasmid- oder 10 ng genomische DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Phusion*- oder *Pfu*-Polymerase im Reaktionspuffer des jeweiligen Herstellers. Die PCR zur Entfernung einer Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *SacI* aus dem Plasmid pIE3-*YFP* war wie folgt zusammengesetzt: 2,5 U Phusion Polymerase im Reaktionspuffer des Herstellers, jeweils 25 pmol der Oligonukleotide del_*SacI*_for und del_*SacI*_for, 0,2 mM dNTPs und 0,25 ng/µL pIE3-*YFP* Plasmid DNA als Matrizen-DNA. Die Programme zu den Amplifikationen sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Programme der Polymerase-Kettenreaktionen. Die Schritte Denaturierung, Annealing und Amplifikation wurde in dieser Reihenfolge jeweils 30-fach wiederholt.

			30 x			
Programm	**Polymerase**	**Initiale Denaturierung [°C] / [min]**	**Denaturierung [°C] / [min]**	**Annealing [°C] / [min]**	**Amplifikation [°C] / [min]**	**Finale Amplifikation [°C] / [min]**
pCUP1	Pfu	95 / 10	95 / 0,75	63,5 / 0,75	72 / 1,25	72 / 10
pFUS1	Phusion	98 / 10	98 / 0,16	54 / 0,5	72 / 1	72 / 10
SacI	Pfu	95 / 10	95 / 0,75	53,5 / 0,75	72 / 4,25	72 / 10

5.2.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA sowie der gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. DNA-Lösungen wurden vor dem Auftragen mit DNA-Probenpuffer [0,05 % (*w*/*v*) Bromphenolblau, 100 mM EDTA und 40 % (*v*/*v*) Glycerol] versehen. Die elektrophoretische Auftrennung (180 V, 35 min) erfolgte in 1 %igen (*w/v*) Agarosegelen[213] [1x TAE, 1 % (*w/v*) Agarose, 0,1 ‰ (*v/v*) 10000x Gel Red™ (*Biotium Inc.*, Hayward, CA, USA)]. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE Puffer verwendet. Zur Identifizierung der Nukleinsäuren wurde ein Größenstandard [*GeneRulerTM Ladder* (1 kb oder 100 bp) von der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde auf einem *Eagle Eye II*-Videodokumentationssystem der Firma *Stratagene* (Heidelberg) durchgeführt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des *innuPREP Gel Extraction Kit* der Firma *Analytik Jena* (Jena) nach Angaben des Herstellers.

5.2.4 *In vitro* Rekombination und Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Restriktion von DNA und die Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach Sambrook *et al.*[213] sowie nach den Angaben der Hersteller der jeweiligen Enzyme in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

Die klonierten Promotoren wurden zur Kontrolle auf etwaige Mutationen vor der Transformation der Reporterstämme unter Verwendung der „M13“ Primer sequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz). Die einzelnen Sequenzierergebnisse sind im Anhang beigefügt.

5.2.5 Verwendete Plasmide und Nukleinsäuren

Tabelle 14: Verwendete rekombinante Plasmide und ihre genetischen Eigenschaften

Plasmid Name	**Genotyp**	**Referenz**
pIE3 -*YFP*	*AmpR, URA3, 2µ, pGAL1-YFP, TCYC1*	eigene Masterarbeit[119]
pPK1*_pGAL1-YFP*	*AmpR, URA3, 2µ, pGAL1-YFP, TCYC1, ΔSacI*	diese Arbeit
pPK1*_pCUP1-YFP*	*AmpR, URA3, 2µ, pCUP1-YFP, TCYC1, ΔSacI*	diese Arbeit
pPK1*_pMET17-YFP*	*AmpR, URA3, 2µ, pGAL1-YFP, TCYC1, ΔSacI*	diese Arbeit
pPK1*_pFUS1-YFP*	*AmpR, URA3, 2µ, pFUS1-YFP, TCYC1, ΔSacI*	diese Arbeit

Primer wurden mit Hilfe der „Clone Manager“ Software entworfen und durch die Firma *VWR International* (USA) synthetisiert. Der Promotor *pMET17* flankiert von Restriktions-endonukleasen-Schnittstellen wurde von der Firma *GenScript* USA Inc. hergestellt.

Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotide für PCRs und Sequenzierungen. Kleine geschriebene Buchstaben markieren nicht-komplementäre Überhänge.

Name	**Sequenz**	**Verwendung**
del_*SacI*_for	CTTGTC GAC GGA GaT CGA ATT CGG	Mutation der *SacI* Schnittstelle
del_*SacI*_rev	CCGAATTCGAtCTCCGTCGACAAG	Mutation der *SacI* Schnittstelle
*pCUP1*_for	atatagagctcAGTTAGAAAAAGACATTTTTGCTG TCAGTCACTGTCAAGA	Amplifikation von *pCUP1*
*pCUP1*_rev	tatatactagtGATGACTTCTATATGATATTGCAC TAACAAGAAGATATTATAATGCAATT	Amplifikation von *pCUP1*
*pFUS1*_for	atatagagctcTGAACGATGATTCAGTTCGC	Amplifikation von *pFUS1*
*pFUS1*_rev	tatatactagtTTTGATTTTCAGAAACTTGATGG	Amplifikation von *pFUS1*

Tabelle 16: Sequenzen der verwendeten Promotoren und des Reporterproteins. Kleine geschriebene Buchstaben markieren nicht-komplementäre Überhänge.

pMET17	*MET17*-Promotor (-577 bis-1 bp upstream Region vor dem Startcodon des MET17 Gens)[214]
atatagagctcCTAGTTAGTAGATGATAGTTGATTTTTATTCCAACACTAAGAAATAATTTCGCCATTTCTTGAATGTATTTAAA GATATTTAATGCTATAATAGACATTTAAATCCAATTCTTCCAACATACAATGGGAGTTTGGCCGAGTGGTTTAAGGCGTCA GATTTAGGTGGATTTAACCTCTAAAATCTCTGATATCTTCGGATGCAAGGGTTCGAATCCCTTAGCTCTCATTATTTTTTGC TTTTTCTCTTGAGGTCACATGATCGCAAAATGGCAAATGGCACGTGAAGCTGTCGATATTGGGGAACTGTGGTGGTTGGC AAATGACTAATTAAGTTAGTCAAGGCGCCATCCTCATGAAAACTGTGTAACATAATAACCGAAGTGTCGAAAAGGTGGCA CCTTGTCCAATTGAACACGCTCGATGAAAAAAATAAGATATATATAAGGTTAAGTAAAGCGTCTGTTAGAAAGGAAGTTT TTCCTTTTTCTTGCTCTCTTGTCTTTTCATCTACTATTTCCTTCGTGTAATACAGGGTCGTCAGATACATAGATACAATTCTAT TACCCCCATCCATACAactagtatata	
pCUP1	*CUP1*-Promotor (-292 bis -57 bp upstream Region vor dem Startcodon des CUP1 Gens)[157]
AGTTAGAAAAAGACATTTTTGCTGTCAGTCACTGTCAAGAGATTCTTTTGCTGGCATTTCTTCTAGAAGCAAAAAGAGCGA TGCGTCTTTTCCGCTGAACCGTTCCAGCAAAAAAGACTACCAACGCAATATGGATTGTCAGAATCATATAAAAGAGAAGC AAATAACTCCTTGTCTTGTATCAATTGCATTATAATATCTTCTTGTTAGTGCAATATCATATAGAAGTCATC	
pGAL1	*GAL1*-Promotor (-426 bis -5 bp upstream Region vor dem Startcodon des GAL1 Gens)[63,215,216]
GACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTCACCGGTCGCGTTCCTGAAACGCAGATGTGCCTCGC GCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGC CCCACAAACCTTCAAATGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGG TAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAAAACTGCATAACCACTTTAACTAATAC TTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTT TAACGTCAAGGAGAAAAAACC	
YFP	Yellow Fluorescent Protein (YFP) Gen [Weiterentwicklung des Green Fluorescent Proteins (GFP)][217–219]
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCAC AAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCA AGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGA AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAAC TACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG GAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGA AGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCA GAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTA CAAGTAAG	

5.2.6 Sequenzen der Expressionskassetten

Tabelle 17: Sequenzen der Expressionskassetten mit den jeweiligen Promotoren, dem YFP-Gen und der Terminator Sequenz. Beachte unten stehende Legende.

pGAL1-YFP-tCYC1
TGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTCACCGGTCGCGTTCCTGAAACGCAGATGTGCCTCGC GCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCC CCACAAACCTTCAAATGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTA ATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAAAACTGCATAACCACTTTAACTAATACTTT

CAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAAC
GTCAAGGAGAAAAAACCCCGGATTCTAGAACTAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCAT
CCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGC
AAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGC
CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAG
GAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGA
ACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAG
CCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACG
GCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTAC
CTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGC
CGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGATCCGAATTCGATCTCCGTCGACAAGCTTATCGATACCGTCG
ACCTCGAGT**CATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGT
TAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTT
CTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAA
GGCTTTAATTTGCGGCCGGTACC**

pCUP1-YFP-tCYC1

AGTTAGAAAAAGACATTTTTGCTGTCAGTCACTGTCAAGAGATTCTTTTGCTGGCATTTCTTCTAGAAGCAAAAAGAGCGAT
GCGTCTTTTCCGCTGAACCGTTCCAGCAAAAAAGACTACCAACGCAATATGGATTGTCAGAATCATATAAAAGAGAAGCAA
*ATAACTCCTTGTCTTGTATCAATTGCATTATAATATCTTCTTGTTAGTGCAATATCATATAGAAGTCATC*ACTAGTATGGTGA
GCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAG
CGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCC
GTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAC
GACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACC
CGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC
AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAT
CAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCA
TCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAG
CGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGATC
CGAATTCGATCTCCGTCGACAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGT**CATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGC
CCTCCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTATAGTT
ATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATAC
TGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCCGGTACC**

pMET17-YFP-tCYC1

CTAGTTAGTAGATGATAGTTGATTTTTATTCCAACACTAAGAAATAATTTCGCCATTTCTTGAATGTATTTAAAGATATTTAA
TGCTATAATAGACATTTAAATCCAATTCTTCCAACATACAATGGGAGTTTGGCCGAGTGGTTTAAGGCGTCAGATTTAGGTG
GATTTAACCTCTAAAATCTCTGATATCTTCGGATGCAAGGGTTCGAATCCCTTAGCTCTCATTATTTTTTGCTTTTTCTCTTGA
GGTCACATGATCGCAAAATGGCAAATGGCACGTGAAGCTGTCGATATTGGGGAACTGTGGTGGTTGGCAAATGACTAATT
AAGTTAGTCAAGGCGCCATCCTCATGAAAACTGTGTAACATAATAACCGAAGTGTCGAAAAGGTGGCACCTTGTCCAATTG
AACACGCTCGATGAAAAAAATAAGATATATATAAGGTTAAGTAAAGCGTCTGTTAGAAAGGAAGTTTTTCCTTTTTCTTGCT
CTCTTGTCTTTTCATCTACTATTTCCTTCGTGTAATACAGGGTCGTCAGATACATAGATACAATTCTATTACCCCCATCCATAC
*AACTAGT*ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAAC
GGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC
CGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCA
CATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACG
GCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTT
CAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAG
CAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCA
GCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAG
ACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTG
TACAAGTAAGGATCCGAATTCGATCTCCGTCGACAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGT**CATGTAATTAGTTATGTCA
CGCTTACATTCACGCCCTCCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTAT
TTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACG
CATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCCGGTACC**

Markierungscode: *Promotor,* YFP Gen, **tCYC1 (Terminatorregion des *CYC1* Gens)**

5.2.7 Konstruktion der Reporterstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide basieren auf dem Plasmid pIE3-YFP das im Rahmen der vorangegangen Masterarbeit erstellt wurde. Zur Umsetzung der geplanten Klonierungsstrategie für die Erzeugung der Reporterplasmide wurde zunächst eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *SacI* aus dem Plasmid entfernt. Dazu wurde eine PCR mit den Oligonukleotide del_*SacI*_for und del_*SacI*_for nach den Angaben in Kapitel 5.2.2 durchgeführt. Das so entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pPK1_*pGAL1-YFP*. Zur Erzeugung der Reporterplasmide pPK1_*pCUP1-YFP* und pPK1_*MET17-YFP* wurde der *GAL1*-Promotor gegen die entsprechenden Promotoren ausgetauscht.

Der Promotor *pCUP1* (-57 bis -292 Position des CUP1-Gens)[157] wurde mit Hilfe der Oligonukleotide *pCUP1*_for und *pCUP1*_rev aus der genomischen DNA von *S. cerevisiae* Y00000 nach den Angaben in Kapitel 5.2.2 amplifiziert und unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *SpeI* und *SacI* in das Plasmid pPK1_*pGAL1-YFP* unter Austausch des *GAL1*-Promotors kloniert. Das so entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pPK1_*pCUP1-YFP.*Der Promotor *pMET17* (-577 bis-1 Position des MET17 Gens)[214] wurde als Oligonukleotid von der Firma GenScript USA Inc. synthetisiert und unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *SpeI* und *HindIII* in das Plasmid pPK1_*pGAL1-YFP* unter Austausch des *GAL1*-Promotors kloniert. Das so entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pPK1_*pMET17-YFP.*

Anschließend wurden Zellen des Stammes *S. cerevisiae* Y00000 mit dem Plasmid pPK1_*pGAL1-YFP bzw.* pPK1_*pCUP1-YFP* transformiert, um die Reporterstämme *S. c.-pGAL1-YFP bzw. S. c.-pMET17-YFP* zu erzeugen. Zellen des methioninprototrophen Stammes *S. cerevisiae Y10000* wurden mit dem Plasmid pPK1_*pMET17-YFP* transformiert, um den Reporterstamm *S. c.-pMET17-YFP* zu erzeugen.

5.3 Mikrobiologische Methoden

5.3.1 Verwendete Mikroorganismen

Tabelle 18: Verwendete Mikroorganismen und ihre genetischen Eigenschaften

Stammname	Genotyp	Kommentar	Referenz
Escherichia coli DH5α	*F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K^- m_K^+), λ–*	Standard-Klonierungsstamm	Meselson und Yuan[220]
Saccharomyces cerevisiae Y00000	*MATα; his3Δ; leu2Δ; met15Δ; ura3Δ*	Rezipientenstamm	Brachmann *et al.*[221]
Saccharomyces cerevisiae Y03157	*BY4741; Mata; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YBR020w::kanMX4 (Δgal1)*	Galaktokinasegen *GAL1* deletiert	Euroscarf, SRD - Scientific Research and Development GmbH
Saccharomyces cerevisiae Y01268	*BY4741; MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YJL157c::kanMX4 (ΔFAR1)*	α-Faktor Rezeptorgen *FAR1* deletiert	Euroscarf, SRD - Scientific Research and Development GmbH
Saccharomyces cerevisiae Y10000	*BY4742, MATα ; his3Δ 1; leu2Δ 0; lys2Δ 0; ura3Δ 0*	Rezipientenstamm für das *pMET17*-Expressionssystem (methioninprototroph)	Euroscarf, SRD - Scientific Research and Development GmbH
S.c.-pGAL1-YFP	*S. cerevisiae Y00000 transformiert mit pPK1_pGAL1-YFP*		diese Arbeit
S.c.-ΔGAL1-pGAL1-YFP	*S. cerevisiae Y03157 transformiert mit pPK1_pGAL1-YFP*		diese Arbeit
S.c.-pCUP1-YFP	*S. cerevisiae Y00000 transformiert mit pPK1_pCUP1-YFP*		diese Arbeit
S.c.-pFUS1-YFP	*S. cerevisiae Y00000 transformiert mit pPK1_pFUS1-YFP*		diese Arbeit
S.c.-ΔFAR1- pFUS1-YFP	*S. cerevisiae Y01268 transformiert mit pPK1_pFUS1-YFP*		diese Arbeit
S.c.-pMET17-YFP	*S. cerevisiae Y10000 transformiert mit pPK1_pMET17-YFP*		diese Arbeit

5.3.2 Kultivierung von Mikroorganismen

E. coli DH5α Stämme wurden standardgemäß bei 37 °C in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten inkubiert. Stämme mit plasmidkodierten Resistenzmarkern wurden unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika (Tabelle 19) kultiviert.

Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* wurden bei 30 °C in YPD-Medium (Tabelle 12) bzw. auf YPD-Agarplatten inkubiert. Stämme mit plasmidkodierten Auxotrophiemarkern wurden auf entsprechenden selektiven synthetischen Vollmedien (SC-Midum, Tabelle 12) unter Zugabe der entsprechenden essentiellen Nährstoffe kultiviert (Tabelle 19). Übernachtkulturen (ÜK) wurden für mindestens 16 Stunden inkubiert. Kulturen bis zu einem Volumen von 5 mL wurden im Reagenzglas auf einem Brutroller inkubiert, größere Kulturen im Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen: max. 1/10 des Gefäßvolumens) auf einem Rundschüttler bei 150 UpM.

Tabelle 19: Auflistung der zur Kultivierung genutzten Antibiotika und Supplemente sowie deren Konzentrationen und Lösungsmittel

Antibiotikum / Supplement	**Endkonzentration [µg/mL]**	**Lösungsmittel**
Ampicillin	100	demineralisiertes Wasser
L-Histidin	20	demineralisiertes Wasser
L-Leucin	60	demineralisiertes Wasser
L-Tryptophan	40	demineralisiertes Wasser
L-Methionin	20	demineralisiertes Wasser
α-Faktor	16,8 (= 10 µM)	demineralisiertes Wasser

5.3.3 Mikrofluidische Kultivierung

Experimente zur mikrofluidischen Kultivierungen wurden in enger Zusammenarbeit von Dr. Christopher Probst im Institut für Bio- und Geowissenschaften, IBG-1: Biotechnologie (Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Die Kultivierungen wurden in Standard SC-Medium bei 30°C vorgenommen. Dabei konnte mittels mikrofluidischer Ventile schnell und ohne nennenswertes Totvolumen zwischen Medium mit und ohne Methionin gewechselt werden. Genauere Angaben zu den Apparaturen und Herstellungsverfahren der *microfluidic chips* können den Publikationen von Grünberger *et al.* und Kusen *et al.* entnommen werden.[173,222]

5.3.4 Kultivierung und Belichtung im BioLector *Setup*

Die Vorkultur wurde in Reagenzgläsern mit 5 mL Kulturbrühe bei 30 °C und 600 UpM über 16 - 18 Stunden in SC-Medium inkubiert. Die Inokulation erfolgte mit einer Einzelkolonie eines Verdünnungsausstriches auf einer Agarplatte.

Kultivierungen für Vorversuche zu den Reporterstämmen wurden in einem BioLector der Firma *m2p-labs* durchgeführt. Ziel dabei war es, in einem *proof-of-concept* zunächst die generelle Machbarkeit der lichtregulierten Genexpression zu überprüfen. Zusätzlich wurden sowohl die Toxizitäts- als auch die Stabilitätsuntersuchungen in diesem *Setup* durchgeführt. Dabei wurden 48-*Well*-Mikrotiterplatten mit Schikanen (sogenannte *Flowerplate*, m2p-labs) verwendet und mit einem Kulturvolumen von 800 µL SC-Medium pro *Well* befüllt. Die Inokulation erfolgte mit einer OD_{600} von 0,2. Das BioLector *Setup* ermöglichte die nichtinvasive Echtzeitmessung von Zelldichte und YFP-Fluoreszenz. Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (d.h. nach ca. 5 - 6 h Inkubation) wurden die Kulturen durch manuelle Effektor-Zugabe oder durch Bestrahlung induziert. Letzteres erfolgte durch Belichtung mit einer Quecksilberdampf-Handlampe [VL-315.BL *lamp*, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, ausgestattet mit drei Schwarzlichtröhren (15 W, 365nm)], welche 3 cm über der *Flowerplate* installiert wurde. Dies führte zu einem Lichteintrag von F_0= 3 mW/cm^2 bei λ_{max} = 365 nm.

Die Standardkultivierungen der *S. cerevisiae* Reporterstämme zur lichtregulierten Genexpression wurden durch Dr. Georg Wandrey am Institut der AVT–Bioverfahrenstechnik der RWTH Aachen durchgeführt. Hierfür wurde ein eigens konstruiertes *Screening*-System verwendet, welches auf dem Prinzip des kommerziell erhältlichen BioLectors basiert. Die Kultivierung erfolgte dabei ebenfalls in 48-*Well-Flowerplates* mit einer parallelen Echtzeitmessung der Zelldichte und YFP-Fluoreszenz. Zusätzlich wurde ein Aufsatz für die *Flowerplates* Mikrotiterplatten konstruiert, um eine nicht-invasive Bestrahlung der Kultivierungen zu ermöglichen. Der Aufsatz bestand aus 48 autonom regelbaren LEDs, welche gegenseitig abgeschirmt waren, sodass jedes *Well* durch eine einzelne LED bestrahlt wurde. Somit konnte die Belichtung in jedem Well individuell gesteuert werden. Der Lichteintrag betrug dabei F_0= 53mW/cm^2 (λ_{max} = 368 nm). Die Kultivierungsbedingungen entsprachen denen der Vorversuche wobei die Unterschiede bei Lichteintrag und Wellenlänge zu beachten sind (s.o.). Genaue Details zu Aufbau und Funktionsweise des eigens konstruierten *Screening*-Systems sind in der Literatur beschrieben.[105,131,173]

5.3.5 Lagerung von Mikroorganismen

Zur dauerhaften Lagerung von Mikroorganismen wurden 840 µL Übernachtkultur mit 360 µL Glycerin [50 % (*v/v*)] vermischt [Endkonzentration: 15 % (*v/v*) Glycerin], in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.3.6 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen

Escherichia coli

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte (modifiziert) nach C. Mülhardt.[210] Eine Flüssigkultur (100 mL LB-Medium) wurde aus einer Übernachtkultur mit einer Zellzahl entsprechend einer optischen Dichte OD_{600} von 0,05 inokuliert. Nachdem eine OD_{600} von 0,5 - 0,6 (nach ca. 2 h) erreicht wurde, wurde die Flüssigkultur auf zwei sterile sowie vorgekühlte 50 mL *Falcon Tubes* (50 mL) aufgeteilt und anschließend bei 4 °C mit 3000 x g 10 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 15 mL eiskalter TFB1-Lösung pro 50 mL Kultur resuspendiert und 15 min inkubiert. Darauf folgend wurde 10 min lang mit 3000 x g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 4 mL eiskalter TBF2-Lösung resuspendiert und anschließend in Aliquots zu je 150 µL in 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Transformation der kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA wurde mit Hilfe der *heat shock* Methode nach Hanahan durchgeführt.[223] Dabei wurden die jeweiligen Zellen (150 µL, 108 Zellen/mL) mit 3 - 8 µL Plasmidlösung (200 - 500 ng) versetzt und 30 min bei 0 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock (42 °C, 90 s) ausgesetzt und darauf mit 600 µL LB-Medium versetzt. Im nächsten Schritt wurde eine zweistündige Inkubation (37 °C, ohne Schütteln) durchgeführt und die Zellen anschließend auf entsprechend mit Antibiotika versetzten Selektiv-Agarplatten ausplattiert.

Saccharomyces cerevisiae

Eine Flüssigkultur (100 mL YPD-Medium) wurde aus einer Übernachtkultur mit einer Zellzahl entsprechend einer OD_{600} von 0,5 inokuliert. Nachdem die Kultur eine OD_{600} von 2 erreicht (ca. 5 h) hatte wurde diese in zwei sterile Einweg-Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit 25 mL sterilem Wasser gewaschen (Zentrifugation jeweils 3000 x g, 5 min).

Anschließend wurde das Pellet in 1 mL sterilem Wasser resuspendiert und in ein 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (3000 x g, 5 min). Das Pellet wurde in 1 mL sterilem Wasser resuspendiert, in 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß zu je 100 µL aliquotiert und erneut sedimentiert (11000 x g, 1 min). Der Überstand wurde verworfen.

Diese Zellen wurden zur sofortigen Transformation verwendet. Dazu wurde ein Zellaliquot mit 360 µL des T-Mixes (s. Tabelle 12, Kapitel 5.1.2,) resuspendiert und 40 min bei 42 °C inkubiert. Der T-Mix wurde dazu kurz vor der Verwendung frisch hergestellt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 mL Wasser resuspendiert. Bis zu 100 µL dieser Zellsuspension wurde zur Inkubation bei 30 °C auf Selektiv-Agarplatten (s. Kapitel 5.3.2) aufgetragen (nach *High-Efficiency Transformation Protocol*, Woods und Gietz).[211]

5.4 Spektroskopische Methoden

5.4.1 Absorptionsmessungen

Absorptionsmessungen zur Bestimmung der optischen Dichte oder der Nukleinsäurekonzentration wurden mit einem *NanoDrop 2000* durchgeführt. Absorptionsspektren von Verbindungen wurden mit einem *Photometer UV1800* oder einem *UVIKON 922 Spektrophotometer* vermessen. Das Absorptionsspektrum von NVOC-Met (0,1 mg/mL) wurde in gepuffertem Wasser (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) gemessen. Das Absorptionsspektrum von DMNP-EDTA (80 µM) und den DMNP-EDTA Metallkomplexen (80 µM DMNP-EDTA, 100 µM $CaCl_2$, $MgCl_2$ oder $CuCl_2$) wurden nach den entsprechenden Belichtungszeiten in gepuffertem Wasser (10 mM MOPS, pH 7) aufgenommen. Zur Darstellung der vollständigen Photolyse wurden die photolabilen Verbindungen so lange bestrahlt, bis keine Änderung der Spektren mehr festzustellen war.

Molare Extinktionskoeffizienten

Zur Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten wurden unterschiedliche DMNP-EDTA-Komplex-Konzentrationen (20 – 140 µM) in gepuffertem Wasser (10 mM MOPS, pH 7) gelöst und die jeweilige Absorption bei einer Wellenlänge von 375nm vermessen. Anschließend wurden die Konzentrationen gegen die Absorption aufgetragen und der molare Extinktionskoeffizienten für die entsprechende Wellenlänge konnte anhand der Steigung der linearen Graphen abgelesen werden.

5.4.2 Fluoreszenzmessungen

Das Fluoreszenzspektrum von DEACM-EDTA wurde mit Hilfe des *Microplate Reader Infinite* M1000 PRO aufgezeichnet. Dazu wurden 0,2 mg/mL DEACM-EDTA in gepuffertem Wasser gelöst (10 mM MOPS Puffer, pH 7). Das Emissionsspektrum wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 515 nm aufgezeichnet. Das Exzitationsspektrum wurde bei einer Emissionswellenlänge von 527 nm vermessen.

5.5 Photolyse von *caged compounds*

Photolyse von NPip-Galaktose

Zur Charakterisierung der Photolyse wurden 5 mM NPip-Galaktose (NPip-Gal) gelöst in SC-Medium mit und ohne Zusatz von *S. cerevisiae* Zellen (OD_{600} = 4) für unterschiedlich lange Zeit bestrahlt und die Konzentration mit Hilfe einer RP-HPLC bestimmt. Das Belichtungssetup bestand aus einer *VL-315.BL* Lampe, ausgestattet mit drei 15 W (365 nm) Schwarzlicht-Quecksilberdampf-Röhren. Die Röhren waren 3 cm über einer *Flowerplate* (m2p-labs GmbH) platziert, welche durch einen *MixMate* Schüttler kontinuierlich durchmischt wurde (1000 UpM). Somit wurde an der Oberfläche der *Wells* eine Bestrahlungsintensität F_0 von 3 mW/cm^2 (λ_{max} = 365 nm) erreicht. Alternativ wurde 1 mL der NPip-Gal-Lösung in einer Quarzküvette mit einem Rührfisch im Lumos 43 (λ_{max} = 375 nm, F_0 = 11 mW/cm^2) unter starkem Rühren bestrahlt. Die RP-HPLC-Analytik zur Bestimmung der NPip-Gal-Konzentration wurde mit einer *Hyperclone 5 µ ODS C18* Säule (125 × 4 mm, Phenomnex Inc.) und einem Laufmittel aus 85 % (*v/v*) Wasser und 15 % (*v/v*) Methanol (Flussrate 1 mL/min, 25 °C) durchgeführt.

Photolyse von DMNP-EDTA ohne Ion und in Komplex mit Cu^{2+} und Ca^{2+}

Zur Charakterisierung der Photolyse wurden 80 µM DMNP-EDTA und ggf. 100 µM $CuCl_2$ bzw. 100 µM $CaCl_2$ in gepuffertem Wasser (10 mM MOPS, pH 7) gelöst und unter starker Durchmischung in einer Quarzküvette für unterschiedlich lange Zeit mit Hilfe des Lumos 43 bei unterschiedlichen Wellenlängen und Bestrahlungsintensitäten belichtet (λ_{max} = 300 nm, F_0 = 1 mW/cm^2; λ_{max} = 375 nm, F_0 = 11 mW/cm^2, λ_{max} = 430 nm, F_0= 30 mW/cm^2). Anschließend wurden Absorptionsspektren aufgenommen (*UV1800 Photometer*) und die Photolyse des DMNP-EDTA ohne Ion und in Komplex mit Cu^{2+} und Ca^{2+} anhand der Änderung bei 370 nm verfolgt. Dazu wurde der Absorptionswert vor Belichtung (Abs_{Start}) der Startkonzentration (c_{Start}) gleichgesetzt und der Absorptionswert nach der vollständigen Photolyse (Abs_{End}) auf eine Konzentration von null gesetzt. (Eine vollständige Photolyse wurde definiert als die Belichtungszeit bei der eine weitere Belichtung keine Veränderung des Spektrums mehr bewirkte). Die Werte dazwischen(c_x) wurden linear Anhand der Absorption (Abs_x) umgerechnet:

$$c_x = \frac{c_{\text{Start}} * (Abs_x - Abs_{End})}{Abs_{Start}}$$

mit c = Konzentration, Abs = Absorption.

Photolyse von DEACM-EDTA

Zur Charakterisierung der Photolyse von DEACM-EDTA wurden 100 µM DEACM-EDTA in gepuffertem Wasser (10 mM MOPS, pH 7) gelöst und unter starker Durchmischung in einer Quarzküvette für unterschiedlich lange Zeit mit Hilfe des Lumos 43 belichtet. Dabei wurden unterschiedliche Wellenlängen und Bestrahlungsintensitäten verwendet: λ_{max} = 300 nm, F_0 = 1 mW/cm^2; λ_{max} = 375 nm, F_0 = 11 mW/cm^2 und λ_{max} = 430 nm, F_0 = 30 mW/cm^2. Die Konzentrationsabnahme des DEACM-EDTA wurde sowohl über die charakteristische Absorptionsabnahme bei 367 nm, als auch über die Zunahme der Fluoreszenzintensität des DEACM (Exzitation: 376 nm, Emission: 494 nm) ermittelt.

Photolyse von NVOC-Met

Zur Charakterisierung der Photolyse wurden 1,75 mM NVOC-Met gelöst in gepuffertem Wasser (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) für unterschiedlich lange Zeit bestrahlt und die Konzentration mit Hilfe von RP-HPLC bestimmt. Das Belichtungssetup war analog zu dem Verfahren zur Photolysebestimmung von NPip-Galaktose aufgebaut. Die RP-HPLC-Analytik zur Bestimmung der NVOC-Met-Konzentration wurde mit einer *Hyperclone 5 µ ODS C18* Säule (125 × 4 mm, Phenomnex Inc.) und einem Laufmittel aus 30 % (*v/v*) Acetonitril und 0,1 % (*v/v*) Essigsäure in Wasser (Flussrate 0,5 mL/min, 25 °C) durchgeführt.

5.5.1 Bestimmung der Photolyse-Quantenausbeuten

Die Photolyse-Quantenausbeuten wurden mit Hilfe der actinometischen Methode bestimmt, dessen Konzept bereits in den 1920er Jahren entwickelt[224] und seit dem vielfach ausgearbeitet wurde.[225–228]

Bestimmung der Lichtintensität

Zur Bestimmung der Photolyse-Quantenausbeute von DMNP-EDTA wurde zunächst die Lichtintensität I_0 in der Bestrahlungsapparatur bestimmt. Dazu wurde folgendes angenommen: Die Quantenausbeute der Photolyse wurde definiert als Anzahl der photolytisch gespaltenen Moleküle dividiert durch die Anzahl absorbierter Photonen.

$$\Phi = \frac{Anzahl\ der\ photolytisch\ gespaltenen\ Moleküle}{Anzahl\ absorbierter\ Photonen}$$

oder

$$\Phi = \frac{-\frac{dK}{dt}}{I_0 * f} \tag{1}$$

Wobei $\frac{dK}{dt}$ (Konzentrationsunterschied pro Zeitunterschied) die Rate der Photolyse, I_0 die einfallende Lichtintensität und f der Anteil des absorbierten Lichtes ist. Folglich kann die Lichtintensität wie folgt berechnet werden:

$$I_0 = -\frac{dK}{dt} * \frac{1}{\Phi} * \frac{1}{f} \tag{2}$$

Der Anteil des absorbierten Lichtes f ist gegeben durch I_0 und die Lichtintensität nach Durchstrahlen der Probe I:

$$f = \frac{I_0 - I}{I_0} = 1 - \frac{I}{I_0} \tag{3}$$

Das Verhältnis des Intensität des einfallenden Lichtes zu der Intensität des Lichtes nach Durchstrahlen der Probe ist gegeben durch das Lambert-Beersche Gesetz mit α als Absorption:

$$\alpha = \log\left(\frac{I}{I_0}\right) \tag{4}$$

$$\left(\frac{I}{I_0}\right) = 10^{\alpha}$$

Somit ergibt die Kombination von (2), (3) und (4) folgende Gleichung:

$$I_0 = -\frac{dK}{dt} * \frac{1}{\Phi} * \frac{1}{1 - 10^{\alpha}} \quad (5)$$

Mittels dieser Gleichung (5) kann die einfallende Lichtintensität I_0 berechnet werden. Die dazu benötigte Quantenausbeute für DMNP-EDTA-Ca^{2+} (= 0,18) wurde der Literatur entnommen.[78] Die Absorption α (= 0,17) und die anfängliche Steigung $\frac{dK}{dt}$ des DMNP-EDTA-Ca^{2+} Photolyse-Verlaufs (= -1,8) wurden dem Photolyse-Experiment (s. Abbildung 20, Kapitel 2.2.3) entnommen. Die Photolyse wurde dazu mittels Absorptionsmessung verfolgt und die Abnahme bei 370 nm durch die exponentielle Funktion (6) interpoliert (Werte s. Tabelle 20, Zeile 1,2 und 3).

$$f(x) = a + b * e^{cx} \quad (6)$$

Die anfängliche Steigung wurde durch die erste Ableitung dieser Funktion zum Zeitpunkt Null ($f'(x0)$) berechnet:

$$f'(x) = c * b * e^{cx}$$
$$f'(0) = c * b * e^{c*0}$$
$$f'(0) = c * b * 1$$
$$f'(0) = c * b$$

Bestimmung des Lichtflusses

Durch die Ermittlung der einfallenden Lichtintensität I_0 konnte nun der Lichtfluss F_0 der verwendeten Lichtquelle durch Einsetzt der Funktion (5) in die Funktion (7) wie folgt berechnet werden:

$$F_0 = \frac{I_0 N_A E_\lambda V}{A} \quad (7)$$

$$F_0 = -\frac{dK}{dt} * \frac{1}{\Phi} * \frac{1}{1 - 10^{-\alpha}} * \frac{N_A E_\lambda V}{A}$$

$$F_0 = 110 \frac{J}{s * m^2} = 11 \frac{W}{cm^2}$$

wobei V das Volumen und A die Fläche sind, welche beleuchtet wurden. N_A ist die Avogadro Konstante und E_λ die Energie eines Photons der Wellenlänge λ mit h als Plank'schem Wirkungsquantum und c als Lichtgeschwindigkeit.

$$E_\lambda = E_{375nm} = \frac{h * c}{375\ nm} = 5{,}30 * 10^{-19}\ J$$

Berechnung Photolyse-Quantenausbeuten

Die Photolyse-Quantenausbeuten von DMNP-EDTA ohne Ion und im Komplex mit Cu^{2+} wurden berechnet durch Umstellung der Gleichung (7):

$$\Phi = -\frac{dK}{dt} * \frac{1}{F_0} * \frac{1}{1 - 10^{-\alpha}} * \frac{N_A E_\lambda V}{A} \qquad (8)$$

Dabei wurden die Werte $\frac{dK}{dt}$ (Photolyserate) und α (Absorption) für den DMNP-EDTA-Cu^{2+}-Komplex und das DMNP-EDTA ohne Ion separat in Photolyse-Experimenten bestimmt. Die Durchführung war dabei analog zum Photolyse-Experiment von DMNP-EDTA-Ca^{2+} (siehe oben „Bestimmung der Lichtintensität I_0").

5.5.2 Bestimmung der Zeit für die halbmaximale photolytische Spaltung

Die Zeit für die halbmaximale photolytische Spaltung gibt wiedergeben, nach welcher Belichtungsdauer die photolytische Spaltung zur Hälfte abgeschlossen war. Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 5.5.1) wurde der Ablauf der Photolyse anhand der Absorptionsabnahme bei 370 nm beobachten. Anschließend wurde die Absorptionsabnahme durch eine exponentielle Funktion interpoliert. Dadurch konnte die Halbwertszeit dieser Funktionen, welche die Zeit für die halbmaximale photolytische Spaltung wiedergibt, wie folgt ermittelt werden:

$$f(x) = a + b * e^{cx} \qquad (9)$$

Die anfängliche Konzentration an DMNP-EDTA bzw. DMNP-EDTA-Cu^{2+} $f(0)$ betrug 80 µM, weshalb die Halbwertszeit $f\left(x_{t_{1/2}}\right)$ definiert wurde als der Zeitpunkt, an dem die Konzentration auf 40 µM gesunken war:

$$f\left(x_{t_{1/2}}\right) = a + b * e^{cx_{1/2}} = 40$$

$$40 - a = b * e^{cx_{1/2}}$$

$$\frac{(40-a)}{b} = e^{cx_{1/2}}$$

$$\ln\left(\frac{(40-a)}{b}\right) = c * x_{1/2}$$

$$\ln\left(\frac{(40-a)}{b}\right) * \frac{1}{c} = x_{1/2}$$

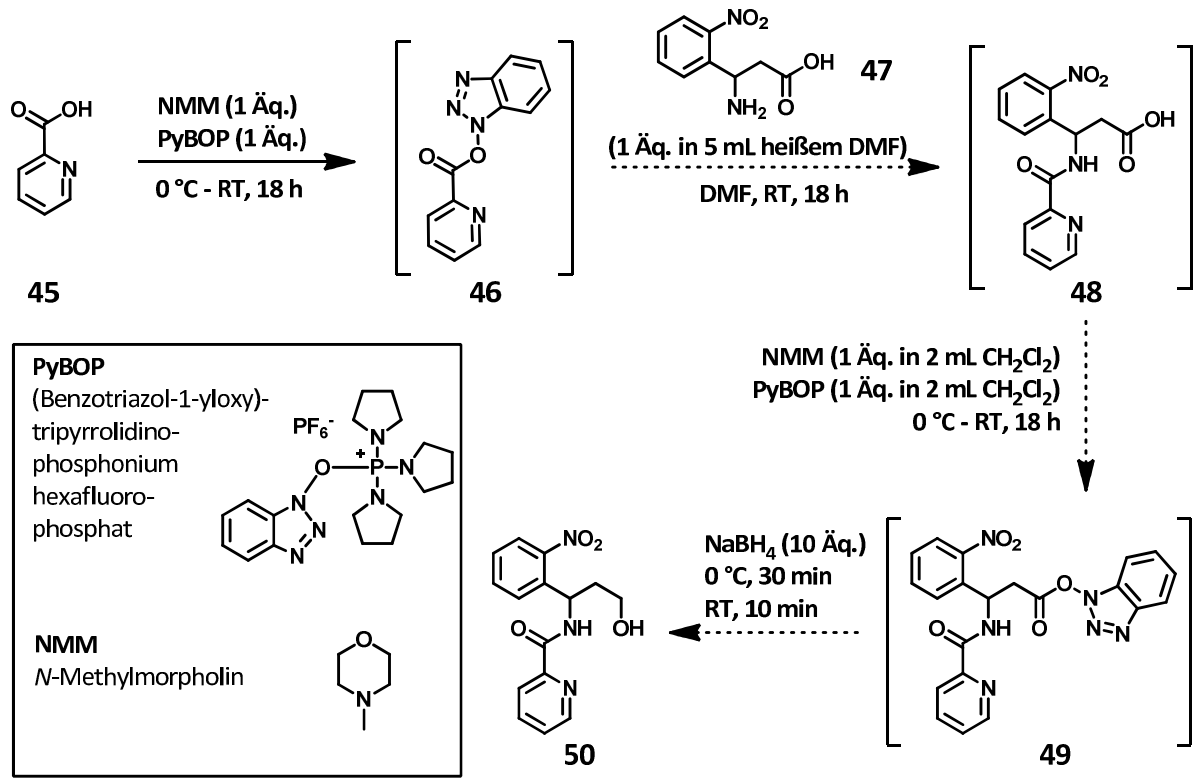
Tabelle 20: Werte zur Berechnung der Photolyse-Quantenausbeuten und der Zeiten für die halbmaximale photolytische Spaltung (t1/2) von DMNP-EDTA ohne Ion und in Komplex mit Cu2+ und Ca2+. Die Werte für a, b und c wurde durch Intepolation der Photolyseverläufe (Kapitel 5.5.1 und Abbildung 20, Kapitel 2.2.3) entnommen.

Nr.	Parameter	Einheit	ohne Ion	Ca^{2+}	Cu^{2+}
1	$\boldsymbol{a}$	$\frac{\mu mol}{L * s}$	5,106	7,838	-6,9
2	$\boldsymbol{b}$	$\frac{\mu mol}{L * s}$	76,303	72,106	87,442
3	$\boldsymbol{c}$	-	-0,031	-0,025	0,0012
4	$\frac{\boldsymbol{dK}}{\boldsymbol{dt}}$	$\frac{\mu mol}{L * s}$	-2,37	-1,80	-0,10
5	**V**	L	0,001	0,001	0,001
6	**A**	m^2	0,00009	0,00009	0,00009
7	$\boldsymbol{N_a}$	mol^{-1}	$6{,}022*10^{23}$	$6{,}022*10^{23}$	$6{,}022*10^{23}$
8	$\boldsymbol{E_\alpha}$	J	5,30	5,30	5,30
9	$\boldsymbol{\alpha}$	-	0,185	0,170	0,190
10	$\boldsymbol{F_0}$	$\frac{J}{s * m^2}$	110	110	110
11	Φ	-	0,22	0,18 (Lit.)[78]	0,01
12	$t_{1/2}$	s	25	32	519

5.6 Synthesen der *caged compounds*

5.6.1 Erste Strategie zur Synthese von 3Gcage (41)

Die Synthese wurde zunächst nach einer adaptierten Vorschrift von Ciesienski *et al.* durchgeführt.[165] Das erste Produkt **50** dieser Synthese konnte jedoch nicht isoliert werden.



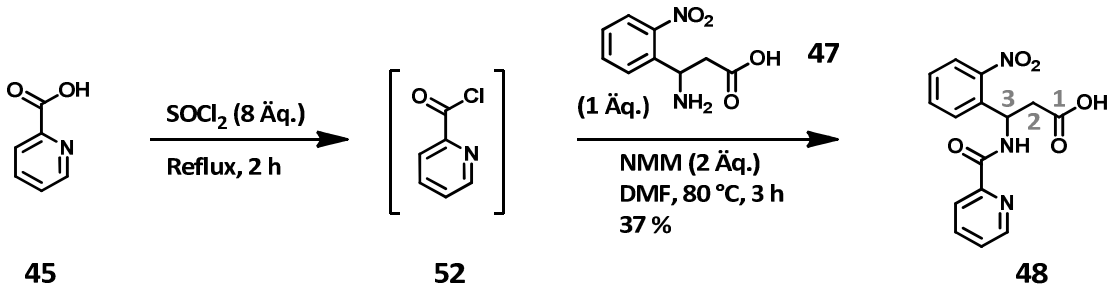
Zunächst wurden äquimolare Mengen Picolinsäure (**45**) (0,4 mmol, 50 mg) und *N*-Methylmorpholin (*N*MM, 0,044 mL, 0,4 mmol) zusammen mit Dichlormethan (2 mL) in einen Rundkolben gegeben. Dieses Gemisch wurde in einem Eisbad gekühlt und anschließend unter starkem Rühren langsam mit Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP, 210 mg, 0,4 mmol) versetzten. Nach vollständiger Zugabe wurde das Gemisch durch Entfernen des Eisbades langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 18 h gerührt. Daraufhin wurde ein Äquivalent 3-Amino-3-(2-nitrophenyl)-propansäure (**47**) (80 mg, 0,4 mmol) gelöst in heißem Dimethylformamid (DMF, 5 mL) zugegeben und für weitere 18 h gerührt. Als nächstes wurde der Reaktionsansatz mittels eines Eisbades gekühlt und erneut äquimolare Mengen *N*MM (0,4 mL, 0,4 mmol) und PyBOP (210 mg, 0,40 mmol), beides separat gelöst in Dichlormethan (2 mL), langsam hinzugefügt. Nach Zugabe wurde das Eisbad entfernt und der

Reaktionsansatz für 18 h gerührt. Für den letzten Schritt wurde erneut eine Kühlung mittels Eisbades verwendet, während Natriumborhydrid ($NaBH_4$, 1,51 g, 4,00 mmol) portionsweise zugegeben wurde. Der Ansatz wurde danach auf Raumtemperatur erwärmt und für 10 min weiter gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (20 mL) gequencht und mit Dichlormethan extrahiert (dreimal 50 mL). Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde mittels Rotationsverdampfer entfernt und ergab 370 mg eines nicht identifizierbaren Produktgemisches.

5.6.2 Zweite Strategie zur Synthese von 3Gcage (41)

3-(2-Nitrophenyl)-3-(picolinamido)-propansäure (38)

Unter inerten Bedingungen wurde ein Gemisch aus Picolinsäure (**45**) (1,00 Äq., 683 mg, 3,3 mmol) und Thionylchlorid (8,00 Äq., 1,89 mL, 26,0 mmol) bei 75 °C unter Reflux 1 h gerührt. Anschließend wurden am Rotationsverdampfer flüchtige Komponenten unter reduziertem Druck aus dem Gemisch entfernt, was zu einem schwarzen Pulver führte. Das so hergestellte Picolinsäurechlorid (**52**) wurde unverzüglich im nächsten Schritt eingesetzt. In einem zweiten parallelen Ansatz wurde unter inerten Bedingungen 3-Amino-3-(2-nitrophenyl)-propansäure (**47**) (1,00 Äq. 460 mg, 3,25 mmol) in heißem DMF (120 °C, 130 mL) gelöst und *N*-Methylmorpholin (2,00 Äq, 0,72 mL, 6,50 mmol) bei stetigen Rühren zugegeben. Nach 5 min wurde das zuvor hergestellte Picolinsäurechlorid (**42**) (1,00 Äq., 460 mg, 3,25 mmol) schrittweise zugegeben und für 3 h bei 80 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter Zugabe von Toluol als azeotropes Gemisch mittels Rotationsverdampfer entfernt. Das entstandene zähflüssige braune Öl wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE, 20:80 + 0,5 % TFA) und ergab Verbindung **48** als gelblichen Feststoff in 23 % Ausbeute (420 mg, 0,75 Äq.). Die spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur überein.[166]



R_f: 0,32 (PE/EE, 20:80 + 0,5 % TFA);

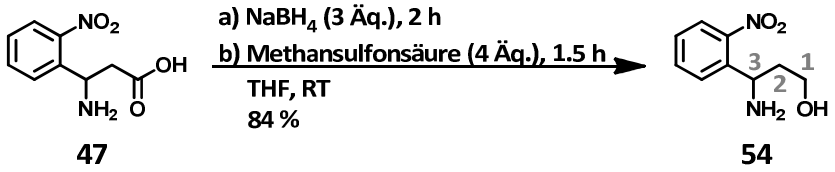
^{1}H NMR (600 MHz, Methanol-d_4) δ (ppm) = 8,68 (d, *J* = 4,6 Hz, 1 H, Ph/Py), 8,01 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,99 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,94 (td, *J* = 7,7, 1,5 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,77 (t, *J* = 7,4 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,66 (t, *J* = 7,6 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,57 (dd, *J* = 7,0, 5,4 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,53 - 7,48 (m, 1 H, Ph/Py), 6,01 (dd, $^3J_{3,2a}$ = 8,5, $^3J_{3,2b}$ = 4,5 Hz, 1 H, 3-H), 3,11 (dd, $^2J_{2a,2b}$ = 16,5 Hz, $^3J_{2a,3}$ = 8,5 Hz, 1 H, 2-H_a), 3,05 (dd, $^2J_{2b,2a}$ = 16,5 Hz, $^3J_{2b,3}$ = 4,5 Hz, 1 H, 2-H_b).

5.6.3 Dritte Strategie zur Synthese von 3Gcage (41)

3-Amino-3-(2-nitrophenyl)-1-propanol (54)

3-Amino-3-(2-nitrophenyl)-propansäure (**47**) (1,00 Äq., 5,00 g, 23,7 mmol) wurde für 10 min in THF (50 mL) suspendiert. Anschließend wurde Natriumborhydrid (3,00 Äq., 560 mg, 74,0 mmol) schrittweise zugegeben und für 2 h gerührt. Der entstandenen braunen Suspension wurde danach ein Gemisch aus Methansulfonsäure (4,00 Äq., 6,76 g, 104 mmol) und THF (125 mL) vorsichtig portionsweise zugegeben und für 1,5 h weitergerührt. Die Reaktion wurde mit viel Wasser gequencht bis eine klare braune Lösung entstand und auf einen pH von 9-10 mit Natriumhydroxid eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Alle organischen Phasen wurden vereinigt und unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer eingeengt, wodurch ein gelber Feststoff zurückblieb. Dieser wurde in Wasser gegeben (brauner Niederschlag) und der pH auf 2 mit Hilfe von konzentrierter Salzsäure eingestellt. Anschließend wurde der pH-Wert wieder auf einen Wert von 9 mittels Natriumhydroxid eingestellt und der Ansatz filtriert. Danach wurde die wässrige Lösung dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert, mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und mittels Rotationsverdampfer konzentriert. Dadurch ergab sich ein dickflüssiges braunes Öl. Die anschießende säulenchromatographische Reinigung

(CH_2Cl_2/MeOH, 87:13) ergab Verbindung **54** in 84 % Ausbeute (3,92 g, 19,9 mmol) als leicht gelben Feststoff.



47 **54**

R_f: 0,18 (CH_2Cl_2/MeOH, 87:15);

IR (ATR Film): $\tilde{\nu}$ = 3366, 3280, 2940, 2866, 1606, 1576, 1473, 1523, 1443, 1346, 1300, 1190, 1166, 1056, 853, 783, 743 cm^{-1};

^{1}H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 7,82 (dd, *J* = 8,1, 1,3 Hz, 1 H, Ph), 7,67 (dd, *J* = 7,9, 1,5 Hz, 1 H, Ph), 7,63 (td, *J* = 7,5, 1,3 Hz, 1 H, Ph), 7,40 (ddd, *J* = 8,4, 7,2, 1,6 Hz, 1 H, Ph), 4,59 (dd, $^3J_{3,2a}$ = 9,7 Hz, $^3J_{3,2b}$ = 3,4 Hz, 1 H, 3-H), 3,88 (ddd, $^2J_{1a,1b}$ = 11,1 Hz, $^3J_{1a,2a}$ = 8,8 Hz, $^3J_{1a,2b}$ = 3,4 Hz, 1 H, 1-H_a), 3,83 (ddd, $^2J_{1b,1a}$ = 11,1 Hz, $^3J_{1b,2b}$ = 5,2 Hz, $^3J_{1b,2a}$ = 4,1 Hz, 1 H, 1-H_b), 2,02 (dddd, $^2J_{2a,2b}$ = 14,0 Hz, $^3J_{2a,3}$ = 9,7 Hz, $^3J_{2a,1a}$ = 8,8 Hz, $^3J_{2a,1b}$ = 4,1 Hz, 1 H, 2-H_a), 1,91 (dddd, $^2J_{2b,2a}$ = 14,3 Hz, $^3J_{2b,1b}$ = 5,2 Hz, $^3J_{2b,3}$ = 3,4 Hz, $^3J_{2b,1a}$ = 3,4 Hz, 1 H, 2-H_b);

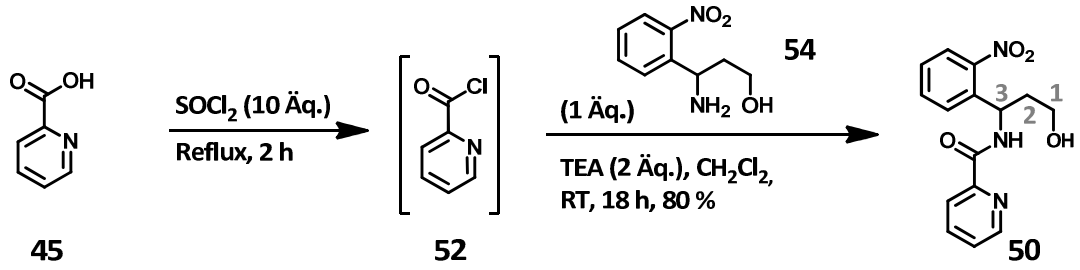
^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 148,6 (Ph), 140,5 (Ph), 133,4 (Ph), 128,0 (Ph), 127,5 (Ph), 124,4 (Ph), 62,3 (C-3), 51,3 (C-1), 38,6 (C-2);

HRMS (FTMS + p ESI): m/z berechnet für $(C_9H_{13}N_2O_3)^+$: 197,0921, gefunden: 197,0918.

3-(2-Nitrophenyl)-3-(picolinamido)-1-propanol (50)

Unter inerten Bedingungen wurde ein Gemisch aus Picolinsäure (**45**) (1,00 Äq., 145 mg, 1,4 mmol) und Thionylchlorid (10,00 Äq., 989 mg, 13,6 mmol) 2 h refluxiert und anschließend unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer eingeengt. Das entstandene Picolinsäurechlorid (**52**) wurde unverzüglich weiterverwendet. In einem parallelen Ansatz wurden unter inerten Bedingungen 3-Amino-3-(2-nitrophenyl)-propansäure (**54**) (1,00 Äq., 100 mg, 0,50 mmol) und Triethylamin (2,00 Äq., 142 µL, 1,02 mmol) in trockenem Dichlormethan (5,00 mL) gelöst und im Eisbad gekühlt. Danach wurde das frisch hergestellte Picolinsäurechlorid (**52**) (2,00 Äq., 144 mg, 1,02 mmol), gelöst in trockenem Dichlormethan (1 mL), langsam zugetropft. Anschließend wurde die Reaktion 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandene klare braune Lösung wurde säulenchromatographisch gereinigt

(PE/EE, 70:30) und ergab Verbindung **50** in 80 % Ausbeute (123 mg, 0,41 mmol) als gelblichen Feststoff. Die spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur überein.[166]



R_f: 0,25 (PE/EE, 70:30);

IR (ATR Film): $\tilde{\nu}$ = 3360, 2906, 1590, 1566, 1663, 1516, 1463, 1433, 1353, 1300, 1240, 1063, 856, 820, 783, 743, 703, 696, 676 cm^{-1};

^{1}H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 9,03 (d, $^3J_{NH,3}$ = 8,2 Hz, 1 H, NH), 8,58 (d, *J* = 4,5 Hz, 1 H, Ph/Py), 8,14 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H ,Ph/Py), 7,94 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,83 (dt, *J* = 7,7, 1,7 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,66 (d, *J* = 7,5 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,60 (t, *J* = 7,5 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,48–7,39 (m, 2 H, Ph/Py), 5,85 (ddd, $^3J_{3,2a}$ = 9,6, $^3J_{3,NH}$ = 8,1, $^3J_{3,2b}$ = 4,3 Hz, 1 H,3-H), 3,80 (m, 2 H, 1-H), 2,62 (s, 1 H, OH), 2,28 (ddt, $^2J_{2a,2b}$ = 13,9 Hz, $^3J_{2a,3}$ = 9,6 Hz, $^3J_{2a,1}$ = 4,7 Hz, 1 H, 2-H_a), 2,14 (ddt, $^2J_{2b,2a}$ = 10,1 Hz, $^3J_{2b,1}$ = 8,1 Hz, $J_{2b,3}$ = 4,3 Hz, 1 H, 2-H_b);

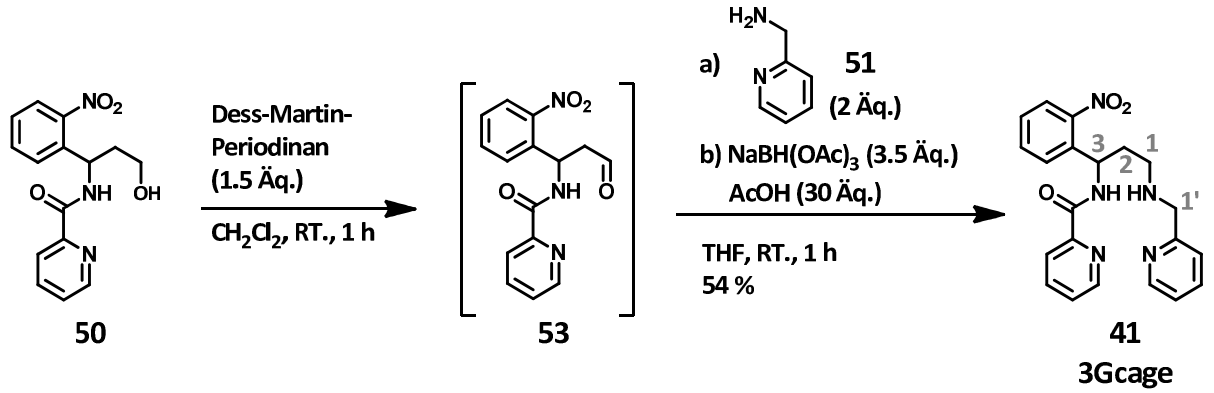
^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 164,5 [C(O)NH], 149,3 (Ph/Py), 149,0 (Ph/Py), 148,3 (Ph/Py), 137,4 (Ph/Py), 136,8 (Ph/Py), 133,5 (Ph/Py), 129,3 (Ph/Py), 128,4 (Ph/Py), 126,5 (Ph/Py), 125,1 (Ph/Py), 122,5 (Ph/Py), 59,5 (C-1), 48,3 (C-3), 37,6 (C-2);

HRMS (FTMS + p ESI): m/z berechnet für $(C_{15}H_{16}N_3O_4)^+$: 302,1135 und für $(C_{15}H_{15}N_3O_4Na)^+$: 324,0960, gefunden: 302,1132 und 324,0951.

N-{1-(2-Nitrophenyl)-3-[(pyridin-2-ylmethyl)amino]propyl}picolinamid (41) (3gcage)

3-(2-Nitrophenyl)-3-(picolinamido)-1-propanol (**50**) (1,00 Äq., 1,00 g, 3,32 mmol) wurde in trockenem Dichlormethan unter leichtem Erwärmen gelöst, anschließend mit *Dess-Martin*-Periodinan (1,50 Äq., 2,11 g, 4,98 mmol) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bis die Vollständigkeit der Reaktion mittels NMR nachvollzogen werden konnte. Anschließend wurde die Reaktion mit Natriumhydrogencarbonat und Dichlormethan basisch extrahiert, alle organischen Phasen vereinigt und unter reduziertem Druck am

Rotationsverdampfer eingeengt. Der braune Feststoff wurde über eine Kieselgel-Filtersäule (1 cm Durchmesser, 5 cm Höhe) mit Dichlormethan gespült. Der erhaltene 3-(2-Nitrophenyl)-3-(picolinamido)-1-propanaldehyd (**53**) wurde unverzüglich im Folgenden eingesetzt. Dazu wurde Aldehyd **53** (1,00 Äq., 993 mg, 3,32 mmol) in trockenem THF (30 mL) unter leichtem Erwärmen gelöst und mit 2-Aminoethylpyridin (**51**) (2,00 Äq., 684 µL, 6,64 mmol) versetzt. Nach 15 min Rühren war das Ausfallen eines Feststoffes zu beobachten. Anschließend wurde der Ansatz mit Eisessig (30,00 Äq., 5,698 mL, 99,54 mmol) versetzt, wodurch sich der Feststoff teilweise wieder löste. Danach wurde schrittweise Natriumtriacetoxyborhydrid (3,50 Äq., 2,46 g, 11,6 mmol) zugegeben und der Ansatz 1 h bei Raumtemperatur gerührt bis zur vollständigen Klärung der Lösung. Im Folgenden wurde Natriumbicarbonat-Lösung (135 mL) zugebeben und für 15 min weiter gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration und Konzentration mittels Rotationsverdampfer ergab sich ein dickflüssiges braunes Öl. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung (CH_2Cl_2/MeOH, 95:5) ergab Verbindung **51** (3Gcage) in 54 % Ausbeute (701 mg, 1,79 mmol) als gelblichen Feststoff.



50 **53** **41** **3Gcage**

R_f: 0,19 (CH_2Cl_2/MeOH, 95:5);

^{1}H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 9,49 (d, $^3J_{NH,3}$ = 7,6 Hz, 1 H, C(O)NH), 8,50 (d, *J* = 4,8 Hz, 1 H, Ph/Py), 8,48 (d, *J* = 4,6 Hz, 1 H, Ph/Py), 8,08 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,92 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,79 (t, *J* = 7,6 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,66 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,63 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,54 (t, *J* = 7,6 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,40 (t, *J* = 6,6 Hz, 2 H, Ph/Py), 7,37 (t, *J* = 7,7 Hz, 1 H, Ph/Py), 7,17 (t, 1 H, Ph/Py), 5,78 (td, $^3J_{3,NH}$ = 7,6 Hz, $^3J_{3,2}$ = 4,5 Hz, 1 H, 3-H), 4,08 (d, $^2J_{1'a,1'b}$ = 14,2 Hz, 1 H, 1'-H_a), 4,03 (d, $^2J_{1'b,1'a}$ = 14,2 Hz, 1 H, 1-H_b), 3,02 (m, 1 H, 1-H_a), 2,96 (m, 1 H, H-1b), 2,37 (m, 1 H, 2-H_a), 2,30 (m, 1 H, 2-H_b);

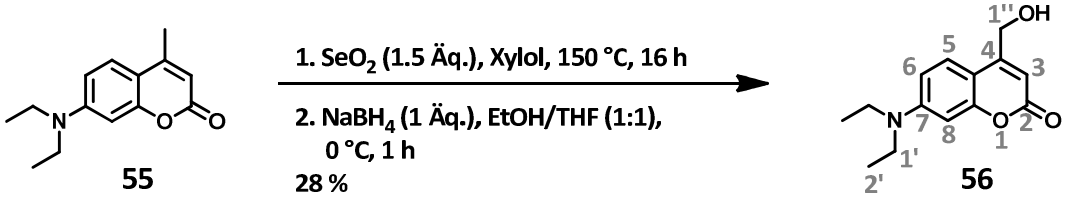
^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 164,4 [C(O)NH], 149,6 (Ph/Py), 149,2 (Ph/Py), 148,8 (Ph/Py), 148,5 (Ph/Py), 148,2 (Ph/Py), 137,8 (Ph/Py), 137,3 (Ph/Py), 136,8, 133,5 (Ph/Py), 128,7 (Ph/Py), 128,1 (Ph/Py), 126,3 (Ph/Py), 124,9 (Ph/Py), 122,7 (Ph/Py), 122,5 (Ph/Py), 122,3 (Ph/Py), 53,8 (C-1‘), 49,1 (C-3), 46,0 (C-1), 34,1 (C-2);

HRMS (FTMS + p ESI): m/z berechnet für $(C_{21}H_{22}N_5O_3)^+$: 392,1717, gefunden: 392,1714.

5.6.4 Synthese von DEACM-EDTA (*caged*-EDTA, 58)

7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-cumarin (56)

In einem inerten Rundkolben mit Rückflusskühlung wurde 7-Dimethylamino-4-methylcumarin (**55**) (1,00 Äq., 5,00 g, 21,6 mmol) zugegeben und in trockenem, frisch destilliertem Xylol (38 mL) unter Hitze (120 °C) gelöst. Anschließend wurde Seleniumdioxid (1,50 Äq., 3,50 g, 32,4 mmol) zugegeben und 16 h refluxiert (150 °C). Danach wurde der entstandene schwarze Feststoff durch Filtration abgetrennt, mit heißem Xylol nachgespült und das Lösungsmittel mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Der dickflüssige dunkelbraune Rückstand wurde in einem trockenen Gemisch aus Methanol und THF [1:1 (*v*:*v*), 38 mL] gelöst und Natriumborhydrid (1,00 Äq., 0,818 g, 21,62 mmol) wurde langsam zugegeben. Nach 1 h Rühren wurde vorsichtig mit Salzsäure (1 mol/L) gequencht und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde der dickflüssige dunkelbraune Rückstand in Dichlormethan gelöst, filtriert und dreimal mit sehr viel gesättigter Natriumcarbonat-Lösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die darauffolgende säulenchromatographische Reinigung (CH_2Cl_2/MeOH, 96:4) wurde zweifach durchgeführt, wobei auf das Kieselgel zusätzlich eine 0,5 cm dicke Aluminiumoxid-Schicht aufgetragen wurde. Das Produkt **56** wurde nach zweifacher säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 28 % (1,34 g, 5,41 mmol) als



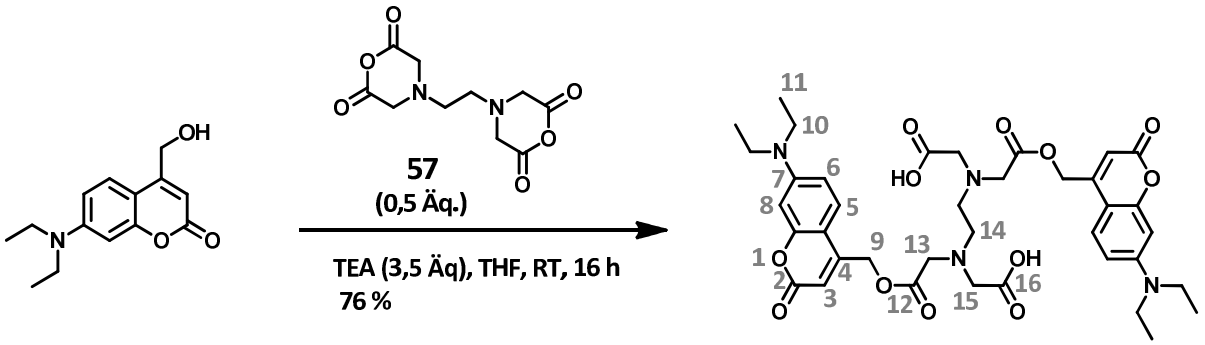
R_f: 0,31 (CH_2Cl_2/MeOH, 96:4);

^{1}H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 7,31 (d, $^3J_{5,6}$ = 90 Hz, 1 H, 5-H), 6,55 (dd, $^3J_{6,5}$ = 9,0 Hz, $^4J_{6,8}$ = 2,6 Hz, 1 H, 6-H), 6,48 (d, $^4J_{8,6}$ = 2,6 Hz, 1 H, 8-H), 6,26 (s, 1 H, 3-H), 4,82 (s, 2 H, 1‘‘-H), 3,39 (q, $^3J_{1',2'}$ = 7,1 Hz, 4 H, 1‘-H), 1,19 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7,1 Hz, 6 H, 2‘-H).

^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 162,7, 156,1, 154,9, 150,5, 124,4 (C-5), 108,6 (C-6), 106,3, 105,4 (C-3), 97,7 (C-8), 61,0 (C-1‘‘), 44,7 (C-1‘), 12,5 (C-2‘).

1,2-Diaminoethan-N,N'-di(7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-cumarinyl)acetat-N,N'-diessigsäure (*caged*-EDTA, 58)

Unter inerten Bedingungen wurde 7-Diethylamino-4-hydroxymethyl-cumarin (**56**) (2,00 Äq., 200 mg, 0,81 mmol) und Triethylamin (3,50 Äq., 143 mg, 1,42 mmol) in trockenem THF (25 mL) vorgelegt. Anschließend wurde Ethylendiamintetraessigsäure-Dianhydrid (EDTA-Anhydrid, **57**) (1 Äq., 103 mg, 0,40 mmol) zugegeben und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Reaktionsansatz unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer eingeengt und ergab das Produkt **58** (*caged*-EDTA) mit leichten Verunreinigungen in 76 % Ausbeute (292 mg, 0,38 mmol) als schwach gelblichen Feststoff. Weitere Reinigungen mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, Aluminiumoxid, MPLC-RP-C18) führten zur Zersetzung des Produktes.



56 **58**
DEACM-EDTA
(caged-EDTA)

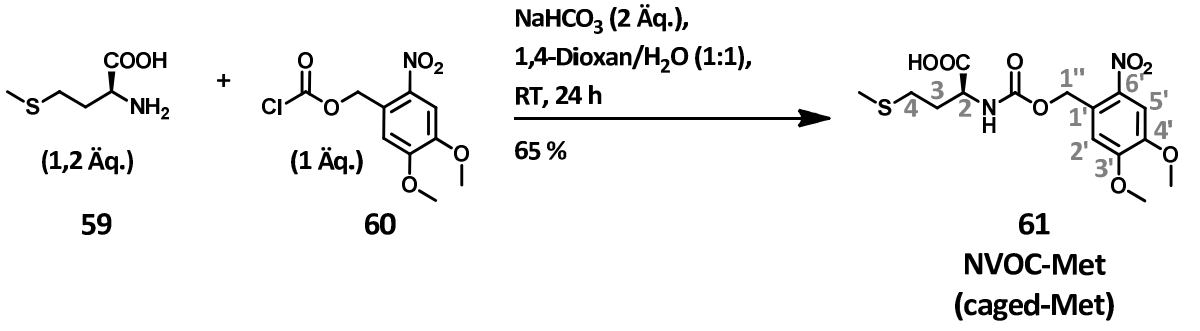
^{1}H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 7,28 (d, $^3J_{5,6}$ = 9,0 Hz, 2 H, 5-H), 6,58 (dd, $^3J_{6,5}$ = 9,0 Hz, $^4J_{6,8}$ = 2,6 Hz, 2 H, 6-H), 6,48 (d, $^4J_{8,6}$ = 2,6 Hz, 2 H, 8-H), 6,08 (s, 2 H, 4-H), 5,24 (s, 4 H, 9-H), 3,80 (s, 4 H,15-H), 3,50 (s, 4 H, 13-H), 3,05 (q, $^3J_{10,11}$ = 7,3 Hz, 8 H, 10-H), 2,97 (s, 4 H, 14-H), 1,25 (t, $^3J_{11,10}$ = 7,3 Hz, 12 H,11-H);

^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 174,6, 170,3, 161,9, 156,2, 150,7, 149,2, 124,5 (C-5), 108,8 (C-6), 108,5, 106,5 (C-3), 97,7 (C-8), 61,5 (C-9), 56,5 (C-13), 55,2 (C-15), 51,9 (C-14), 45,2 (C-10), 8,6 (C-11).

5.6.5 Synthesen von NVOC-Met (*caged*-Met, 61)

Die Synthese von (*S*)-*N*-(4,5-Dimethyl-2-nitrobenzyl-oxycarbonyl)-methionin (NVOC-Met, **51**) wurde mittels einer modifizierten Methode nach Chen *et al.*, ursprünglich entwickelt für die Synthese von (*S*)-*N*-(4,5-Dimethyl-2-nitrobenzyl-oxycarbonyl)-threonin, durchgeführt.[84]

Dabei wurden L-Methionin (**59**) (1,00 Äq., 3,02 mmol, 451 mg) und (2,00 Äq., 6,05 mmol, 508 mg) Natriumhydrogencarbonat in Dioxan/Wasser [24 ml 1:1 (*v*/*v*)] vorgelegt und (2 Äq., 3,63 mmol, 1,00 g) 6-Nitroveratryloxycarbonyl Chlorid (**60**) unter starkem Rühren langsam zugegeben. Nach 24 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurden 24 mL Chloroform zugegeben und die organische Phase verworfen. Der pH-Wert der wässrigen Phase wurde mit verdünnter Schwefelsäure auf einen Wert von 4 eingestellt. Anschließend wurde diese dreimal mit 60 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und mittels Rotationsverdampfer konzentriert. Das Konzentrat wurde säulenchromatographisch mit einem Gemisch aus Petrolether (40 - 60 °C) und Essigsäureethylester (PE/EE 45:55) (versetzt mit 0,5 % TFA) gereinigt und ergab Verbindung **61** (NVOC-Met) in einer Ausbeute von 65 % (778 mg, 2,00 mmol) als ein leicht gelbes Pulver.



R_f: 0,29 (PE/EE, 45:55 + 0,5 % TFA); **Schmelzpunkt**: 142,2 °C; $[\alpha]_{20}^{D}$ = + 1,8 (c = 0,98, CH_2Cl_2);

IR (ATR Film): $\tilde{\nu}$ = 3313, 2922, 1682, 1582, 1518, 1424, 1381, 1325, 1271, 1221, 1078, 1064, 872, 795, 755 cm^{-1};

^{1}H NMR (600 MHz, Methanol-d_4) δ (ppm) = 7,77 (s, 1 H, 3'-H), 7,21 (s, 1 H, 6'-H), 5,56 (d, $^{4}J_{1''a,6'}$ = 15,5 Hz, 1 H, 1''-H_a), 5,44 (d, $^{4}J_{1''b,6'}$ = 15,3 Hz, 1 H, 1''-H_b), 4,36 (dd, $^{3}J_{2,3a}$ = 9,4, $^{3}J_{2,3b}$ =

4,4 Hz, 1 H, 2-H), 3,99 (s, 3 H, OMe), 3,92 (s, 3 H, OMe), 2,68 - 2,61 (m, 2 H, 4-H_a), 2,60 - 2,54 (m, 1 H, 4-H_b), 2,20 - 2,12 (m, 1 H, 3-H_a), 2,10 (s, 3 H, SMe), 2,00 - 1,93 (m, 1 H, 3-H_b);

^{13}C NMR (151 MHz, Methanol-d_4): δ (ppm) = 175,5 (COOH), 158,3 [NH(CO)], 155,4 (C-1'), 149,4 (C-2'), 140,5 (C-4'), 129,9 (C-5'), 110,6 (C-6'), 109,2 (C-3'), 64,5 (C-1''), 57,0 (OMe), 56,8 (OMe), 54,2 (C-2), 32,0 (C-4), 31,3 (C-3), 15,2 (SMe);

HRMS (FTMS + p ESI): m/z berechnet für $(C_{15}H_{20}O_8N_2SNa)^+$: 411,0833, gefunden: 411,0831.

Abkürzungsverzeichnis

3Gcage	*N*-{1-[2-Nitrophenyl]-3-[(pyridin-2-ylmethyl)amino]propyl}picolinamid
3G-c*aged*-Cu^{2+}	*N*-{1-[2-Nitrophenyl]-3-[(pyridin-2-ylmethyl)amino]propyl}picolinamid -Cu2+ Komplex
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Äq.	Äquivalent
A.U.	arbitrary units, willkürlichen Einheit
CHO- Zellen	*Chinese Hamster Ovary* Zellen
DEACM-EDTA	1,2-Diaminoethane-*N*,*N*‘-essigsäure-(7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)coumaryl)-ester-*N*,*N*‘-diessigsäure
DNA	*Deoxyribonucleic acid,* Desoxyribonukleinsäure
DMNP-EDTA	(1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)-1,2-diaminoethane-*N,N,N‘,N‘-t*etraessigsäure)
DMNP-EDTA-$^{Cu2+}$	(1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)-1,2-diaminoethane-*N,N,N‘,N‘-t*etraessigsäure)Cu^{2+} Komplex
DMNP-EDTA-$^{Ca2+}$	(1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)-1,2-diaminoethane-*N,N,N‘,N‘-t*etraessigsäure)Ca^{2+} Komplex
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC50	*half maximal effective concentration* / mittlere effektive Konzentration
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N‘,N‘*-tetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
et al.	*et alia*, und andere
EtOH	Ethanol

EUROSCARF	*european Saccharomyces cerevisiae archive for functional analysis*
GM-CSF	*granulocyte macrophage colony stimulating factor*
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IDA	*Imminodiacetic acid*, Imminodiessigsäure
IPTG	Isopropyl –β-*D*-thiogalactopyranosid
HPV	Humane Papillomviren
KP_i	Kaliumphosphat
mRNA	*messenger ribonucleic acid,* Boten-Ribonukleinsäure
Met	Methionin
MeOH	Methanol
MES	2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure
NMM	*N*-Methylmorpholin
MOPS	3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure
MPLC	*Medium pressure liquid chromatography*
n.d.	*not determined,* nicht bestimmt
NMR	*nuclear magnetic resonance*
NPip-Gal	6-Nitropiperonyl *β-D*-galactopyranosid
NVOC-Met	Nitroveratryloxycarbonyl-methionin, (*S*)-*N*-(4,5-dimethyl-2-nitrobenzyl-oxycarbonyl)-methionin
OD_{600}	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
pCUP1	*CUP1* Promotor
PCR	*polymerase chain reaction*
PDGF	*platelet-derived growth factor*
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
pGAL1	*GAL1* Promotor
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PLA	*Polylactic acid*, Polymilchsäure
pMET17	*MET17* Promotor

PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
Ref.	Referenz
RP-HPLC	Reversed phase - high performance liquid chromatography
RT	Raumtemperatur
SAM	*S*-Adenosylmethionin
S. c.	*Saccharomyces cerevisiae*
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
$t_{1/2}$	Bestrahlungszeiten für die halbmaximale photolytische Spaltung
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP-Glukose	Uridylyl-Glukose
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	*volume per volume*, Volumen pro Volumen
w/o	*without,* ohne
w/v	*weight per volume*, Gewicht pro Volumen
w/w	*weight per weight*, Gewicht pro Gewicht

Literaturverzeichnis

(1) Serrano, L. Synthetic Biology: Promises and Challenges. *Mol. Syst. Biol.* **2007**, *3*, 158.

(2) Ideker, T.; Galitski, T.; Hood, L. A New Approach to Decoding Life: Systems Biology. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2001**, *2*, 343–372.

(3) Wendisch, V. F.; Bott, M.; Eikmanns, B. J. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for Biotechnological Production of Organic Acids and Amino Acids. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 268–274.

(4) Wirsching, S.; Ding, S.; Röbig, B. *The German Biotechnology Sector Facts & Figures, 2017*; BIOCOM AG: Berlin, Germany, 2017.

(5) Lee, S. Y.; Kim, H. U.; Park, J. H.; Park, J. M.; Kim, T. Y. Metabolic Engineering of Microorganisms: General Strategies and Drug Production. *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 78–88.

(6) Brooks, M. B. 100 Best-Selling, Most Prescribed Branded Drugs Through June. *Medscape* **2015**.

(7) Lee, J. W.; Kim, H. U.; Choi, S.; Yi, J.; Lee, S. Y. Microbial Production of Building Block Chemicals and Polymers. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 758–767.

(8) Okino, S.; Noburyu, R.; Suda, M.; Jojima, T.; Inui, M.; Yukawa, H. An Efficient Succinic Acid Production Process in a Metabolically Engineered *Corynebacterium glutamicum* Strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 459–464.

(9) Qian, Z.-G.; Xia, X.-X.; Lee, S. Y. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the Production of Putrescine: A Four Carbon Diamine. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *104*, 651–662.

(10) Buschke, N.; Schäfer, R.; Becker, J.; Wittmann, C. Metabolic Engineering of Industrial Platform Microorganisms for Biorefinery Applications – Optimization of Substrate Spectrum and Process Robustness by Rational and Evolutive Strategies. *Bioresour. Technol.* **2013**, *135*, 544–554.

(11) Jung, Y. K.; Kim, T. Y.; Park, S. J.; Lee, S. Y. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the Production of Polylactic Acid and Its Copolymers. *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *105*, 161–171.

(12) Lee, J.-Y.; Na, Y.-A.; Kim, E.; Lee, H.-S.; Kim, P. The Actinobacterium *Corynebacterium glutamicum* , an Industrial Workhorse. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *26*, 807–822.

(13) Zhang, D.; Guan, D.; Liang, J.; Guo, C.; Xie, X.; Zhang, C.; Xu, Q.; Chen, N. Reducing Lactate Secretion by LdhA Deletion in L-Glutamate- Producing Strain *Corynebacterium glutamicum* GDK-9. *Braz. J. Microbiol.* **2014**, *45*, 1477–1483.

(14) Becker, J.; Zelder, O.; Häfner, S.; Schröder, H.; Wittmann, C. From Zero to Hero—Design-Based Systems Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for l-Lysine Production. *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 159–168.

(15) Coyle, W. T. *Next-Generation Biofuels: Near-Term Challenges and Implications for Agriculture*; DIANE Publishing, 2010.

(16) Ban, J.; Arellano, L.; Alawami, A.; Aguilera, R. F.; Tallett, M. *2016 OPEC World Oil Outlook*; Organization of the Petroleum Exporting Countries, 2016.

(17) Cobuloglu, H. I.; Büyüktahtakın, İ. E. Food vs. Biofuel: An Optimization Approach to the Spatio-Temporal Analysis of Land-Use Competition and Environmental Impacts. *Appl. Energy* **2015**, *140*, 418–434.

(18) Caspeta, L.; Buijs, N. A. A.; Nielsen, J. The Role of Biofuels in the Future Energy Supply. *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6*, 1077–1082.

(19) *Advancing Technology for America's Transportation Future*; National Petroleum Council-US Department of Energy; Library of Congress Control Number: 2012950513: United Stated of America, 2012.

(20) Buijs, N. A.; Siewers, V.; Nielsen, J. Advanced Biofuel Production by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 480–488.

(21) Steen, E. J.; Chan, R.; Prasad, N.; Myers, S.; Petzold, C. J.; Redding, A.; Ouellet, M.; Keasling, J. D. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the Production of N-Butanol. *Microb. Cell Factories* **2008**, *7*, 36.

(22) Lee, W.-H.; Seo, S.-O.; Bae, Y.-H.; Nan, H.; Jin, Y.-S.; Seo, J.-H. Isobutanol Production in Engineered *Saccharomyces cerevisiae* by Overexpression of 2-Ketoisovalerate Decarboxylase and Valine Biosynthetic Enzymes. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2012**, *35*, 1467–1475.

(23) Chen, X.; Nielsen, K. F.; Borodina, I.; Kielland-Brandt, M. C.; Karhumaa, K. Increased Isobutanol Production in *Saccharomyces cerevisiae* by Overexpression of Genes in Valine Metabolism. *Biotechnol. Biofuels* **2011**, *4*, 21.

(24) Brat, D.; Weber, C.; Lorenzen, W.; Bode, H. B.; Boles, E. Cytosolic Re-Localization and Optimization of Valine Synthesis and Catabolism Enables Increased Isobutanol Production with the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*, 65.

(25) Ubersax, J. A.; Platt, D. M. United States Patent Application: 0100311065 - Genetically Modified Microbes Producing Isoprenoids. 20100311065A1, December 9, 2010.

(26) Renninger, N. S.; Newman, J.; Rolling, K. K.; Regentin, R.; Paddon, C. J. United States Patent Application: 0080274523 - Production of Isoprenoids. 20080274523A1, February 9, 2010.

(27) Peralta-Yahya, P. P.; Ouellet, M.; Chan, R.; Mukhopadhyay, A.; Keasling, J. D.; Lee, T. S. Identification and Microbial Production of a Terpene-Based Advanced Biofuel. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 483.

(28) Shi, S.; Valle-Rodríguez, J. O.; Khoomrung, S.; Siewers, V.; Nielsen, J. Functional Expression and Characterization of Five Wax Ester Synthases in *Saccharomyces cerevisiae* and Their Utility for Biodiesel Production. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*, 7.

(29) Bernabeu, E.; Cagel, M.; Lagomarsino, E.; Moretton, M.; Chiappetta, D. A. Paclitaxel: What Has Been Done and the Challenges Remain Ahead. *Int. J. Pharm.* **2017**, *526*, 474–495.

(30) Leistner, E. Die Biologie Der Taxane: Arzneimittel Aus Der Natur. *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, *34*, 98–103.

(31) Minami, H.; Kim, J.-S.; Ikezawa, N.; Takemura, T.; Katayama, T.; Kumagai, H.; Sato, F. Microbial Production of Plant Benzylisoquinoline Alkaloids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 7393–7398.

(32) Asadollahi, M. A.; Maury, J.; Møller, K.; Nielsen, K. F.; Schalk, M.; Clark, A.; Nielsen, J. Production of Plant Sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of ERG9 Repression on Sesquiterpene Biosynthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 666–677.

(33) Ro, D.-K.; Paradise, E. M.; Ouellet, M.; Fisher, K. J.; Newman, K. L.; Ndungu, J. M.; Ho, K. A.; Eachus, R. A.; Ham, T. S.; Kirby, J.; *et al.* Production of the Antimalarial Drug Precursor Artemisinic Acid in Engineered Yeast. *Nature* **2006**, *440*, 940–943.

(34) DeJong, J. M.; Liu, Y.; Bollon, A. P.; Long, R. M.; Jennewein, S.; Williams, D.; Croteau, R. B. Genetic Engineering of Taxol Biosynthetic Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 212–224.

(35) Yasuaki, Wada; Kobayashi, T.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N. K. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* Producing Nicotianamine: Potential for Industrial Biosynthesis of a Novel Antihypertensive Substrate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 1408–1415.

(36) Lévesque, F.; Seeberger, P. H. Kontinuierliche Synthese des Malariawirkstoffs Artemisinin. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1738–1741.

(37) Paddon, C. J.; Westfall, P. J.; Pitera, D. J.; Benjamin, K.; Fisher, K.; McPhee, D.; Leavell, M. D.; Tai, A.; Main, A.; Eng, D.; *et al.* High-Level Semi-Synthetic Production of the Potent Antimalarial Artemisinin. *Nature* **2013**, *496*, 528–532.

(38) Osterath, B. Im Tonnenmaßstab Gegen Malaria. *Nachrichten Aus Chem.* **2014**, *62*, 125–127.

(39) *Zulassungen Für Gentechnisch Hergestellte Arzneimittel*; Verband Forschender Arzneimittelhersteller, 2017.

(40) Hong, K.-K.; Nielsen, J. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: A Key Cell Factory Platform for Future Biorefineries. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 2671–2690.

(41) Lee, W.; DaSilva, N. A. Application of Sequential Integration for Metabolic Engineering of 1,2-Propanediol Production in Yeast. *Metab. Eng.* **2006**, *8*, 58–65.

(42) Toivari, M. H.; Maaheimo, H.; Penttilä, M.; Ruohonen, L. Enhancing the Flux of D-Glucose to the Pentose Phosphate Pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for the Production of D-Ribose and Ribitol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 731–739.

(43) Zhao, L.; J Wang; J Zhou; L Liu; G Du; J Chen. Modification of carbon flux in Sacchromyces cerevisiae to improve L-lactic acid production. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **2011**, *51*, 50–58.

(44) Maris, A. J. A. van; Geertman, J.-M. A.; Vermeulen, A.; Groothuizen, M. K.; Winkler, A. A.; Piper, M. D. W.; Dijken, J. P. van; Pronk, J. T. Directed Evolution of Pyruvate Decarboxylase-Negative *Saccharomyces cerevisiae*, Yielding a C2-Independent, Glucose-Tolerant, and Pyruvate-Hyperproducing Yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 159–166.

(45) Raab, A. M.; Gebhardt, G.; Bolotina, N.; Weuster-Botz, D.; Lang, C. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the Biotechnological Production of Succinic Acid. *Metab. Eng.* **2010**, *12*, 518–525.

(46) Madsen, K. M.; Udatha, G. D. B. R. K.; Semba, S.; Otero, J. M.; Koetter, P.; Nielsen, J.; Ebizuka, Y.; Kushiro, T.; Panagiotou, G. Linking Genotype and Phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Reveals Metabolic Engineering Targets and Leads to Triterpene Hyper-Producers. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e14763.

(47) Verwaal, R.; Wang, J.; Meijnen, J.-P.; Visser, H.; Sandmann, G.; Berg, J. A. van den; Ooyen, A. J. J. van. High-Level Production of Beta-Carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by Successive Transformation with Carotenogenic Genes from *Xanthophyllomyces Dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 4342–4350.

(48) Westfall, P. J.; Pitera, D. J.; Lenihan, J. R.; Eng, D.; Woolard, F. X.; Regentin, R.; Horning, T.; Tsuruta, H.; Melis, D. J.; Owens, A.; *et al.* Production of Amorphadiene in Yeast, and Its Conversion to Dihydroartemisinic Acid, Precursor to the Antimalarial Agent Artemisinin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, E111–E118.

(49) Kirby, J.; Nishimoto, M.; Park, J. G.; Withers, S. T.; Nowroozi, F.; Behrendt, D.; Rutledge, E. J. G.; Fortman, J. L.; Johnson, H. E.; Anderson, J. V.; *et al.* Cloning of Casbene and Neocembrene Synthases from *Euphorbiaceae* Plants and Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1466–1473.

(50) Eudes, A.; Baidoo, E. E. K.; Yang, F.; Burd, H.; Hadi, M. Z.; Collins, F. W.; Keasling, J. D.; Loqué, D. Production of Tranilast [N-(3',4'-Dimethoxycinnamoyl)-Anthranilic Acid] and Its Analogs in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 989–1000.

(51) Tavares, S.; Grotkjær, T.; Obsen, T.; Haslam, R. P.; Napier, J. A.; Gunnarsson, N. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Production of Eicosapentaenoic Acid, Using a Novel Δ5-Desaturase from *Paramecium Tetraurelia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 1854–1861.

(52) Millis, J. R.; Maurina-Brunker, J.; McMullin, T. W. United States Patent Application: 0030092144 - Production of Farnesol and Geranylgeraniol. 20030092144A1, May 15, 2003.

(53) Sauer, M.; Branduardi, P.; Valli, M.; Porro, D. Production of L-Ascorbic Acid by Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces Bailii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 6086–6091.

(54) Rico, J.; Pardo, E.; Orejas, M. Enhanced Production of a Plant Monoterpene by Overexpression of the 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Catalytic Domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 6449–6454.

(55) Mutka, S. C.; Bondi, S. M.; Carney, J. R.; Silva, D.; A, N.; Kealey, J. T. Metabolic Pathway Engineering for Complex Polyketide Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2006**, *6*, 40–47.

(56) Becker, J. V. W.; Armstrong, G. O.; Merwe, V. D.; J, M.; Lambrechts, M. G.; Vivier, M. A.; Pretorius, I. S. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the Synthesis of the Wine-Related Antioxidant Resveratrol. *FEMS Yeast Res.* **2003**, *4*, 79–85.

(57) Brochado, A. R.; Matos, C.; Møller, B. L.; Hansen, J.; Mortensen, U. H.; Patil, K. R. Improved Vanillin Production in Baker's Yeast through in Silico Design. *Microb. Cell Factories* **2010**, *9*, 84.

(58) Mapelli, V.; Hillestrøm, P. R.; Kápolna, E.; Larsen, E. H.; Olsson, L. Metabolic and Bioprocess Engineering for Production of Selenized Yeast with Increased Content of Seleno-Methylselenocysteine. *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 282–293.

(59) de Boer, H. A.; Comstock, L. J.; Vasser, M. The Tac Promoter: A Functional Hybrid Derived from the Trp and Lac Promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80*, 21–25.

(60) Guzman, L. M.; Belin, D.; Carson, M. J.; Beckwith, J. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose PBAD Promoter. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 4121–4130.

(61) Pérez-Pérez, J.; Gutiérrez, J. An Arabinose-Inducible Expression Vector, PAR3, Compatible with ColE1-Derived Plasmids. *Gene* **1995**, *158*, 141–142.

(62) Quintero, M. J.; Maya, D.; Arevalo-Rodriguez, M.; Cebolla, A.; Chavez, S. An Improved System for Estradiol-Dependent Regulation of Gene Expression in Yeast. *Microb. Cell Factories* **2007**, *6*, 10.

(63) Mumberg, D.; Muller, R.; Funk, M. Regulatable Promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of Transcriptional Activity and Their Use for Heterologous Expression. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5767–5768.

(64) Mumberg, D.; Müller, R.; Funk, M. Yeast Vectors for the Controlled Expression of Heterologous Proteins in Different Genetic Backgrounds. *Gene* **1995**, *156*, 119–122.

(65) Lindahl, A.-L.; Olsson, M. E.; Mercke, P.; Tollbom, Ö.; Schelin, J.; Brodelius, M.; Brodelius, P. E. Production of the Artemisinin Precursor Amorpha-4,11-Diene by Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 571–580.

(66) Michael Lee, K.; DaSilva, N. A. Evaluation of the *Saccharomyces cerevisiae* ADH2 Promoter for Protein Synthesis. *Yeast* **2005**, *22*, 431–440.

(67) Cunha, A. F.; Missawa, S. K.; Gomes, L. H.; Reis, S. F.; Pereira, G. A. G. Control by Sugar of *Saccharomyces cerevisiae* Flocculation for Industrial Ethanol Production. *FEMS Yeast Res.* **2006**, *6*, 280–287.

(68) Siddiqui, M. S.; Thodey, K.; Trenchard, I.; Smolke, C. D. Advancing Secondary Metabolite Biosynthesis in Yeast with Synthetic Biology Tools. *FEMS Yeast Res.* **2012**, *12*, 144–170.

(69) Maya, D.; Quintero, M. J.; Muñoz-Centeno, M. de la C.; Chávez, S. Systems for Applied Gene Control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 979–987.

(70) Nevoigt, E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 379–412.

(71) Blount, B. A.; Weenink, T.; Ellis, T. Construction of Synthetic Regulatory Networks in Yeast. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2112–2121.

(72) Fracassi, C.; Postiglione, L.; Fiore, G.; di Bernardo, D. Automatic Control of Gene Expression in Mammalian Cells. *ACS Synth. Biol.* **2015**, *5*, 296–302.

(73) Milias-Argeitis, A.; Summers, S.; Stewart-Ornstein, J.; Zuleta, I.; Pincus, D.; El-Samad, H.; Khammash, M.; Lygeros, J. In Silico Feedback for in Vivo Regulation of a Gene Expression Circuit. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 1114–1116.

(74) Adams, S. R.; Tsien, R. Y. Controlling Cell Chemistry with Caged Compounds. *Annu. Rev. Physiol.* **1993**, *55*, 755–784.

(75) Fagan, P. J.; Calabrese, J. C.; Malone, B. Metal Complexes of Buckminsterfullerene (C60). *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 134–142.

(76) Cram, D. J. Molecular Container Compounds. *Nature* **1992**, *356*, 29–36.

(77) Jack H. Kaplan; Forbush, B.; Hoffman, J. F. Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-Triphosphate from a Protected Analog: Utilization by the Sodium:Potassium Pump of Human Red Blood Cell Ghosts. *Biochemistry (Mosc.)* **1978**, *17*, 1929–1935.

(78) Kaplan, J. H.; Ellis-Davies, G. C. Photolabile Chelators for the Rapid Photorelease of Divalent Cations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 6571–6575.

(79) Ellis-Davies, G. C. R.; Kaplan, J. H. A New Class of Photolabile Chelators for the Rapid Release of Divalent Cations: Generation of Caged Calcium and Caged Magnesium. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1966–1969.

(80) McCray, J. A.; Herbette, L.; Kihara, T.; Trentham, D. R. A New Approach to Time-Resolved Studies of ATP-Requiring Biological Systems; Laser Flash Photolysis of Caged ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77*, 7237–7241.

(81) Ellis-Davies, G. C. R. Development and Application of Caged Calcium. *Methods Enzymol.* **2003**, *360*, 226–238.

(82) Brieke, C.; Rohrbach, F.; Gottschalk, A.; Mayer, G.; Heckel, A. Lichtgesteuerte Werkzeuge. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572–8604.

(83) Brieke, C.; Rohrbach, F.; Gottschalk, A.; Mayer, G.; Heckel, A. Light-Controlled Tools. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.

(84) Drepper, T.; Krauss, U.; Meyer zu Berstenhorst, S.; Pietruszka, J.; Jaeger, K.-E. Lights on and Action! Controlling Microbial Gene Expression by Light. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 23–40.

(85) Shao, Q.; Xing, B. Photoactive Molecules for Applications in Molecular Imaging and Cell Biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2835–2846.

(86) Deiters, A. Principles and Applications of the Photochemical Control of Cellular Processes. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 47–53.

(87) Lee, H.; Larson, D. R.; Lawrence, D. S. Illuminating the Chemistry of Life: Design, Synthesis, and Applications of "Caged" and Related Photoresponsive Compounds. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409–427.

(88) Young, D. D.; Deiters, A. Photochemical Control of Biological Processes. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 999–1005.

(89) Mayer, G.; Heckel, A. Biologisch aktive Moleküle mit "Lichtschalter." *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042.

(90) Mayer, G.; Heckel, A. Biologically Active Molecules with a “Light Switch.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.

(91) Salinas, F.; Rojas, V.; Delgado, V.; Agosin, E.; Larrondo, L. F. Optogenetic Switches for Light-Controlled Gene Expression in Yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 2629–2640.

(92) Kusen, P. M.; Hoffmann, K.; Wandrey, G.; Büchs, J.; Pietruszka, J. Optische Genregulation in Mikrobioreaktoren. *BIOspektrum* **2017**, *23*, 643–645.

(93) Cruz, F. G.; Koh, J. T.; Link, K. H. Light-Activated Gene Expression. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8777–8778.

(94) Hayashi, K.; Hashimoto, K.; Kusaka, N.; Yamazoe, A.; Fukaki, H.; Tasaka, M.; Nozaki, H. Caged Gene-Inducer Spatially and Temporally Controls Gene Expression and Plant Development in Transgenic Arabidopsis Plant. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2470–2474.

(95) Lin, W.; Albanese, C.; Pestell, R. G.; Lawrence, D. S. Spatially Discrete, Light-Driven Protein Expression. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1347–1353.

(96) Shi, Y.; Koh, J. T. Light-Activated Transcription and Repression by Using Photocaged SERMs. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 788–796.

(97) Cambridge, S. B.; Geissler, D.; Keller, S.; Cürten, B. A Caged Doxycycline Analogue for Photoactivated Gene Expression. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2229–2231.

(98) Cambridge, S. B.; Geissler, D.; Calegari, F.; Anastassiadis, K.; Hasan, M. T.; Stewart, A. F.; Huttner, W. B.; Hagen, V.; Bonhoeffer, T. Doxycycline-Dependent Photoactivated Gene Expression in Eukaryotic Systems. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 527–531.

(99) Sauers, D. J.; Temburni, M. K.; Biggins, J. B.; Ceo, L. M.; Galileo, D. S.; Koh, J. T. Light-Activated Gene Expression Directs Segregation of Co-Cultured Cells in Vitro. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 313–320.

(100) Link, K. H.; Cruz, F. G.; Ye, H.-F.; O’Reilly, K. E.; Dowdell, S.; Koh, J. T. Photo-Caged Agonists of the Nuclear Receptors RARγ and TRβ Provide Unique Time-Dependent Gene Expression Profiles for Light-Activated Gene Patterning. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5949–5959.

(101) D. Young, D.; Aaron Garner, R.; A. Yoder, J.; Deiters, A. Light-Activation of Gene Function in Mammalian Cells via Ribozymes. *Chem. Commun.* **2009**, *0*, 568–570.

(102) Wulffen, B.; Buff, M. C. R.; Pofahl, M.; Mayer, G.; Heckel, A. Caged Glucosamine-6-Phosphate for the Light-Control of Riboswitch Activity. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 489–492.

(103) Young, D. D.; Deiters, A. Photochemical Activation of Protein Expression in Bacterial Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4290–4292.

(104) Binder, D.; Grünberger, A.; Loeschcke, A.; Probst, C.; Bier, C.; Pietruszka, J.; Wiechert, W.; Kohlheyer, D.; Jaeger, K.-E.; Drepper, T. Light-Responsive Control of Bacterial Gene Expression: Precise Triggering of the Lac Promoter Activity Using Photocaged IPTG. *Integr. Biol.* **2014**, *6*, 755–765.

(105) Wandrey, G.; Bier, C.; Binder, D.; Hoffmann, K.; Jaeger, K.-E.; Pietruszka, J.; Drepper, T.; Büchs, J. Light-Induced Gene Expression with Photocaged IPTG for Induction Profiling in a High-Throughput Screening System. *Microb. Cell Factories* **2016**, *15*, 63.

(106) Binder, D.; Frohwitter, J.; Mahr, R.; Bier, C.; Grünberger, A.; Loeschcke, A.; Peters-Wendisch, P.; Kohlheyer, D.; Pietruszka, J.; Frunzke, J.; *et al.* Light-Controlled Cell Factories: Employing Photocaged Isopropyl-β-d-Thiogalactopyranoside for Light-Mediated Optimization of Lac Promoter-Based Gene Expression and (+)-Valencene Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* . *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 6141–6149.

(107) Goard, M.; Aakalu, G.; Fedoryak, O. D.; Quinonez, C.; St. Julien, J.; Poteet, S. J.; Schuman, E. M.; Dore, T. M. Light-Mediated Inhibition of Protein Synthesis. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 685–693.

(108) Gossen, M.; Bujard, H. Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 5547–5551.

(109) Grollman, A. P.; Walsh, W. the technical assistance of M. Inhibitors of Protein Biosynthesis II. Mode of Action of Anisomycin. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 3226–3233.

(110) Bier, C.; Binder, D.; Drobietz, D.; Loeschcke, A.; Drepper, T.; Jaeger, K.-E.; Pietruszka, J. Photocaged Carbohydrates: Versatile Tools for Controlling Gene Expression by Light. *Synthesis* **2017**, *49*, 42–52.

(111) Cambridge, S. B.; Geissler, D.; Keller, S.; Cürten, B. A Caged Doxycycline Analogue for Photoactivated Gene Expression. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2229–2231.

(112) Douglas, H. C.; Hawthorne, C. D. Uninducible Mutants in the Gal i Locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **1972**, *109*, 1139–1143.

(113) Douglas, H. C.; Hawthorne, D. C. Regulation of Genes Controlling Synthesis of the Galactose Pathway Enzymes in Yeast. *Genetics* **1966**, *54*, 911–916.

(114) Douglas, H. C.; Hawthorne, D. C. Enzymatic Expression and Genetic Linkage of Genes Controlling Galactose Utilization in *Saccharomyces*. *Genetics* **1964**, *49*, 837–844.

(115) Douglas, H. C.; Condie, F. The Genetic Control of Galactose Utilization in *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.* **1954**, *68*, 662–670.

(116) Platt, A.; Reece, R. J. The Yeast Galactose Genetic Switch Is Mediated by the Formation of a Gal4p–Gal80p–Gal3p Complex. *EMBO J.* **1998**, *17*, 4086–4091.

(117) Pannala, V. R.; Bhat, P. J.; Bhartiya, S.; Venkatesh, K. V. Systems Biology of GAL Regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2010**, *2*, 98–106.

(118) Johnston, M.; Flick, J. S.; Pexton, T. Multiple Mechanisms Provide Rapid and Stringent Glucose Repression of GAL Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 3834–3841.

(119) Kusen, P. M. Lichtabhängige Proteinexpression in Hefen. Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für bioorganische Chemie, Studiengang Biochemie: Düsseldorf, 2013.

(120) Wandrey, G.; Bier, C.; Binder, D.; Hoffmann, K.; Jaeger, K.-E.; Pietruszka, J.; Drepper, T.; Büchs, J. Light-Induced Gene Expression with Photocaged IPTG for Induction Profiling in a High-Throughput Screening System. *Microb. Cell Factories* **2016**, *15*, 63.

(121) Leloir, L. F. The Enzymatic Transformation of Uridine Diphosphate Glucose into a Galactose Derivative. *Arch. Biochem. Biophys.* **1951**, *33*, 186–190.

(122) Ramos, J.; Szkutnicka, K.; Cirillo, V. P. Characteristics of Galactose Transport in *Saccharomyces cerevisiae* Cells and Reconstituted Lipid Vesicles. *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 3539–3544.

(123) Bhat, P. J.; Oh, D.; Hopper, J. E. Analysis of the GAL3 Signal Transduction Pathway Activating GAL4 Protein-Dependent Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **1990**, *125*, 281–291.

(124) Bhat, P. J.; Hopper, J. E. Overproduction of the GAL1 or GAL3 Protein Causes Galactose-Independent Activation of the GAL4 Protein: Evidence for a New Model of Induction for the Yeast GAL/MEL Regulon. *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 2701–2707.

(125) Il'ichev, Y. V.; Wirz, J. Rearrangements of 2-Nitrobenzyl Compounds. 1. Potential Energy Surface of 2-Nitrotoluene and Its Isomers Explored with Ab Initio and Density Functional Theory Methods. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 7856–7870.

(126) Il'ichev, Y. V.; Schwörer, M. A.; Wirz, J. Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds: Methyl Ethers and Caged ATP. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4581–4595.

(127) Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191.

(128) Kwak, G.-H.; Choi, S. H.; Kim, H.-Y. Dimethyl Sulfoxide Elevates Hydrogen Peroxide-Mediated Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae* by Inhibiting the Antioxidant Function of Methionine Sulfoxide Reductase A. *BMB Rep.* **2010**, *43*, 622–628.

(129) Sadowska-Bartosz, I.; Pączka, A.; Mołoń, M.; Bartosz, G. Dimethyl Sulfoxide Induces Oxidative Stress in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 820–830.

(130) Verhulst, P.-F. Mathematical Researches into the Law of Population Growth Increase. *Nouv. Mém. L'Académie R. Sci. Belles- Lett. Brux.* **1845**, *18*, 1–45.

(131) Kusen, P. M.; Wandrey, G.; Krewald, V.; Holz, M.; Berstenhorst, S. M. zu; Büchs, J.; Pietruszka, J. Light-Controlled Gene Expression in Yeast Using Photocaged Cu2+. *J. Biotechnol.* **2017**, 258, 117-125

(132) Gorman, J. A.; Clark, P. E.; Lee, M. C.; Debouck, C.; Rosenberg, M. Regulation of the Yeast Metallothionein Gene. *Gene* **1986**, *48*, 13–22.

(133) Fujita, V. S.; Thiele, D. J.; Coon, M. J. Expression of Alcohol-Inducible Rabbit Liver Cytochrome P-450 3a (P-450IIE1) in *Saccharomyces cerevisiae* with the Copper-Inducible CUP1 Promoter. *DNA Cell Biol.* **1990**, *9*, 111–118.

(134) Da Silva, N. A.; Srikrishnan, S. Introduction and Expression of Genes for Metabolic Engineering Applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2012**, *12*, 197–214.

(135) Shen, M. W. Y.; Fang, F.; Sandmeyer, S.; Da Silva, N. A. Development and Characterization of a Vector Set with Regulated Promoters for Systematic Metabolic Engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2012**, *29*, 495–503.

(136) Farhi, M.; Dudareva, N.; Masci, T.; Weiss, D.; Vainstein, A.; Abeliovich, H. Synthesis of the Food Flavoring Methyl Benzoate by Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **2006**, *122*, 307–315.

(137) Romanos, M. A.; Scorer, C. A.; Clare, J. J. Foreign Gene Expression in Yeast: A Review. *Yeast* **1992**, *8*, 423–488.

(138) Horspool, W. M.; Lenci, F. *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*; 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, 2004.

(139) Ellis-Davies, G. C. R. Neurobiology with Caged Calcium. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1603–1613.

(140) Ellis-Davies, G. C. R.; Barsotti, R. J. Tuning Caged Calcium: Photolabile Analogues of EGTA with Improved Optical and Chelation Properties. *Cell Calcium* **2006**, *39*, 75–83.

(141) Kishimoto, T.; Liu, T. T.; Ninomiya, Y.; Takagi, H.; Yoshioka, T.; Ellis-Davies, G. C.; Miyashita, Y.; Kasai, H. Ion Selectivities of the Ca(2+) Sensors for Exocytosis in Rat Phaeochromocytoma Cells. *J. Physiol.* **2001**, *533*, 627–637.

(142) Smith, R. M.; Martell, A. E. *Critical Stability Constants, Second Supplement*; Critical Stability Constants; Springer US, 1989; Vol. 6.

(143) Festa, R. A.; Thiele, D. J. Copper: An Essential Metal in Biology. *Curr. Biol. CB* **2011**, *21*, R877–R883.

(144) Rutherford, J. C.; Bird, A. J. Metal-Responsive Transcription Factors That Regulate Iron, Zinc, and Copper Homeostasis in Eukaryotic Cells. *Eukaryot. Cell* **2004**, *3*, 1–13.

(145) Wegner, S. V.; Sun, F.; Hernandez, N.; He, C. The Tightly Regulated Copper Window in Yeast. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2571–2573.

(146) L. Dupont, C.; Grass, G.; Rensing, C. Copper Toxicity and the Origin of Bacterial Resistance—new Insights and Applications. *Metallomics* **2011**, *3*, 1109–1118.

(147) Brown, K. R.; Keller, G. L.; Pickering, I. J.; Harris, H. H.; George, G. N.; Winge, D. R. Structures of the Cuprous-Thiolate Clusters of the Mac1 and Ace1 Transcriptional Activators. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, *41*, 6469–6476.

(148) Dameron, C. T.; Winge, D. R.; George, G. N.; Sansone, M.; Hu, S.; Hamer, D. A Copper-Thiolate Polynuclear Cluster in the ACE1 Transcription Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 6127–6131.

(149) Dobi, A.; Dameron, C. T.; Hu, S.; Hamer, D.; Winge, D. R. Distinct Regions of Cu(I)·ACE1 Contact Two Spatially Resolved DNA Major Groove Sites. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10171–10178.

(150) Joshi, A.; Serpe, M.; Kosman, D. J. Evidence for (Mac1p)2·DNA Ternary Complex Formation in Mac1p-Dependent Transactivation at TheCTR1 Promoter. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 218–226.

(151) Liu, X.-D.; Thiele, D. J. Yeast Metallothionein Gene Expression in Response to Metals and Oxidative Stress. *Methods* **1997**, *11*, 289–299.

(152) Peña, M. M. O.; Koch, K. A.; Thiele, D. J. Dynamic Regulation of Copper Uptake and Detoxification Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 2514–2523.

(153) Wright, C. F.; McKenney, K.; Hamer, D. H.; Byrd, J.; Winge, D. R. Structural and Functional Studies of the Amino Terminus of Yeast Metallothionein. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 12912–12919.

(154) Byrd, J.; Berger, R. M.; McMillin, D. R.; Wright, C. F.; Hamer, D.; Winge, D. R. Characterization of the Copper-Thiolate Cluster in Yeast Metallothionein and Two Truncated Mutants. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6688–6694.

(155) Zeng, J.; Vallee, B. L.; Kägi, J. H. Zinc Transfer from Transcription Factor IIIA Fingers to Thionein Clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 9984–9988.

(156) Zeng, J.; Heuchel, R.; Schaffner, W.; Kägi, J. H. R. Thionein (Apometallothionein) Can Modulate DNA Binding and Transcription Activation by Zinc Finger Containing Factor Spl. *FEBS Lett.* **1991**, *279*, 310–312.

(157) Labbé, S.; Thiele, D. J. Copper Ion Inducible and Repressible Promoter Systems in Yeast. *Methods Enzymol.* **1999**, *306*, 145–153.

(158) Lichten, C. A.; White, R.; Clark, I. B.; Swain, P. S. Unmixing of Fluorescence Spectra to Resolve Quantitative Time-Series Measurements of Gene Expression in Plate Readers. *BMC Biotechnol.* **2014**, *14*, 11.

(159) Wandrey, G.; Wurzel, J.; Hoffmann, K.; Ladner, T.; Büchs, J.; Meinel, L.; Lühmann, T. Probing Unnatural Amino Acid Integration into Enhanced Green Fluorescent Protein by Genetic Code Expansion with a High-Throughput Screening Platform. *J. Biol. Eng.* **2016**, *10*, 11.

(160) Görgens, J. F.; van Zyl, W. H.; Knoetze, J. H.; Hahn-Hägerdal, B. The Metabolic Burden of the PGK1 and ADH2 Promoter Systems for Heterologous Xylanase Production by *Saccharomyces cerevisiae* in Defined Medium. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *73*, 238–245.

(161) Ayer Jr., R. K.; Zucker, R. S. Magnesium Binding to DM-Nitrophen and Its Effect on the Photorelease of Calcium. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 3384–3393.

(162) McCray, J.; Fidler-Lim, N.; Ellis-Davies, G.; Kaplan, J. Rate of Release of Ca2+ Following Laser Photolysis of the DM-Nitrophen-Ca2+ Complex. *Biochemistry (Mosc.)* **1992**, *31*, 8856–8861.

(163) Galbavy, E. S.; Ram, K.; Anastasio, C. 2-Nitrobenzaldehyde as a Chemical Actinometer for Solution and Ice Photochemistry. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2010**, *209*, 186–192.

(164) Ellis-Davies, G. C. R. Caged Compounds: Photorelease Technology for Control of Cellular Chemistry and Physiology. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628.

(165) Ciesienski, K. L.; Haas, K. L.; Franz, K. J. Development of Next-Generation Photolabile Copper Cages with Improved Copper Binding Properties. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 9538–9546.

(166) Kumbhar, A. A.; Franks, A. T.; Butcher, R. J.; Franz, K. J. Light Uncages a Copper Complex to Induce Nonapoptotic Cell Death. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2460–2462.

(167) Ciesienski, K. L.; Franz, K. J. Keys for Unlocking Photolabile Metal-Containing Cages. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 814–824.

(168) San Miguel, V.; Bochet, C. G.; del Campo, A. Wavelength-Selective Caged Surfaces: How Many Functional Levels Are Possible? *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5380–5388.

(169) Hansen, M. J.; Velema, W. A.; Lerch, M. M.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Wavelength-Selective Cleavage of Photoprotecting Groups: Strategies and Applications in Dynamic Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3358–3377.

(170) Babin, J.; Pelletier, M.; Lepage, M.; Allard, J.-F.; Morris, D.; Zhao, Y. A New Two-Photon-Sensitive Block Copolymer Nanocarrier. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3379–3382.

(171) Neises, B.; Steglich, W. Einfaches Verfahren Zur Veresterung von Carbonsäuren. *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556–557.

(172) Wachter, R. M.; Elsliger, M.-A.; Kallio, K.; Hanson, G. T.; Remington, S. J. Structural Basis of Spectral Shifts in the Yellow-Emission Variants of Green Fluorescent Protein. *Structure* **1998**, *6*, 1267–1277.

(173) Kusen, P. M.; Wandrey, G.; Probst, C.; Grünberger, A.; Holz, M.; Meyer zu Berstenhorst, S.; Kohlheyer, D.; Büchs, J.; Pietruszka, J. Optogenetic Regulation of Tunable Gene Expression in Yeast Using Photo-Labile Caged Methionine. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2915–2922.

(174) Delic, M.; Mattanovich, D.; Gasser, B. Repressible Promoters – A Novel Tool to Generate Conditional Mutants in *Pichia Pastoris*. *Microb. Cell Factories* **2013**, *12*, 6.

(175) Solow, S. P.; Sengbusch, J.; Laird, M. W. Heterologous Protein Production from the Inducible MET25 Promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 617–620.

(176) Sinah, N.; Williams, C. A.; Piper, R. C.; Shields, S. B. A Set of Dual Promoter Vectors for High Throughput Cloning, Screening, and Protein Expression in Eukaryotic and Prokaryotic Systems from a Single Plasmid. *BMC Biotechnol.* **2012**, *12*, 54.

(177) Siewers, V.; Mortensen, U. H.; Nielsen, J. Genetic Engineering Tools for *Saccharomyces cerevisiae*. **2010**, 287–301.

(178) Møller, T. S. B.; Hay, J.; Saxton, M. J.; Bunting, K.; Petersen, E. I.; Kjærulff, S.; Finnis, C. J. A. Human β-Defensin-2 Production from *S. cerevisiae* Using the Repressible MET17 Promoter. *Microb. Cell Factories* **2017**, *16*, 11.

(179) Zhang, N.; Osborn, M.; Gitsham, P.; Yen, K.; Miller, J. R.; Oliver, S. G. *Gene* **2003**, *303*, 121–129.

(180) Thomas, D.; Surdin-Kerjan, Y. SAM1, the Structural Gene for One of the S-Adenosylmethionine Synthetases in *Saccharomyces cerevisiae*. Sequence and Expression. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 16704–16709.

(181) Thomas, D.; Surdin-Kerjan, Y. Metabolism of Sulfur Amino Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61*, 503–532.

(182) Kuras, L.; Rouillon, A.; Lee, T.; Barbey, R.; Tyers, M.; Thomas, D. Dual Regulation of the Met4 Transcription Factor by Ubiquitin-Dependent Degradation and Inhibition of Promoter Recruitment. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 69–80.

(183) D.-S. Shin; Y.-S. Lee. Synthesis of Pentafluorophenyl Esters of Nitroveratryloxycarbonyl-Protected Amino Acids. *Synlett* **2009**, 3307–3310.

(184) Chen, S.; Fahmi, N. E.; Nangreave, R. C.; Mehellou, Y.; Hecht, S. M. Synthesis of PdCpAs and Transfer RNAs Activated with Thiothreonine and Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2679–2689.

(185) Amit, B.; Zehavi, U.; Patchornik, A. Photosensitive Protecting Groups — A Review. *Isr. J. Chem.* **1974**, *12*, 103–113.

(186) H. Schupp; W. K. Wong; W. Schnabel. Mechanistic Studies of the Photorearrangement of O-Nitrobenzyl Esters. *J. Photochem.* **1987**, *36*, 85–97.

(187) Mattanovich, D.; Gasser, B.; Hohenblum, H.; Sauer, M. Stress in Recombinant Protein Producing Yeasts. *J. Biotechnol.* **2004**, *113*, 121–135.

(188) Kaur, J.; Kumar, A.; Kaur, J. Strategies for Optimization of Heterologous Protein Expression in *E. coli*: Roadblocks and Reinforcements. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**.

(189) Binder, D.; Bier, C.; Grünberger, A.; Drobietz, D.; Hage-Hülsmann, J.; Wandrey, G.; Büchs, J.; Kohlheyer, D.; Loeschcke, A.; Wiechert, W.; *et al.* Photocaged Arabinose: A Novel Optogenetic Switch for Rapid and Gradual Control of Microbial Gene Expression. *ChemBioChem* **2016**.

(190) Kaneyoshi Yamamoto; Akira Ishihama. Characterization of Copper-Inducible Promoters Regulated by CpxA/CpxR in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 1688–1695.

(191) Mustafi, N.; Grünberger, A.; Kohlheyer, D.; Bott, M.; Frunzke, J. The Development and Application of a Single-Cell Biosensor for the Detection of l-Methionine and Branched-Chain Amino Acids. *Metab. Eng.* **2012**, *14*, 449–457.

(192) Matsuyama, T.; Yamanishi, M.; Takahashi, H. Improvement of Galactose Induction System in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *111*, 175–177.

(193) Hagen, D. C.; McCaffrey, G.; Sprague, G. F. Pheromone Response Elements Are Necessary and Sufficient for Basal and Pheromone-Induced Transcription of the FUS1 Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **1991**, *11*, 2952–2961.

(194) Bardwell, L. A Walk-through of the Yeast Mating Pheromone Response Pathway. *Peptides* **2004**, *25*, 1465–1476.

(195) Stötzler, D.; Kiltz, H.-H.; Duntze, W. Primary Structure of α-Factor Peptides from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *69*, 397–400.

(196) Masui, Y.; Chino, N.; Sakakibara, S.; Tanaka, T.; Murakami, T.; Kita, H. Synthesis of the Mating Factor of *Saccharomyces cerevisiae* and Its Truncated Peptides: The Structure-Activity Relationship. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *78*, 534–538.

(197) Burkholder, A. C.; Hartwell, L. H. The Yeast α-Factor Receptor: Structural Properties Deduced from the Sequence of the STE2 Gene. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 8463–8475.

(198) Hagen, D. C.; McCaffrey, G.; Sprague, G. F. Evidence the Yeast STE3 Gene Encodes a Receptor for the Peptide Pheromone a Factor: Gene Sequence and Implications for the Structure of the Presumed Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83*, 1418–1422.

(199) Bardwell, L.; Cook, J. G.; Inouye, C. J.; Thorner, J. Signal Propagation and Regulation in the Mating Pheromone Response Pathway of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Biol.* **1994**, *166*, 363–379.

(200) Nelson, B.; Parsons, A. B.; Evangelista, M.; Schaefer, K.; Kennedy, K.; Ritchie, S.; Petryshen, T. L.; Boone, C. Fus1p Interacts With Components of the Hog1p Mitogen-Activated Protein Kinase and Cdc42p Morphogenesis Signaling Pathways to Control Cell Fusion During Yeast Mating. *Genetics* **2004**, *166*, 67–77.

(201) Bagnat, M.; Simons, K. Cell Surface Polarization during Yeast Mating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 14183–14188.

(202) Trueheart, J.; Boeke, J. D.; Fink, G. R. Two Genes Required for Cell Fusion during Yeast Conjugation: Evidence for a Pheromone-Induced Surface Protein. *Mol. Cell. Biol.* **1987**, *7*, 2316–2328.

(203) Chang, F.; Herskowitz, I. Identification of a Gene Necessary for Cell Cycle Arrest by a Negative Growth Factor of Yeast: FAR1 Is an Inhibitor of a G1 Cyclin, CLN2. *Cell* **1990**, *63*, 999–1011.

(204) Mendenhall, M. D. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors of *Saccharomyces cerevisiae* and Schizo*Saccharomyces* Pombe. In *Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors*; Current Topics in Microbiology and Immunology; Springer, Berlin, Heidelberg, 1998; pp. 1–24.

(205) Peter, M.; Herskowitz, I. Direct Inhibition of the Yeast Cyclin-Dependent Kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* **1994**, *265*, 1228–1232.

(206) Lee, P. J.; Helman, N. C.; Lim, W. A.; Hung, P. J. A Microfluidic System for Dynamic Yeast Cell Imaging. *BioTechniques* **2008**, *44*, 91–95.

(207) Groisman, A.; Levchenko, A.; Campbell, K.; Iglesias, P. A.; Paliwal, S.; Hilioti, Z. MAPK-Mediated Bimodal Gene Expression and Adaptive Gradient Sensing in Yeast. *Nature* **2007**, *446*, 46.

(208) Houser, J. R.; Ford, E.; Chatterjea, S. M.; Maleri, S.; Elston, T. C.; Errede, B. An Improved Short-Lived Fluorescent Protein Transcriptional Reporter for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2012**, *29*, 519–530.

(209) Hackett, E. A.; Esch, R. K.; Maleri, S.; Errede, B. A Family of Destabilized Cyan Fluorescent Proteins as Transcriptional Reporters in *S. cerevisiae*. *Yeast* **2006**, *23*, 333–349.

(210) Mülhardt, C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*; 6th ed.; Spektrum Akademischer Verlag, 2009.

(211) Gietz, R. D.; Woods, R. A. Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. In *Yeast Protocols*; Humana Press: New Jersey, 2006; Vol. 313, pp. 107–120.

(212) Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **1988**, *239*, 487–491.

(213) Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.

(214) Thomas, D.; Cherest, H.; Surdin-Kerjan, Y. Elements Involved in S-Adenosylmethionine-Mediated Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* MET25 Gene. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 3292–3298.

(215) Johnston, M.; Davis, R. W. Sequences That Regulate the Divergent GAL1-GAL10 Promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **1984**, *4*, 1440–1448.

(216) Tielker, D.; Eichhof, I.; Jaeger, K.-E.; Ernst, J. F. Flavin Mononucleotide-Based Fluorescent Protein as an Oxygen-Independent Reporter in Candida Albicans and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **2009**, *8*, 913–915.

(217) Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* **1994**, *263*, 802–805.

(218) Ward, W. W.; Prentice, H. J.; Roth, A. F.; Cody, C. W.; Reeves, S. C. Spectral Perturbations of the Aequorea Green-Fluorescent Protein. *Photochem. Photobiol.* **1982**, *35*, 803–808.

(219) Heim, R.; Tsien, R. Y. Engineering Green Fluorescent Protein for Improved Brightness, Longer Wavelengths and Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 178–182.

(220) Meselson, M.; Yuan, R. DNA Restriction Enzyme from *E. coli*. *Nature* **1968**, *217*, 1110–1114.

(221) Brachmann, C. B.; Davies, A.; Cost, G. J.; Caputo, E.; Li, J.; Hieter, P.; Boeke, J. D. Designer Deletion Strains Derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A Useful Set of Strains and Plasmids for PCR-Mediated Gene Disruption and Other Applications. *Yeast* **1998**, *14*, 115–132.

(222) Grünberger, A.; Probst, C.; Helfrich, S.; Nanda, A.; Stute, B.; Wiechert, W.; von Lieres, E.; Nöh, K.; Frunzke, J.; Kohlheyer, D. Spatiotemporal Microbial Single-Cell Analysis Using a High-Throughput Microfluidics Cultivation Platform. *Cytometry A* **2015**, *87*, 1101–1115.

(223) Hanahan, D. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557–580.

(224) Bowen, E. J.; Hartley, H.; Scott, W. D.; Watts, H. G. Rate of Photochemical Change in Solids. *J. Chem. Soc. Trans.* **1924**, *125*, 1218–1221.

(225) Calvert, J. G.; Pitts; N, J. Photochemistry. **1966**.

(226) Gauglitz, G.; Hubig, S. Chemical Actinometry in the UV by Azobenzene in Concentrated Solution: A Convenient Method. *J. Photochem.* **1985**, *30*, 121–125.

(227) Willett, K. L.; Hites, R. A. Chemical Actinometry: Using o-Nitrobenzaldehyde to Measure Lamp Intensity in Photochemical Experiments. *J. Chem. Educ.* **2000**, *77*, 900.

(228) Kuhn, H. J.; Braslavsky, S. E.; Schmidt, R. Chemical Actinometry (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2009**, *76*, 2105–2146.

Danksagung

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Jörg Pietruszka danken für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas und die guten Arbeitsbedingungen im Institut für Bioorganische Chemie. Besonders hervorheben möchte ich dabei die enorme wissenschaftliche Freiheit und das Vertrauen, welches mir gewährt wurde, und die es mir erlaubten die Projekte dieser Dissertation eigenständig weiterzuentwickeln und dadurch erfolgreich zu gestalten. Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates. Bei Dr. Martina Holz und Dr. Sonja Meyer zu Berstenhorst bedanke ich mich für die Einarbeitung in das Thema, die stets konstruktiven Diskussionen und die anregende Kritik während der Durchsicht dieses Manuskriptes. Dr. Claus Bier, Dr. Georg Wandrey, Dr. Christopher Probst möchte ich danken für die produktive Kooperation innerhalb des OptoSys-Projektes und für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei den gemeinsamen Publikationen.

Außerdem danke ich Wally und Dominik Brandler sowie Carolin Bisterfeld für die exzellente Durchsicht dieses Manuskriptes und die freundschaftliche Verbundenheit. Dr. Dennis Worgull gilt ebenfalls mein großer Dank für die vielen Diskussion und die stete Unterstützung durch seinen enormen Wissensschatz der synthetischen Chemie. Mein Dank gilt auch Max Erichsen, für die tatkräftige Unterstützung im Labor während seiner Ausbildung und die wertvollen Erfahrungen die ich dabei sammeln durfte.

Dr. Marcus Brauns, Dr. Claudia Holec und Dr. Carolin Bisterfeld möchte ganz besonders für die unvergessliche, gemeinsame Zeit danken, für die Höhen und Tiefen, die Rückschläge und Durchbrüche, die wir zusammen erlebt und gemeistert haben. Darüber hinaus möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Institute für Bioorganische Chemie und Molekulare Enzymtechnologie für die freundliche Atmosphäre bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich im Besonderen bei meiner Familie bedanken, die mir durch ihre bedingungslose Unterstützung auf meinem gesamten Lebensweg erst mein Studium und die anschließende Promotion ermöglicht hat. Abschließend möchte ich noch Susanne danken, die großen Anteil am erfolgreichen Gelingen dieser Dissertation trägt. Sie war immer für mich da und hat mir stets Halt gegeben. Ohne ihre Motivation und Unterstützung hätte ich viele Ziele in meinem Leben nicht erreicht. Ich bin stolz und glücklich dich an meiner Seite zu haben.

Anhang

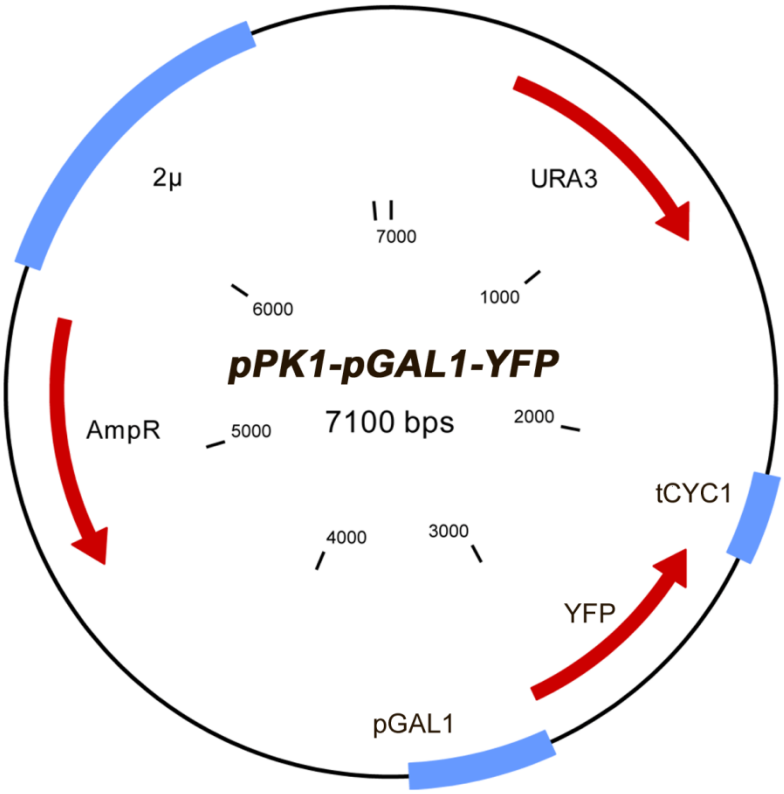


Abbildung 74: Plasmidkarte von pPK1-pGAL1-YFP. AmpR: Ampicillin-Restistenzgen als Selektionsmarker in E.coli, pGAL1: GAL1-Promotor, YFP: Gen des Yellow Fluorescent Protein, tCYC1: Terminatorsequenz des CYC1-Gens, URA3: Gen der Orotidine 5'-phosphate decarboxylase als Selektionsmarker in S. cerevisiae, 2µ: Replikationsursprung.

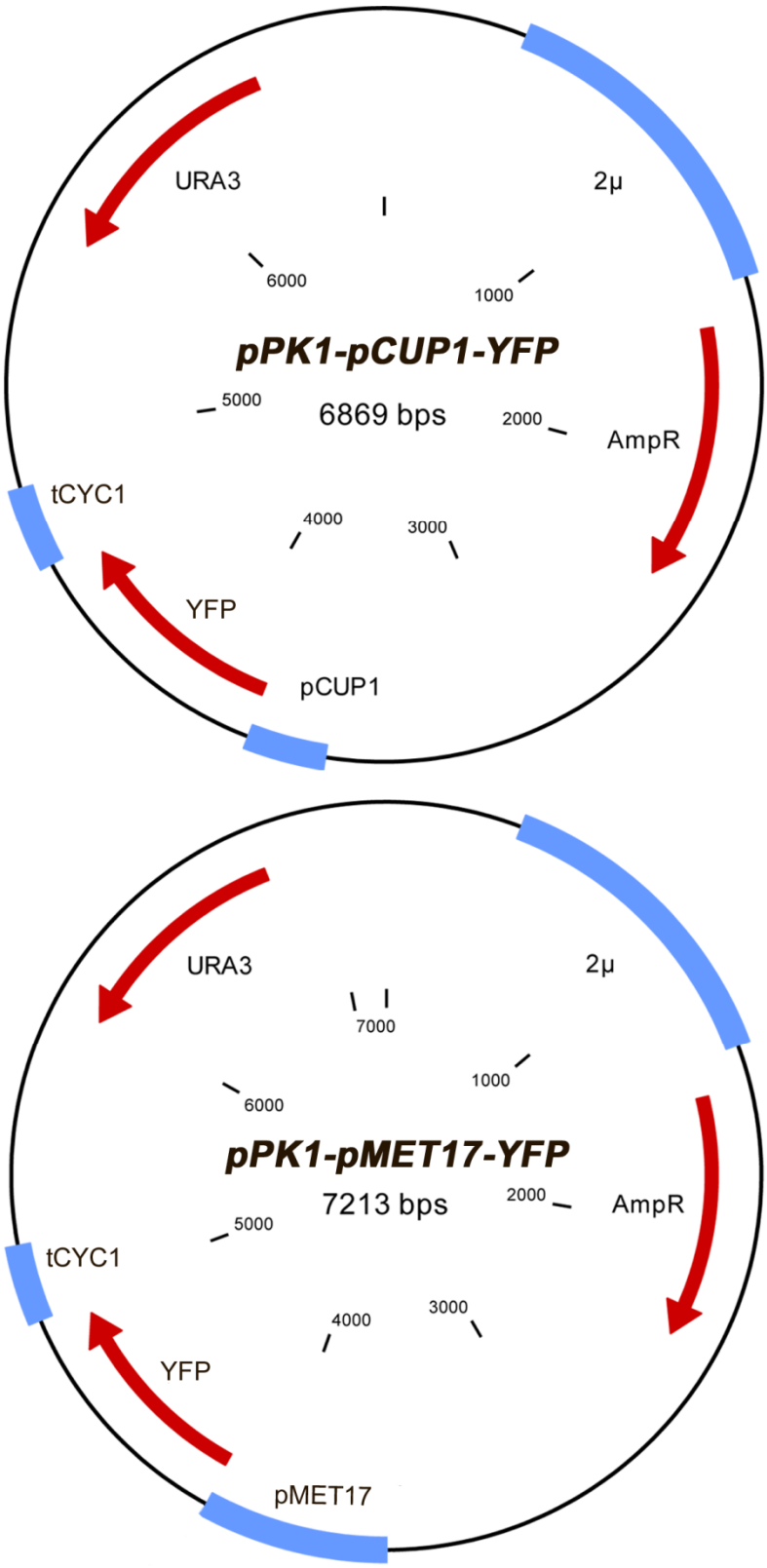


Abbildung 75: Plasmidkarte von pPK1-pCUP1-YFP und pPK1-pMET17-YFP. AmpR: Ampicillin-Restistenzgen als Selektionsmarker in E.coli, pCUP1: CUP1-Promotor, pMET17: MET17-Promotor, YFP: Gen des Yellow Fluorescent Protein, tCYC1: Terminatorsequenz des CYC1-Gens, URA3: Gen der Orotidine 5'-phosphate decarboxylase als Selektionsmarker in S. cerevisiae, 2µ: Replikationsursprung.

3-(2-Nitrophenyl)-3-(picolinamido)propansäure (48)

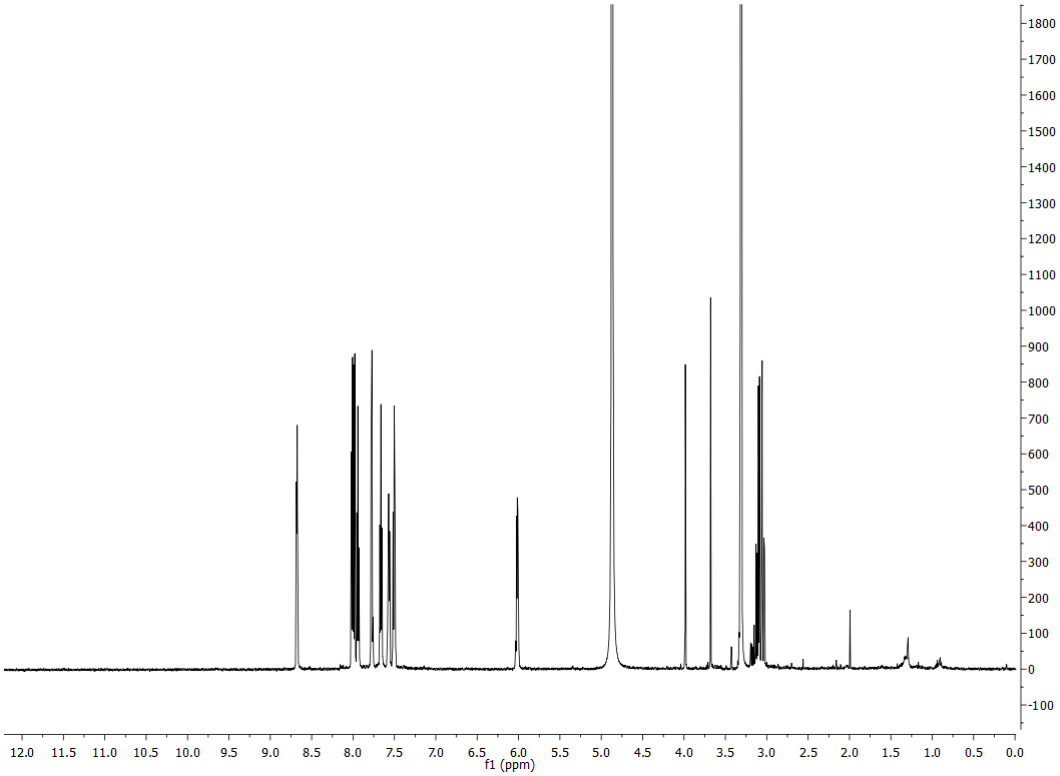


*Abbildung 76: ^{1}H-NMR Spektrum (600 MHz) von 3-(2-Nitrophenyl)-3-(picolinamido)propansäure (**48**) gemessen in Methanol-d_4.*

3-Amino-3-(2-nitrophenyl)-1-propanol (54)

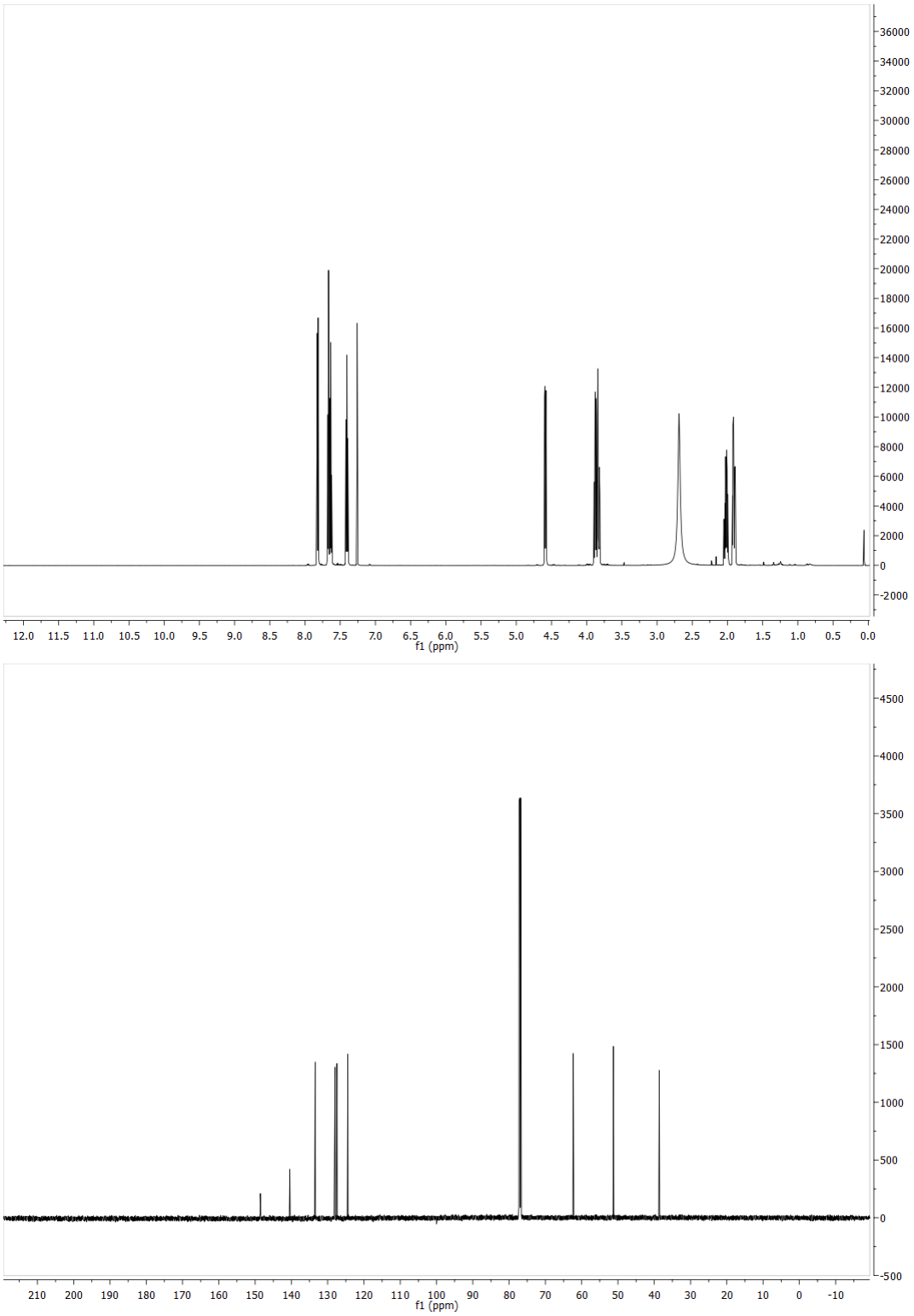


*Abbildung 77: NMR Spektren [oben: ^{1}H (600 MHz), unten: ^{13}C (151 MHz)] von 3-Amino-3-(2-nitrophenyl)-1-propanol (**54**) gemessen in Chloroform-d.*

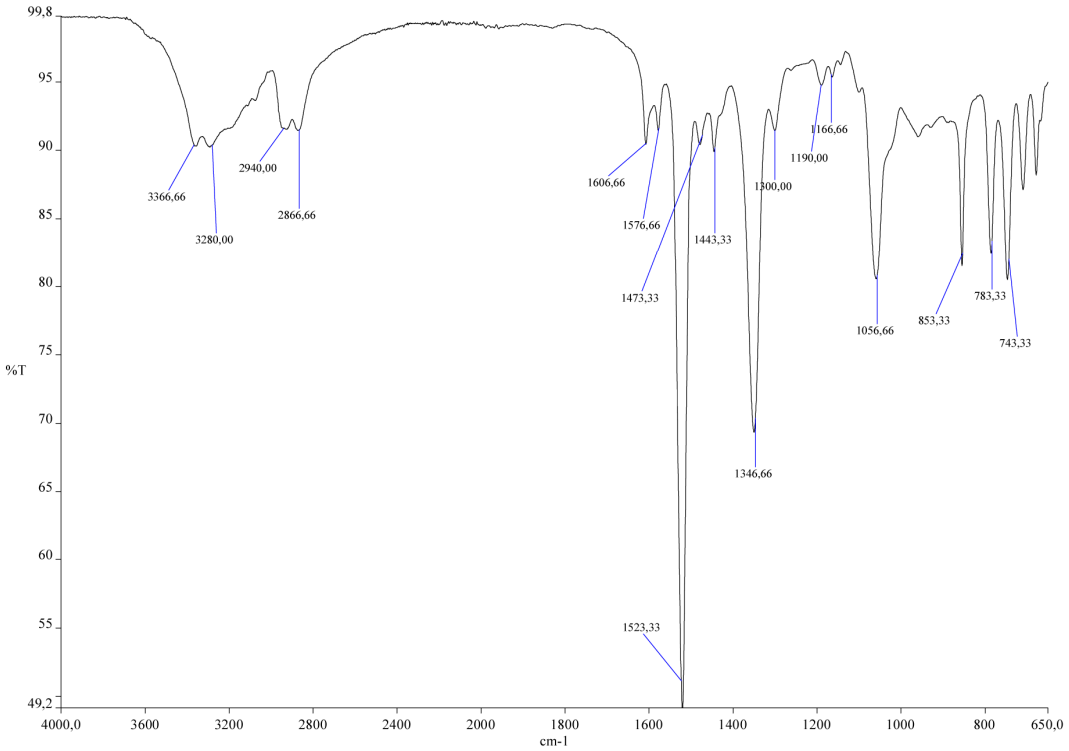


*Abbildung 78: IR Spektrum von 3-Amino-3-(2-nitrophenyl)-1-propanol (**54**) gemessen in Chloroform-d.*

3-(2-Nitrophenyl)-3-(picolinamido)-1-propanol (50)

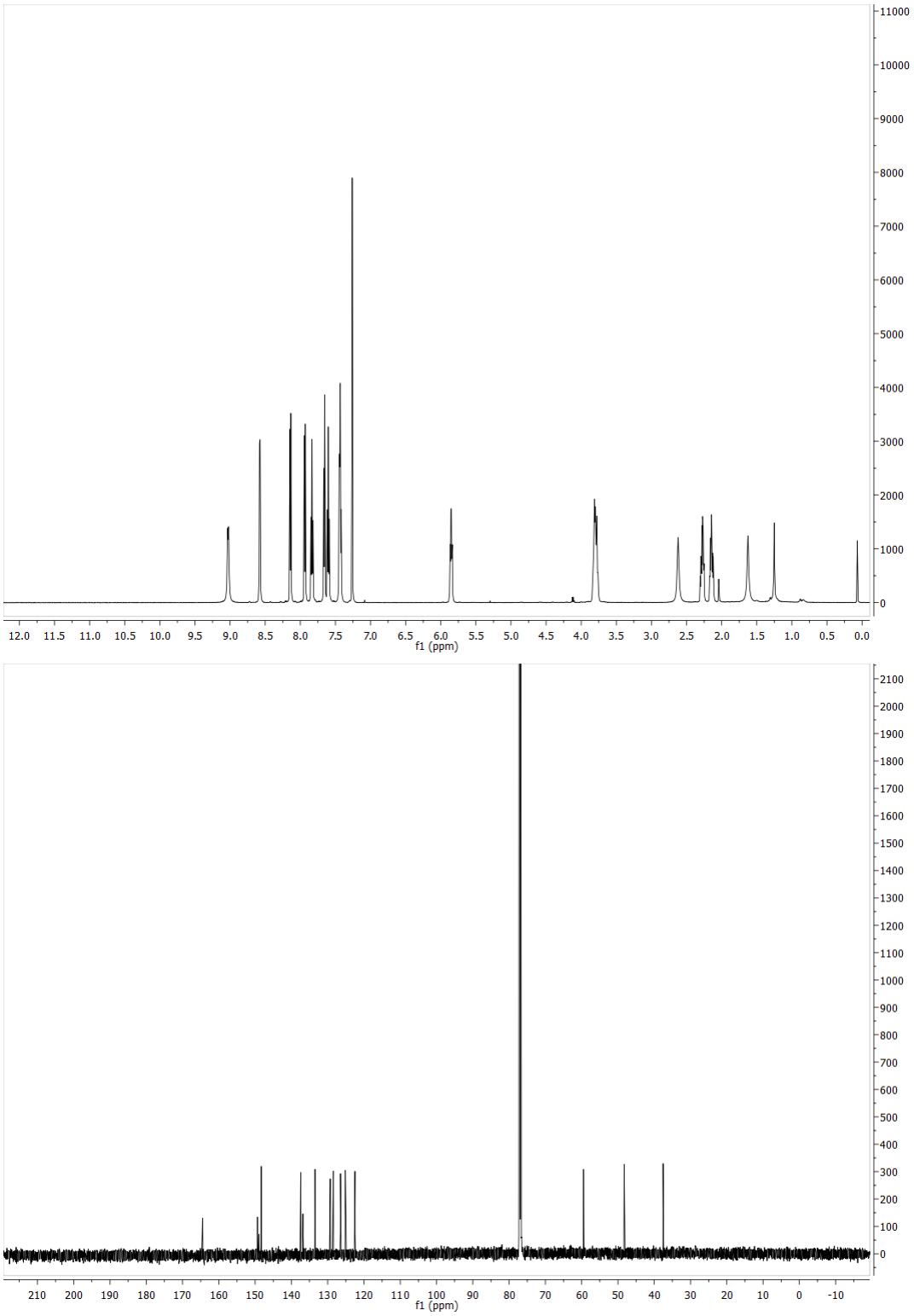


*Abbildung 79: NMR Spektren [oben: ^{1}H (600 MHz), unten: ^{13}C (151 MHz)] von 3-(2-Nitrophenyl)-3-(picolinamido)-1-propanol (**50**) gemessen in Chloroform-d.*

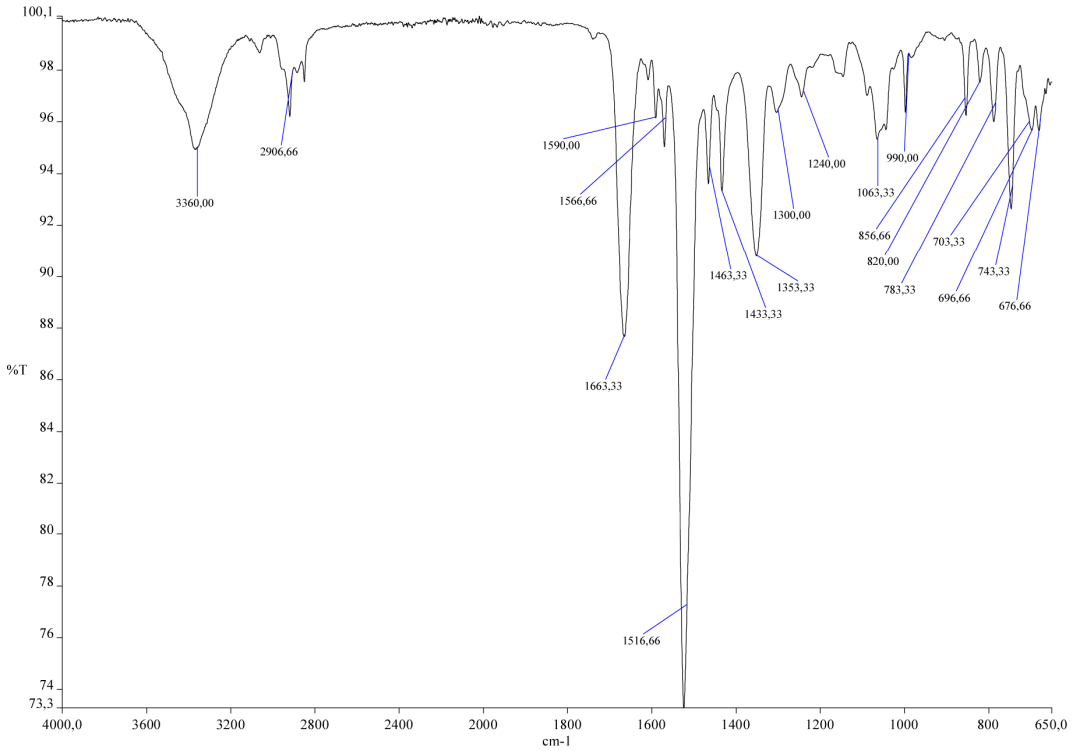


*Abbildung 80: IR Spektrum von 3-(2-Nitrophenyl)-3-(picolinamido)-1-propanol (**50**) gemessen in Chloroform-d.*

N-(1-(2-Nitrophenyl)-3-((pyridin-2-ylmethyl)amino)propyl)picolinamid (3gcage, 41)

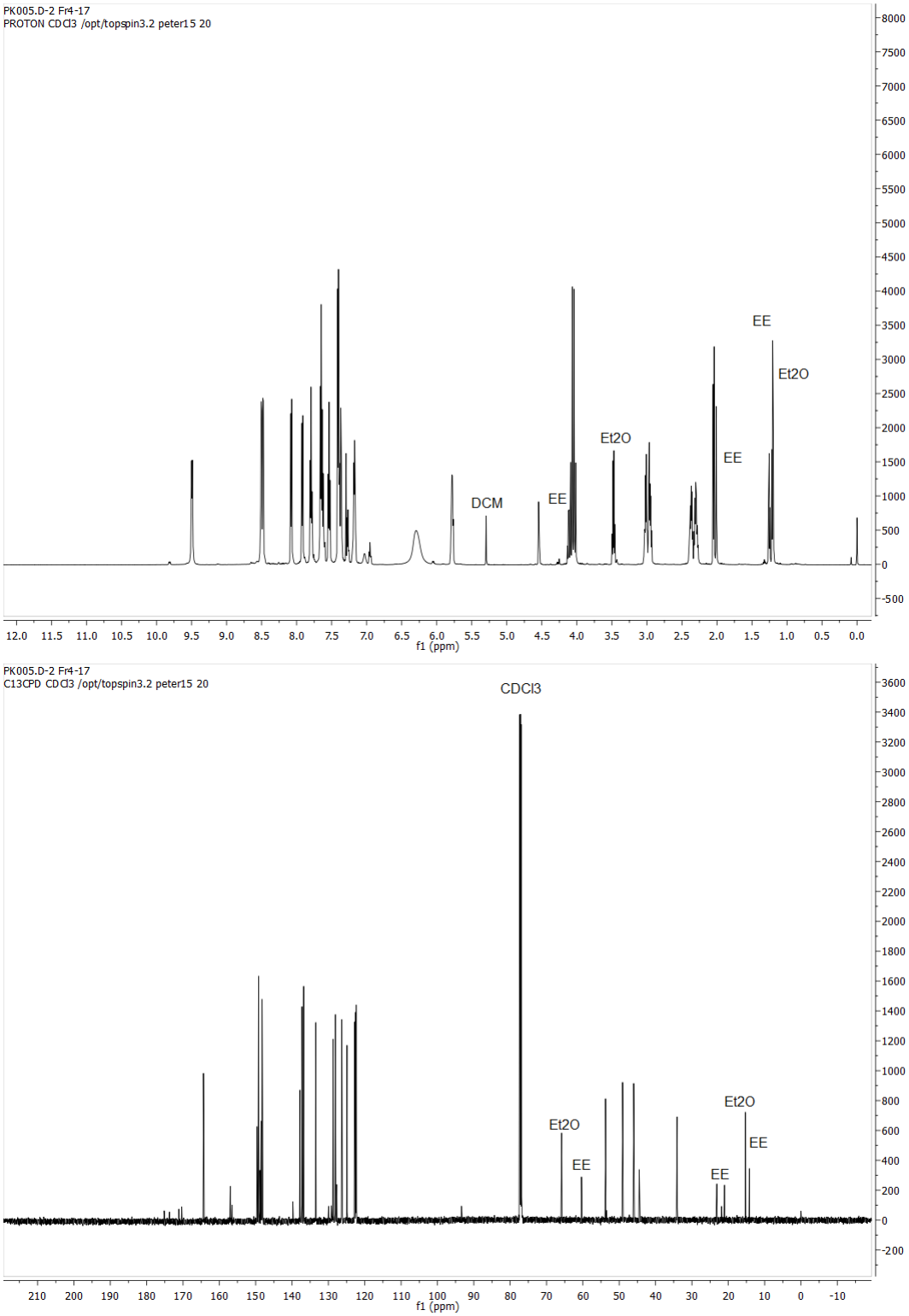


*Abbildung 81: NMR Spektren [oben: ^{1}H (600 MHz), unten: ^{13}C (151 MHz)] von N-(1-(2-Nitrophenyl)-3-((pyridin-2-ylmethyl)amino)propyl)picolinamid (**3gcage, 41**) gemessen in Chloroform-d.*

7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-cumarin (56)

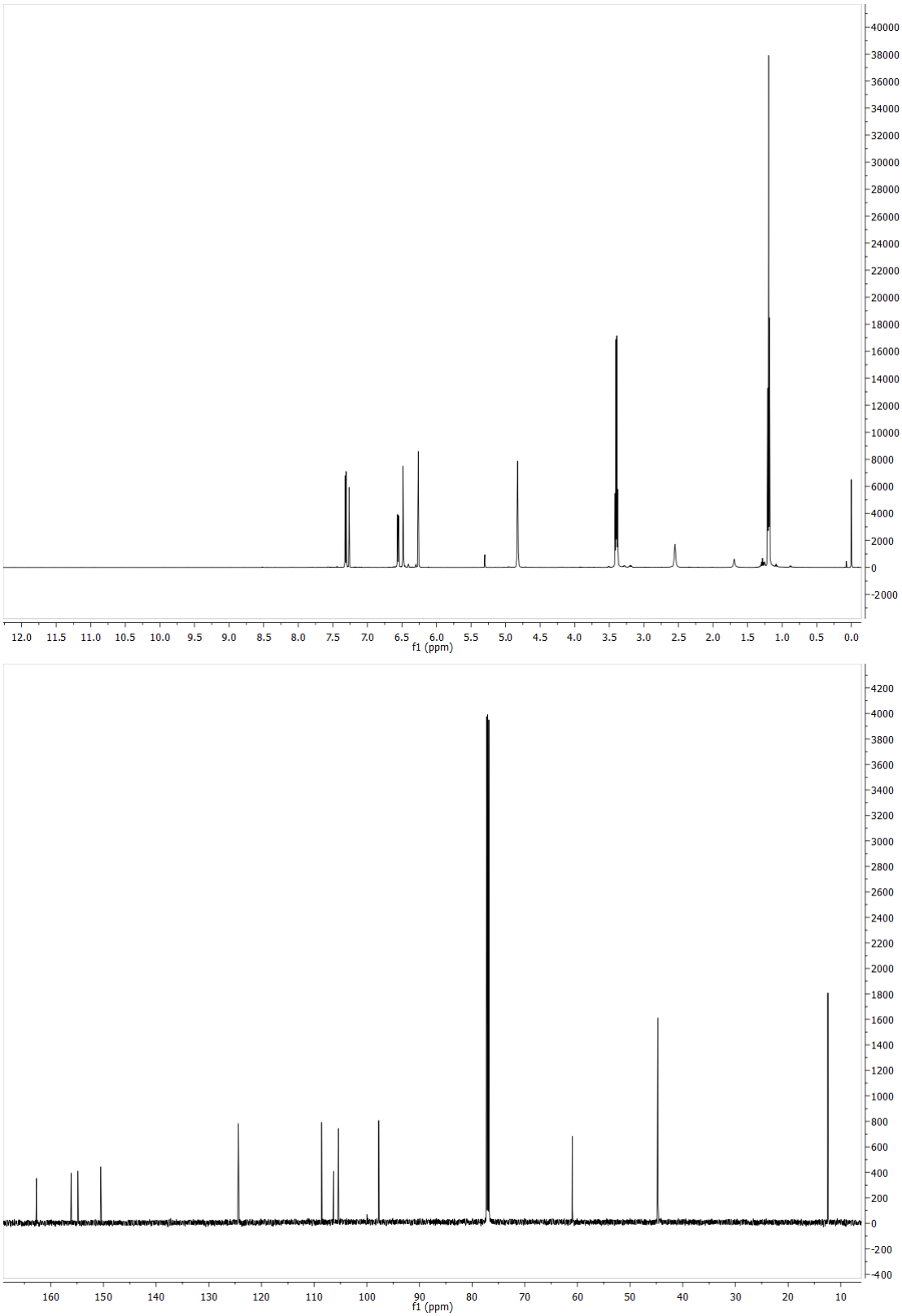


*Abbildung 82: NMR Spektren [oben: ^{1}H (600 MHz), unten: ^{13}C (151 MHz)] von 7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-cumarin (**56**) gemessen in Chloroform-d.*

1,2-Diaminoethane-*N*,*N'*-di(7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-cumarinyl)acetat-*N*,*N'*-diessigsäure (*caged*-EDTA, 58)

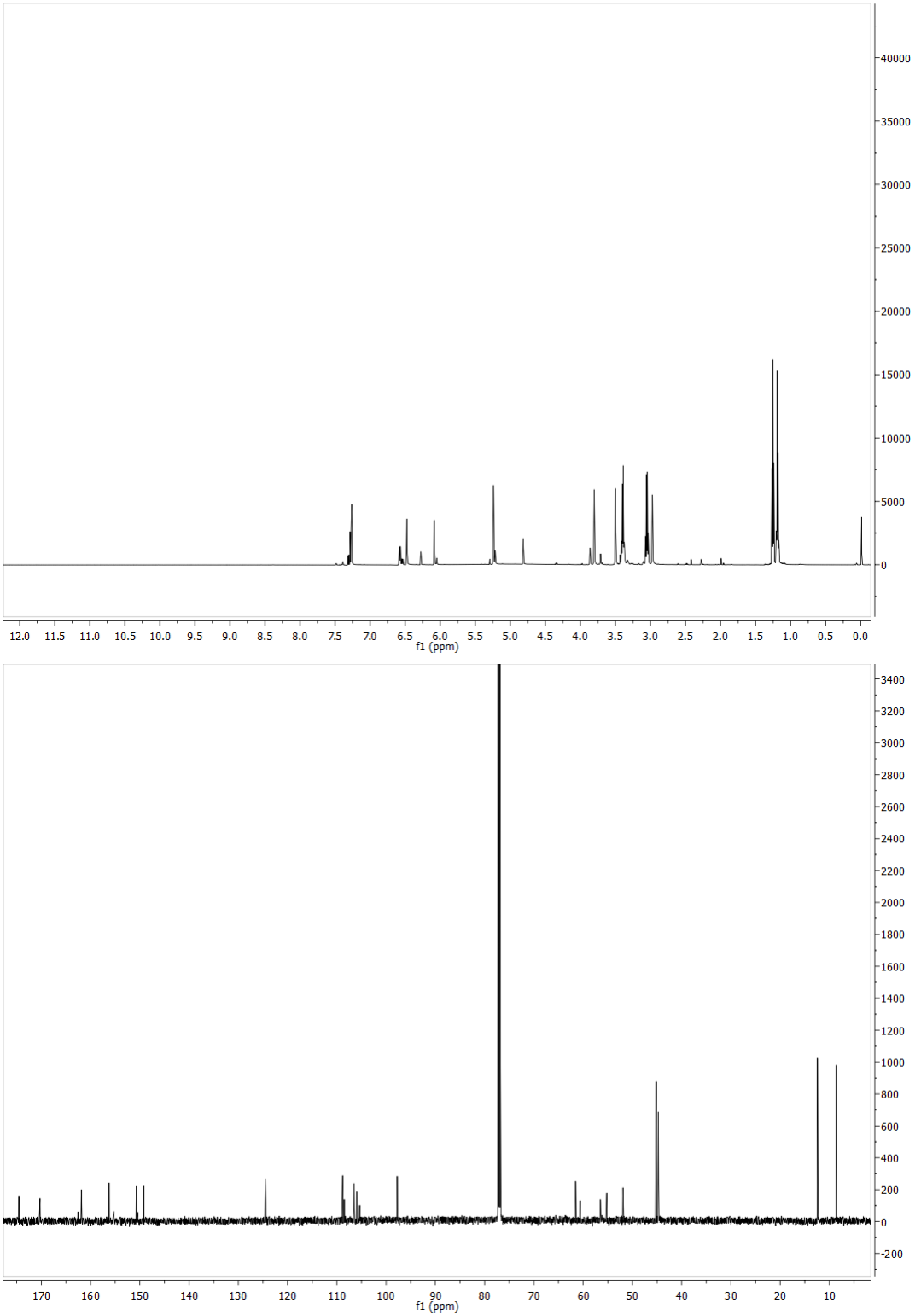


*Abbildung 83: NMR Spektren [oben: ^{1}H (600 MHz), unten: ^{13}C (151 MHz)] von 1,2-Diaminoethane-N,N'-di(7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-cumarinyl)acetat-N,N'-diessigsäure (caged-EDTA, 5**8**) gemessen in Chloroform-d.*

(*S*)-*N*-(4,5-Dimethyl-2-nitrobenzyl-oxycarbonyl)-methionin (*caged*-Met, 61)

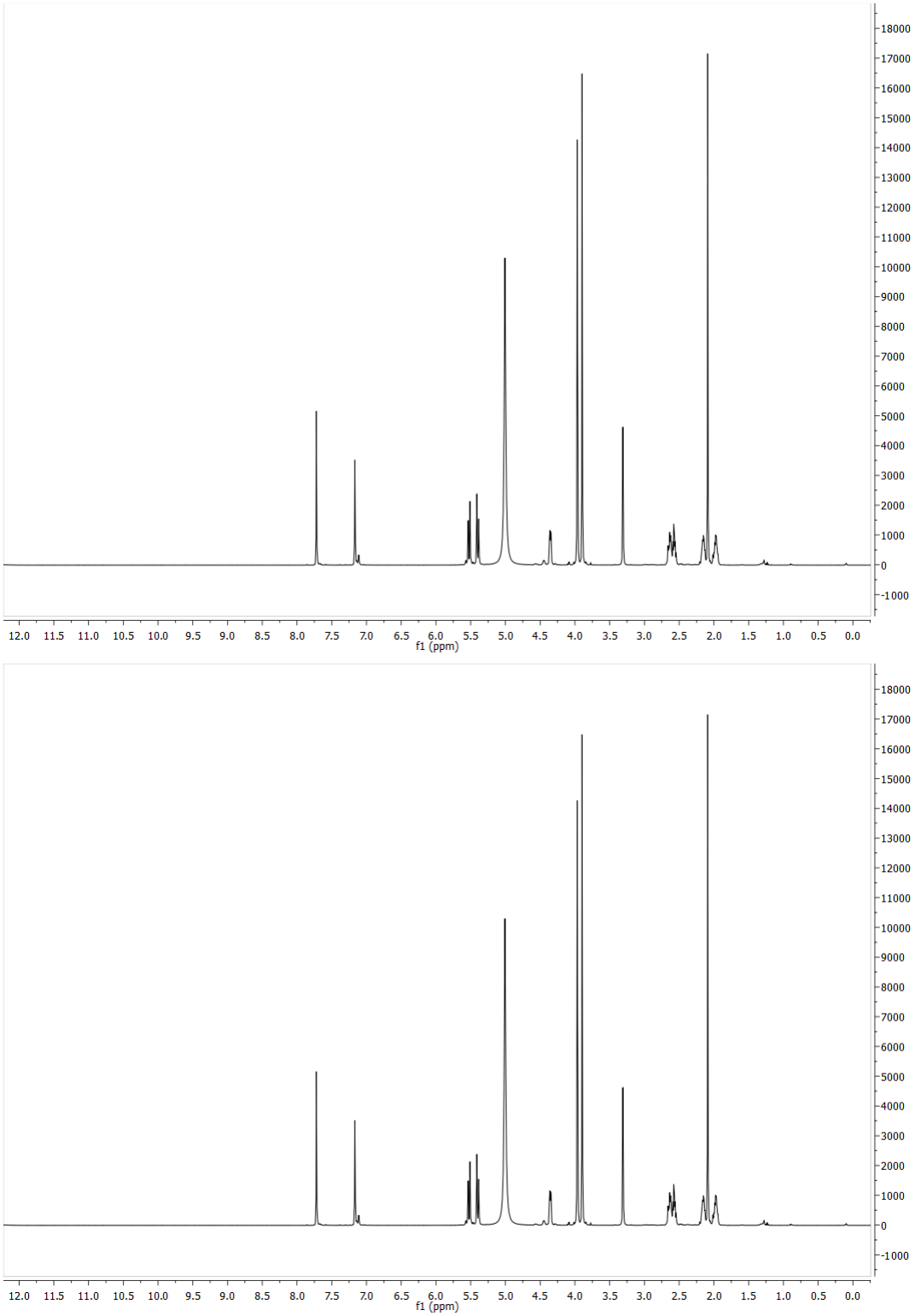


*Abbildung 84: NMR Spektren [oben: ^{1}H (600 MHz), unten: ^{13}C (151 MHz)] von (S)-N-(4,5-Dimethyl-2-nitrobenzyl-oxycarbonyl)-methionin (caged-Met, **61**) gemessen in Methanol-d4.*

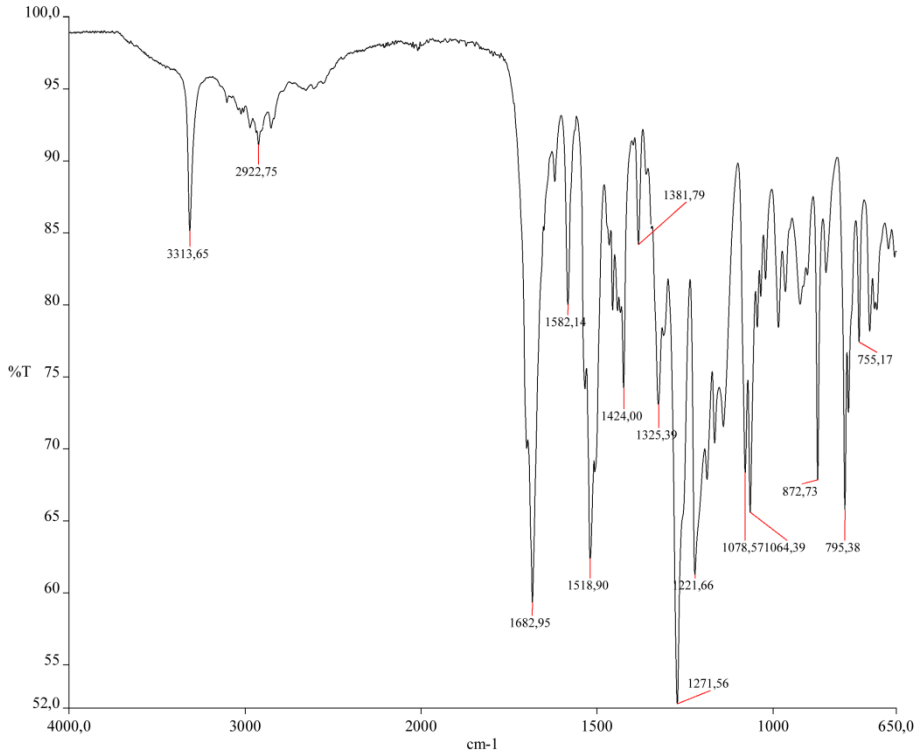


*Abbildung 85: IR Spektrum von (S)-N-(4,5-Dimethyl-2-nitrobenzyl-oxycarbonyl)-methionin (caged-Met, **61**) gemessen in Methanol-d4.*

Anteil am Manuskript eigener Publikationen

„Optische Genregulation in Mikrobioreaktoren“, P. M. Kusen, K. Hoffmann, G. Wandrey, J. Büchs, J. Pietruszka, *BioSpektrum*, **2017**, *23*, 643-645

Der oben genannte Übersichtsartikel wurde unter meiner Koordination angefertigt, was die Erstellung des Manuskriptes und ein Großteil der dazugehörigen Literaturrecherche beinhalteten. Zusätzlich wurden die Abbildungen 1, A und C sowie Abbildung 2 A - E von mir angefertigt. Die Daten der Abbildungen 2 A-E wurden hierzu von Dr. Georg Wandrey zur Verfügung gestellt.

„Light-controlled gene expression in yeast using photocaged Cu^{2+}“, P. M. Kusen, G. Wandrey, V. Krewald, M. Holz, S. Meyer zu Berstenhorst, J. Büchs, J. Pietruszka, *J. Biotechnol.* **2017**, *258*, 117-125.

Die in diesem Artikel beschriebene Methode – zusammengefasst als lichtvermittelte Genregulation eines *CUP1*-Promotor-kontrollierten YFP-Gens unter Anwendung des DMNP-EDTA-Cu^{2+} Komplexes – wurde von mir konzeptioniert.

Des Weiteren wurden alle molekularbiologischen Arbeiten zur Konstruktion des *Saccharomyces cerevisiae* pIE3-*pCUP1-YFP* Reporterstammes von mir durchgeführt. Danach wurden erste *proof of concept* Experimente zur Etablierung der lichtvermittelten Genregulation mittels DMNP-EDTA-Cu^{2+} und den dazugehörigen Kultivierungsbedingungen sowie zur Charakterisierung der $CuCl_2$-vermittelten Induktion von mir durchgeführt. Die Erkenntnisse daraus bildeten die Grundlage für die Experimente der präsentierten Daten zur lichtvermittelten Genregulation und zur $CuCl_2$-vermittelten Induktion, welche von Dr. Georg Wandrey durchgeführt wurden. Darüber hinaus wurden die Experimente zur spektroskopischen Charakterisierung und zur Ermittlung der photochemischen Eigenschaften von DMNP-EDTA-Cu^{2+} inklusive der Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten, der Quantenausbeute und der Zeit für die halbmaximale photolytische Spaltung von mir durchgeführt. Die Absorptionsspektren von $CuCl_2$ in

unterschiedlichen Pufferlösungen sowie die Abbildung 1 wurden ebenfalls durch mich erstellt.

Ausführliche Manuskriptentwürfe zur Beschreibung und Interpretation dieser Experimente sowie zur Einleitung, Diskussion und Schlussfolgerung wurden ebenfalls von mir beigetragen. Dies beinhaltet auch eine umfangreiche Literaturrecherche meinerseits zu den Themen dieses Artikels.

„Optogenetic Regulation of Tunable Gene Expression in Yeast Using Photo-Labile Caged Methionine", P. M. Kusen, G. Wandrey, C. Probst, A. Grünberger, M. Holz, S. Meyer zu Berstenhorst, D. Kohlheyer, J. Büchs, J. Pietruszka, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2915–2922.

Die in diesem Artikel beschriebene Methode – zusammengefasst als lichtvermittelte Genregulation eines *MET17*-Promotor-kontrollierten YFP-Gens unter Anwendung von NVOC-Methionin – wurde von mir konzeptioniert.

Darüber hinaus wurden alle molekularbiologischen Arbeiten zur Konstruktion des *Saccharomyces cerevisiae* pIE3-*pMET17-YFP* Reporterstammes von mir durchgeführt. Danach wurden erste *proof of concept* Experimente zur Etablierung der lichtvermittelten Genregulation mittels NVOC-Methionin und den dazugehörigen Kultivierungsbedingungen sowie zur Charakterisierung der Methionin-vermittelten Repression von mir durchgeführt. Die Erkenntnisse daraus bildeten die Grundlage für die Experimente der präsentierten Daten zur lichtvermittelten Genregulation und zur Methionin-vermittelten Induktion, welche von Dr. Georg Wandrey durchgeführt wurden. Desweitern wurde die chemische Synthese von NVOC-Methionin von mir etabliert und anschließende Untersuchungen zu Stabilität durchgeführt. Zusätzlich wurde das Absorptionsspektrum und die Photolysekinetik von NVOC-Methionin von mir ermittelt.

Das Manuskript zur Beschreibung und Interpretation dieser Experimente sowie zur Einleitung, Diskussion und Schlussfolgerung wurden ebenfalls von mir verfasst. Dies beinhaltet auch eine ausführliche Literaturrecherche zu den Themen dieses Artikels sowie die Erstellung der Abbildung 1 und 2 sowie Überarbeitung von Abbildung 3, 5 und 6.

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die vorliegende Dissertation wurde ausschließlich an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt. Es wurde zuvor kein weiterer Promotionsversuch unternommen.

_____

Peter Martin Kusen

Düsseldorf, den 05.01.2017