



**Etablierung eines neuen
T7 RNA-Polymerase-abhängigen Expressionssystems
zur koordinierten Expression aller Gene einer Genregion**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Annette Markert
aus Bergisch-Gladbach

Düsseldorf, Dezember 2008

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger
Korreferent: Prof. Dr. Michael Bott
Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2009

Patentanmeldungen im Rahmen der Promotion

Drepper, T., Jaeger, K.-E., Markert, A., Rosenau, F., Wilhelm, S. (2007)
Verfahren und Gen-Kassetten zur Klonierung, Integration und Expression mehrerer Gene eines Genclusters
DE 10 2007 048 134.0

Drepper, T., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Heck, A., Jaeger, K.-E., Katzke, N., Markert, A., Svensson, V. (2008)
Verfahren und Vektor zur heterologen Genexpression
DE 10 2008 013 304.3

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Heck, A., Markert, A., Svensson, V., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2009)
A novel T7-polymerase dependent broad host range expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Manuskript in Vorbereitung.

Markert, A., Arvani, S., Jaeger, K.-E., Drepper, T. (2009)
Functional overexpression of the uptake hydrogenase in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Manuskript in Vorbereitung.

Markert, A., Rosenau, F., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E., Drepper, T. (2009)
Construction of a novel T7 RNA-polymerase-based expression system for the functional overexpression of clustered genes. Manuskript in Vorbereitung.

Posterpräsentationen

Markert, A., Rosenau, F., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2007)
Functional metagenomics to identify novel biocatalysts: Construction of a multi-gene expression system. *Book of Abstracts*, Prokagenomics, Göttingen, p. 173.

Markert, A., Arvani, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Eggert, T., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2008)
Functional metagenomics to identify novel biocatalysts: Construction of a multi-gene expression system. *Biospektrum: Sonderausgabe zur VAAM Jahrestagung 2008*, p. 153.

Markert, A., Arvani, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Eggert, T., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2008)
Functional metagenomics to identify novel biocatalysts: Construction of a multi-gene expression system. *Book of Abstracts*, Workshop „Functional Genomics and Industrial Biotechnology“, Graz, p. 19.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger danke ich für die interessante Themenstellung und die guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie. Darüber hinaus möchte ich mich für das stetige Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie die konstruktiven Diskussionen in den letzten Jahren bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Bott danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei dem Bundesministerium für Bildung und Forschung bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des geförderten Projektes: „GenoMik-Plus, Genomforschung an Mikroorganismen für industrielle Produktion, Ernährung, Umwelt und Gesundheit“.

Mein besonderer Dank gilt dem besten Arbeitsgruppenleiter Dr. Thomas Drepper, der jederzeit ein engagierter Diskussionspartner war und mir zahllose wertvolle Ratschläge gab.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IMET, vor allem aus den Laboren 306 und 409 und insbesondere Alexander Schulz, Achim Heck, Stefanie Serci und Janina Knorr, für die gute Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft während der gesamten Promotionszeit bedanken.

Meiner Diplomandin Anita Loeschke danke ich für die großen Fortschritte, die sie mit dem IVAC-Expressionssystem erzielt hat.

Für die intensive Unterstützung und Begleitung während meiner gesamten Promotionszeit möchte ich Carsten, Janine, Daniela und Lea danken.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern und Schwestern Dorothee und Caroline bedanken, die jederzeit für mich da waren und mich immer unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	V
Abkürzungen	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Expressionssysteme.....	1
1.1.1 Bakterielle Expressionssysteme	2
1.1.2 Limitierungen der bakteriellen Expressionssysteme.....	4
1.2. Bakterielle Naturstoffe	10
1.3. Beschreibung verschiedener Genkluster mit biotechnologischem Potenzial.....	13
1.3.1 Der Hydrogenase-Genkluster aus <i>R. capsulatus</i>	13
1.3.2 Der Prodigiosin-Genkluster aus <i>S. marcescens</i>	16
1.4 Das „ <i>in vivo auto cloning and expression</i> “-System	19
1.4.1 Die Markierung eines Genklusters durch die IVAC-Kassetten	21
1.4.2 Der Transfer des markierten Genklusters in einen heterologen Bakterienstamm durch Konjugation	22
1.4.3 Die stabile Integration des Genklusters in die chromosomale DNA des Rezipientenstammes durch Transposition	23
1.4.4 Die T7 RNA-Polymerase abhängige Expression des Genklusters.....	24
1.5 Zielsetzung	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Chemikalien und Enzyme	26
2.2 Bakterienstämme	26
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	26
2.2.2 <i>Pseudomonas putida</i>	26
2.2.3 <i>Rhodobacter capsulatus</i>	27
2.2.4 <i>Serratia marcescens</i>	27
2.3 Vektoren und Plasmide	27
2.4 Oligonukleotide.....	28
2.5 Nährmedien und Zusätze.....	31
2.5.1 Nährmedien für <i>E. coli</i> , <i>P. putida</i> und <i>S. marcescens</i>	31
2.5.2 Medien für <i>R. capsulatus</i>	31
2.5.3 Antibiotika.....	32

2.6 Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	33
2.6.1 Anzucht von <i>E. coli</i> , <i>P. putida</i> und <i>S. marcescens</i>	33
2.6.2 Phototrophe Anzucht von <i>R. capsulatus</i> unter Starklichtbedingungen.....	33
2.6.3 Aerobe Anzucht von <i>R. capsulatus</i> im Dunkeln.....	33
2.7 Isolierung von Nukleinsäuren.....	33
2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	33
2.7.2 Isolierung von chromosomaler DNA.....	34
2.8 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	34
2.9 <i>In-vitro</i> -Rekombination von DNA.....	34
2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.11 <i>Real-time</i> PCR.....	34
2.11.1 Isolierung von RNA.....	34
2.11.2 Synthese der cDNA (reverse Transkription).....	35
2.11.3 <i>Real-time</i> PCR.....	35
2.12 Sequenzierung von DNA.....	35
2.13 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	35
2.14 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation und Transposition.....	35
2.14.1 Konjugation von <i>E. coli</i> S17-1 mit <i>P. putida</i> und Transposition.....	35
2.14.2 Konjugation von <i>E. coli</i> S17-1 mit <i>R. capsulatus</i> und Transposition.....	36
2.15 Gewinnung von Gesamtzellextrakten.....	36
2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.17 Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	36
2.18 Messung der Fluoreszenz von GFP und YFP.....	37
2.19 Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität (ONPG-Test).....	37
2.20 Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität.....	37
2.21 Messung von Absorptionsspektren.....	38
2.22 Bestimmung der relativen Prodigiosin-Produktion.....	38
2.23 ESI-FTICR-MS.....	38
2.24 Computerprogramme und Online-Datenbanken.....	38
3. Ergebnisse	39
I. Die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression aller Gene eines Genclusters	39
3.1 Die Etablierung eines neuen Expressionssystems zur koordinierten Expression aller Gene eines Genclusters.....	39

3.1.1 Konstruktion eines T7 RNA-Polymerase-basierten Expressionssystems in <i>R. capsulatus</i>	41
3.1.2 Analyse der T7 RNA-Polymerase-abhängigen Transkription des Hydrogenase- Genklusters in <i>R. capsulatus</i>	44
3.1.3 Einfluss der verstärkten Transkription des Hydrogenase-Genklusters auf die funktionelle Synthese der Hydrogenase	53
II. Das IVAC-Expressionssystem	56
3.2 Konstruktion des „ <i>in vivo auto cloning and expression</i> “-Systems (IVAC-System).....	56
3.3 Analyse der T7 RNA-Polymerase-abhängigen Transkription von Genen mit dem IVAC-Expressionssystem	59
3.3.1 Überprüfung der Funktionalität der in den IVAC-Kassetten lokalisierten T7- Promotoren	59
3.3.2 Einfluss der gegensätzlich angeordneten T7-Promotoren auf die Expression eines Zielgens	64
3.4 Die IVAC-vermittelte Integration und heterologe Expression eines Genklusters in den Bakterienstämmen <i>Pseudomonas putida</i> und <i>Rhodobacter capsulatus</i> am Beispiel des <i>lac</i> -Operons.....	70
3.4.1 Nachweis der IVAC-vermittelten Übertragung und Transposition des <i>lac</i> -Operons in die heterologen Wirtsstämmen <i>P. putida</i> und <i>R. capsulatus</i>	72
3.4.2 Analyse der T7 RNA-Polymerase-abhängigen Expression des <i>lac</i> -Operons mit dem IVAC-System.....	73
3.4.3 Untersuchung der IVAC-vermittelten funktionellen Expression des <i>lac</i> -Operons in den heterologen Wirtsstämmen <i>P. putida</i> und <i>R. capsulatus</i>	77
3.5 Die IVAC-abhängige Synthese von Prodigiosin in den heterologen Wirtsstämmen <i>E. coli</i> , <i>P. putida</i> und <i>R. capsulatus</i>	83
3.5.1 Die Isolierung des <i>pig</i> -Klusters aus <i>S. marcescens</i> und die Konstruktion der Vektoren pL>PIG<R und pR>PIG<L.....	84
3.5.2 Die IVAC-abhängige Synthese von Prodigiosin in dem heterologen Bakterienstamm <i>E. coli</i>	87
3.5.3 Die IVAC-abhängige Synthese von Prodigiosin in dem heterologen Bakterienstamm <i>R. capsulatus</i>	92
3.5.4 Die IVAC-abhängige Synthese von Prodigiosin in dem heterologen Bakterienstamm <i>P. putida</i>	96

4. Diskussion	105
4.1 Das IVAC-Expressionssystem	105
4.1.1 Die Integration der IVAC-Kassetten neben einem Gencluster	105
4.1.2 Mobilisierung des von den IVAC-Kassetten flankierten Genclusters bei einer Konjugation	106
4.1.3 Transfer des Genclusters in die chromosomale DNA des Rezipientenstammes durch Transposition	107
4.1.4 Die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression des Genclusters	109
4.2 Die T7 RNA-Polymerase-abhängige Transkription von Genen eines komplexen Genclusters	111
4.3 Die IVAC-vermittelte Transkription von Genen mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase .	113
4.4 Die IVAC-vermittelte Integration und heterologe Expression von Genen eines Genclusters	115
4.4.1 Die heterologe Expression der Gene des <i>lac</i> -Operons in den heterologen Bakterienstämmen <i>P. putida</i> und <i>R. capsulatus</i>	115
4.4.2 Die heterologe Synthese von Prodigiosin	118
4.4.3 Die heterologe Synthese von Zeaxanthin	120
5. Zusammenfassung	124
6. Summary	126
7. Literatur	128
8. Anhang	140

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1.1	Strukturformeln verschiedener Naturprodukte.	12
Abb. 1.2	Struktur der kleinen (HupS) und großen (HupL) Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase aus <i>Desulfovibrio gigas</i> .	14
Abb. 1.3	Schematische Darstellung des Hydrogenase-Genklusters aus <i>R. capsulatus</i> .	15
Abb. 1.4	Schematische Darstellung des Biosyntheseweges von Prodigiosin in <i>Serratia marcescens</i> .	17
Abb. 1.5	Schematische Darstellung des Prodigiosin-Genklusters aus <i>Serratia marcescens</i> .	18
Abb. 1.6	Schematische Darstellung der neuen IVAC-Technologie.	20
Abb. 1.7	Schematische Darstellung der L-IVAC- und der R-IVAC-Kassette.	21
Abb. 3.1	Schematische Darstellung des Hydrogenase-Genklusters aus <i>R. capsulatus</i> und Konstruktion der Expressionsstämme P _{T7} >hup und PaphII>hup.	43
Abb. 3.2	Schematische Darstellung des Vektors pML5-Pfru-T7.	43
Abb. 3.3	Nachweis der Transkription des Hydrogenase-Genklusters in dem <i>R. capsulatus</i> Wildtypstamm B10S.	45
Abb. 3.4	Überprüfung der einzelnen Primerpaare, die in der reversen Transkription zum Nachweis der Transkription des Hydrogenase-Genklusters im <i>R. capsulatus</i> Wildtypstamm B10S eingesetzt wurden.	47
Abb. 3.5	Nachweis der Transkription des Hydrogenase-Genklusters in den <i>R. capsulatus</i> -Stämmen (a) PaphII>hup und (b) P _{T7} >hup.	49
Abb. 3.6	Nachweis der T7 RNA-Polymerase-abhängigen Transkription des Hydrogenase-Genklusters in dem <i>R. capsulatus</i> -Stamm P _{T7} >hup mit T7 RNA-Polymerase.	51
Abb. 3.7	Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität in verschiedenen <i>R. capsulatus</i> -Stämmen.	54
Abb. 3.8	(A) Schematischer Aufbau der L-IVAC-Kassette (B) Schematische Darstellung der Konstruktion der L-IVAC-Kassette.	57
Abb. 3.9	(A) Schematischer Aufbau der R-IVAC-Kassette. (B) Schematische Darstellung der Konstruktion der R-IVAC-Kassette.	58
Abb. 3.10	Schematische Darstellung der Vektoren pL>GFP und pR>GFP.	60
Abb. 3.11	Untersuchung der Transkription von <i>gfp</i> in verschiedenen <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Stämmen.	62
Abb. 3.12	Bestimmung der T7 RNA-Polymerase-abhängigen Fluoreszenz von GFP in <i>E. coli</i> BL21(DE3).	63
Abb. 3.13	Schematische Darstellung der möglichen limitierenden Faktoren der IVAC-vermittelten Expression von Genen.	64
Abb. 3.14	Schematische Darstellung der Vektoren pL>GFP<R und pR>GFP<L.	65
Abb. 3.15	Nachweis der Transkription des Gens <i>gfp</i> in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen.	67

Abb. 3.16	Vergleich der T7 RNA-Polymerase-abhängigen Expression des Gens <i>gfp</i> in verschiedenen <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Stämmen.	69
Abb. 3.17	Schematische Darstellung der Vektoren pL>lacZYA<R und pR>lacZYA<L.	71
Abb. 3.18	Schematische Darstellung der IVAC-vermittelten Expression von Genen eines Genklusters.	73
Abb. 3.19	Nachweis der IVAC-vermittelten Expression aller Gene des <i>lac</i> -Operons in den heterologen Bakterienstämmen <i>P. putida</i> und <i>R. capsulatus</i> .	75
Abb. 3.20	Nachweis der IVAC-vermittelten Synthese der β -Galaktosidase in verschiedenen heterologen <i>P. putida</i> -Expressionsstämmen.	79
Abb. 3.21	Nachweis der IVAC-vermittelten Synthese der β -Galaktosidase in verschiedenen heterologen <i>R. capsulatus</i> -Expressionsstämmen.	81
Abb. 3.22	Schematische Darstellung der Konstruktion des Vektors pPIG.	85
Abb. 3.23	Schematische Darstellung der Vektoren pL>PIG<R und pR>PIG<L.	86
Abb. 3.24	Die heterologe Synthese von Prodigiosin in <i>E. coli</i> .	87
Abb. 3.25	Nachweis der Transkription der <i>pig</i> -Gene in dem heterologen Bakterienstamm <i>E. coli</i> BL21(DE3).	89
Abb. 3.26	Identifizierung des synthetisierten Pigments in dem heterologen Bakterienstamm <i>E. coli</i> .	90
Abb. 3.27	Bestimmung der relativen Prodigiosin-Produktion in <i>S. marcescens</i> im Vergleich zu der Prodigiosin-Produktion in dem heterologen Wirtsstamm <i>E. coli</i> .	91
Abb. 3.28	Nachweis der Transkription der <i>pig</i> -Gene in dem heterologen Bakterienstamm <i>R. capsulatus</i> ::L>PIG<R.	93
Abb. 3.29	Überprüfung der Prodigiosin-Produktion in dem heterologen Bakterienstamm <i>R. capsulatus</i> .	95
Abb. 3.30	Die heterologe Synthese von Prodigiosin in <i>P. putida</i> .	97
Abb. 3.31	Nachweis der Transkription des <i>pig</i> -Klusters in dem heterologen Wirt <i>P. putida</i> ::R>PIG<L.	98
Abb. 3.32	Nachweis der Prodigiosin-Synthese in dem heterologen Bakterienstamm <i>P. putida</i> .	101
Abb. 3.33	Ergebnis der ESI-Massenspektrometrie zum Nachweis der Prodigiosin-Synthese in dem heterologen Bakterienstamm <i>P. putida</i> .	102
Abb. 3.34	Bestimmung der relativen Prodigiosin-Produktion in <i>S. marcescens</i> (<i>Sm</i>) und in dem heterologen Wirt <i>P. putida</i> .	104
Abb. 4.1	Schematische Darstellung des Univektor-Plasmid-Fusions-Systems (UPS).	106
Abb. 4.2	Schematische Übersicht über fünf Expressionssysteme.	110
Abb. 4.3	Schematische Darstellung der Transkription der Gene des <i>lac</i> -Operons in dem heterologen Bakterienstamm <i>P. putida</i> unter (a) uninduzierten (- IPTG) und (b) induzierten Bedingungen (+ IPTG).	117
Abb. 4.4	Ergebnis der heterologen Produktion von Prodigiosin in <i>E. coli</i> und <i>P. putida</i> .	120
Abb. 4.5	Schematische Darstellung des <i>crt</i> -Klusters aus <i>P. ananatis</i> .	121
Abb. 4.6	Carotinoid-Biosyntheseweg aus <i>P. ananatis</i> .	122

Abb. 4.7	Nachweis der IVAC-vermittelten Carotinoid-Synthese in <i>P. putida</i> mittels Dünnschichtchromatographie.	123
Abb. 8.1	Schematische Darstellung der Konstruktion des Vektors pIC20HRL.	140
Abb. 8.2	Klonierungsschema zur Konstruktion des Vektors pL>GFP.	141
Abb. 8.3	Schema zur Konstruktion des Vektors pR>GFP.	142
Abb. 8.4	Schema der Klonierung der IVAC-Kassetten in den Vektor pSWGFP.	143
Abb. 8.5	Schema der Konstruktion des Vektors pASK-lac.	144
Abb. 8.6	Klonierungsschema zur Konstruktion der Vektoren pL>lacZYA<R und pR>lacZYA<R.	145
Abb. 8.7	Klonierungsstrategie zur Konstruktion der Vektoren pL>PIG<R und pR>PIG<L.	146

Tabellen

Tab. 2.1	Übersicht über die verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme.	26
Tab. 2.2	Übersicht über die verwendeten <i>P. putida</i> -Stämme.	26
Tab. 2.3	Übersicht über die verwendeten <i>R. capsulatus</i> -Stämme.	27
Tab. 2.4	Verwendeter <i>S. marcescens</i> -Stamm.	27
Tab. 2.5	Übersicht über die verwendeten Vektoren.	27
Tab. 2.6	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.	28
Tab. 2.7	Endkonzentrationen der zur Selektion verwendeten Antibiotika.	32
Tab. 3.1	Veränderung der Transkription einzelner Hydrogenase-Gene durch die artifizielle Expression des Hydrogenase-Klusters mit einem zusätzlichen bakteriellen (<i>PaphII</i> >hup) bzw. viralen Promotor ($P_{\tau 7}$ >hup) im Vergleich zu dem <i>R. capsulatus</i> Wildtyp.	52
Tab. 3.2	Nachweis der IVAC-vermittelten Synthese der Sense- und Antisense-RNA der Gene des <i>lac</i> -Operons in den heterologen Bakterienstämmen <i>P. putida</i> ::L>lac<R, <i>P. putida</i> ::R>lac<L, <i>R. capsulatus</i> ::L>lac<R und <i>R. capsulatus</i> ::R>lac<L.	76

Abkürzungen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt. Ausgenommen sind die in der deutschen Sprache üblichen Abkürzungen und SI-Einheiten.

λ	Wellenlänge
μ	Micro
A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
C	Celsius
Da	Dalton
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5`-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPG	Eppendorfgefäß
EtBr	Ethidiumbromid
Fe	Eisen
g	Gramm
Gm	Gentamycin
GZE	Gesamtzellextrakt
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
L	Liter
LB	Luria-Bertani Broth

M	molar
min	Minute
MW	Molekulargewicht
O.D.	optische Dichte
ONPG	Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
ORF	offener Leserahmen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
Sec	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sm	Streptomycin
Spc	Spectinomycin
Tab.	Tabelle
Tc	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	Unit
ÜK	Übernachtskultur
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indodyl- β -D-Galaktopyranosid

1. Einleitung

1.1 Expressionssysteme

Mikroorganismen produzieren eine große Anzahl von Naturstoffen, die für die Biotechnologie und Medizin von Bedeutung sind (Wenzel & Müller, 2005). Mehr als 75% aller Antibiotika und nahezu 50% aller Medikamente, die zurzeit gegen Krebs eingesetzt werden, sind ursprünglich Naturstoffe aus Mikroorganismen oder deren Derivate (Newman *et al.*, 2003; Bode & Müller, 2005). Zu den natürlich gebildeten Stoffwechselprodukten der Bakterien zählen u. a. Antibiotika, Fungizide, Virustatika und Zytostatika (Ligon *et al.*, 2000; Clardy *et al.*, 2006; Newman & Cragg, 2007).

Beinahe täglich werden durch Metagenom- und Screeningverfahren neue Gene identifiziert, die für die Synthese ungewöhnlicher Stoffwechselprodukte mit biomedizinischem Potenzial verantwortlich sind (Thomson *et al.*, 2004; Streit *et al.*, 2004; Newman & Cragg, 2007). Dabei zeigt sich, dass für die Synthese solcher Stoffwechselprodukte häufig eine größere Anzahl verschiedener Enzyme benötigt wird, die gemeinsam einen Enzymkomplex oder *metabolic pathway* bilden. Die Gene, die für solche Enzymsysteme kodieren, liegen meistens in großen funktionellen Klustern auf dem Chromosom des natürlichen Produktionsstammes vor (Tang *et al.*, 2000; Wenzel *et al.*, 2005a; Dürr *et al.*, 2006). Einige dieser Genkluster weisen einen komplizierten Aufbau auf und bestehen aus verschiedenen Operons, die in unterschiedlichen Transkriptionsrichtungen angeordnet sind (Binz *et al.*, 2008).

Aufgrund des biotechnologischen und medizinischen Potenzials der Naturstoffe wird ihre Herstellung in großen Mengen angestrebt. Die erfolgreiche Synthese der natürlichen Verbindungen wird jedoch häufig dadurch limitiert, dass die bakteriellen Produktionsstämme spezielle Anforderungen an ihre Kulturbedingungen stellen, lange Generationszeiten besitzen, oder dass wenig über die einzelnen Stämme bekannt ist (Zengler *et al.* 2002; Keller & Zengler, 2004). Viele Bakterien können, da sie z. B. aus Quellen stammen oder Symbionten von Schwämmen oder Korallen sind, unter Laborbedingungen überhaupt nicht kultiviert werden (Cragg & Newman, 2002; Riesenfeld *et al.*, 2004; Piel, 2004). Mit den Methoden, die standardmäßig im Labor angewendet werden, können nur etwa 1% aller Mikroorganismen angezogen werden (Amann *et al.*, 1995; Drepper *et al.*, 2006). Somit ist die heterologe Synthese solcher Verbindungen in alternativen Organismen oft die einzige Möglichkeit, um ein neues Stoffwechselprodukt in großen Mengen zu erhalten.

1.1.1 Bakterielle Expressionssysteme

Für die heterologe Synthese von Naturstoffen wurden zahlreiche Expressionssysteme entwickelt, die zumeist auf einem Vektor, der die zu exprimierenden Gene trägt, und einem heterologen Expressionsstamm basieren. Zu den heterologen Expressionsstämmen zählen Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilze, aber auch höhere Organismen wie Pflanzen oder Insekten (Cereghino & Cregg, 2000; Pfeifer & Khosla, 2001; Mori, 2002; Mungur *et al.*, 2005). Von besonderer Bedeutung ist dabei die Expression in prokaryotischen und eukaryotischen Mikroorganismen, da diese sich genetisch leicht manipulieren lassen, kurze Generationszeiten besitzen und kostengünstig zu kultivieren sind (Terpe, 2006). Im Gegensatz zu dem natürlichen Produktionsstamm zeichnet sich der heterologe Bakterienstamm u. a. durch anspruchslose Kulturbedingungen, ein schnelles Wachstum und eine sowohl technisch als auch genetisch gute Handhabbarkeit aus.

Grundsätzlich können bei der Synthese von Naturstoffen in heterologen Bakterienstämmen zwei unterschiedliche Wege beschritten werden: (a) Es ist möglich, die Gene in einem verwandten Expressionsstamm des natürlichen Produzenten zu exprimieren (Wenzel & Müller, 2005; Bode & Müller, 2005). Besteht zwischen dem natürlichen Produzenten und dem Expressionsstamm eine nahe Verwandtschaft, ähneln sich häufig auch die Promotorstrukturen, so dass die Gene relativ einfach exprimiert werden können. So konnte z. B. der *dpt*-Gencluster, der für das Antibiotikum Daptomycin kodiert, aus *Streptomyces roseosporus* erfolgreich in *Streptomyces lividans* exprimiert werden (Miao *et al.*, 2005). Der Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, dass für die funktionelle Expression ein verwandter und gut handhabbarer Expressionsstamm zur Verfügung stehen muss.

(b) Die heterologe Expression komplexer Gencluster kann in nicht-verwandten und etablierten Expressionsstämmen, wie z. B. *E. coli*, erfolgen (Kao *et al.*, 1994). So wurde z. B. das Siderophor Yersiniabactin aus *Yersinia pestis* erfolgreich in *E. coli* exprimiert (Pfeifer *et al.*, 2001; 2003). Die heterologe Expression von Genen in etablierten Expressionsstämmen bietet entscheidende Vorteile, jedoch werden die wirtsfremden Promotoren und regulatorischen Elemente in dem neuen Wirtsstamm häufig nicht erkannt und somit die Synthese der neuen Verbindung behindert.

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Synthese des Zielproteins in dem heterologen Bakterienstamm ist, dass alle Gene, die für die Biosynthese der neuen Verbindung benötigt werden, in den neuen Wirt übertragen werden. Dabei werden die Gene, die häufig in großen funktionellen Klustern auf dem Chromosom des natürlichen Produktionsstammes vorliegen,

durch grundsätzlich zwei Strategien in dem neuen Expressionsstamm integriert: (a) die Gene des Klusters werden einzeln in jeweils ein Plasmid inseriert und eine Kotransformation bzw. Koinfektion einer Zelle mit den verschiedenen Plasmiden wird durchgeführt, oder (b) die Gene liegen vollständig in einem Plasmid vor und werden so in den neuen Expressionsstamm übertragen. Die pET- und Shuttle-BAC-Vektoren sind zwei Beispiele für Expressionsvektoren, die zur heterologen Expression von Naturstoffen entwickelt wurden:

1. pET-Vektoren

Mit den pET-Vektoren der Firma Novagen wird die Koexpression von Proteinen in einer *E. coli*-Zelle möglich. Die pET-Vektoren besitzen eine Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker, einen *origin of replication*, ein oder zwei *multiple cloning sites* und T7 RNA-Polymerase-abhängige Promotoren, die vor den *multiple cloning sites* lokalisiert sind. Zusätzliche Komponenten der Vektoren können u. a. Tags oder Signalsequenzen für den Transport des Proteins ins Periplasma sein (Novagen, 2008). Durch eine gezielte Klonierung können bis zu zwei Gene in je einem pET-Vektor integriert werden. Wenn die Vektoren zueinander kompatible Antibiotikaresistenzen besitzen, können mehrere Gene in einer Bakterienzelle koexprimiert werden.

Die Anzahl der Gene, die auf diesem Weg in einer Zelle koexprimiert werden können, ist jedoch limitiert, da auch die Anzahl der kompatiblen Klonierungsvektoren, die in einer Zelle vorliegen können, begrenzt ist (Monti-Bragadin & Samer, 1975). Weitere Nachteile der pET-Vektoren sind, dass (a) die Expression auf *E. coli* als heterologen Bakterienstamm beschränkt ist, (b) ohne ständigen Selektionsdruck die Plasmide der Zelle verloren gehen und (c) die Proteinmengen aufgrund der unterschiedlichen Kopienzahlen der Plasmide variieren können.

2. Shuttle-BAC-Vektoren

Die Metagenome von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften bilden eine reiche Quelle für neue Biokatalysatoren (Daniel, 2004; Langer *et al.*, 2006). Da die Mikroorganismen häufig unter Laborbedingungen nicht kultiviert werden können, werden in der Metagenomforschung die Gene der Organismen direkt aus Umweltproben isoliert. Durch Hydrolyse der isolierten DNA mit Restriktionsendonukleasen entstehen DNA-Fragmente, die mit einem *bacterial artificial chromosome* (BAC) ligiert werden können und anschließend durch Transformation in *E. coli* übertragen werden (Schloss & Handelsman, 2003; 2005). Der BAC basiert auf dem F-Faktor aus *E. coli* und wurde ursprünglich im Rahmen des *human-genome*-Projekts entwickelt. Um die DNA-Fragmente nicht nur in *E. coli* zu exprimieren, sondern

auch in anderen heterologen Bakterienstämmen, die sich evtl. für die Synthese bestimmter Zielproteine besser eignen als *E. coli*, wurden Shuttle-BAC-Vektoren konstruiert (Mise & Avner, 2004; Martinez *et al.*, 2004). Die Shuttle-BAC-Vektoren basieren auf dem BAC-Vektor und können Inserts von mehr als 300 kb beinhalten (Shizuya *et al.*, 1992). In Shuttle-BAC-Vektoren sind entweder zusätzliche Replikationsurspünge enthalten, die in anderen Bakterienstämmen als *E. coli* erkannt werden, oder Transpositionselemente, um den BAC zusammen mit den zu exprimierenden Genen in das Genom des neuen Wirtsstammes stabil zu integrieren. Da die Promotoren der zu exprimierenden Gene in den heterologen Bakterienstämmen jedoch häufig nicht erkannt werden, ist ihre erfolgreiche Expression mit Hilfe der Shuttle-BAC-Vektoren auf einige wenige Wirtsstämme begrenzt.

1.1.2 Limitierungen der bakteriellen Expressionssysteme

Obwohl mit den beschriebenen Expressionssystemen die heterologe Synthese einer Vielzahl von Naturstoffen möglich wird, bleiben einige Probleme, insbesondere bei der heterologen Expression großer Genkluster, bestehen. Zu den limitierenden Faktoren der heterologen Synthese von Naturstoffen zählen u. a. (a) die Eigenschaften des Expressionsstammes und (b) die Eigenschaften des Expressionsvektors. Im Folgenden werden die limitierenden Faktoren der heterologen Expression sowie die entsprechenden Lösungsstrategien, die für die Überwindung der Limitierungen entwickelt wurden, beschrieben.

a) Limitierung durch den Expressionsstamm

Aufgrund einer kurzen Generationszeit, der fehlenden Pathogenität, der einfachen Handhabung und der guten genetischen und physiologischen Charakterisierung ist *E. coli* der klassische Expressionswirt (Schmidt, 2004; Jana & Deb, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Dennoch treten auch mit *E. coli* als Expressionsstamm verschiedene Probleme bei der heterologen Expression von Genen auf. So weisen z. B. verschiedene Mikroorganismen sehr unterschiedliche Präferenzen in ihrem Codon-Gebrauch auf (Gutman & Hatfield, 1989; Santos *et al.*, 2004). Diese Bevorzugung bestimmter Codons wird als „Codon-Bias“ bezeichnet (Carbone *et al.*, 2003). Der Codon-Gebrauch ist hauptsächlich von dem jeweiligen Organismus abhängig, kann allerdings auch innerhalb einer Zelle variieren (Saier, 1995; Makrides, 1996). Wenn der Codon-Gebrauch zwischen Ursprungs- und Wirtsorganismus zu stark voneinander abweicht, kann es zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Translation der heterologen Zielgene kommen (Gustafsson *et al.*, 2004). Es ist möglich, dass durch den

unterschiedlichen Codon-Gebrauch die Translation des Zielproteins vorzeitig abbricht oder ein defektes Protein aufgrund von Leserasterverschiebungen oder fehlerhaften Aminosäureneinbau entsteht (Kurland & Gallant, 1996; Calderone *et al.*, 1996; Forman *et al.*, 1998; McNulty *et al.*, 2003).

Ein weiteres Problem ist, dass fremde genetische Elemente wie Promotoren oder regulatorische Regionen in dem fremden Wirtsorganismus häufig nicht oder nur unzulänglich erkannt werden, wodurch die Transkription der Zielgene nicht erfolgen kann.

Die heterologe Synthese von komplexen Stoffwechselprodukten stellt außerdem sehr spezifische Anforderungen an den Stoffwechsellintergrund des Wirtsorganismus. So müssen z. B. für die heterologe Produktion von Redoxproteinen Kofaktoren oder prosthetische Gruppen in dem Expressionswirt in ausreichender Menge vorliegen und in das Protein eingebaut werden (Kappler & McEwan, 2002). Ähnlich verhält es sich mit Proteinen, für deren Faltung spezifische Chaperone benötigt werden (Schlieker *et al.*, 2002; Baneyx & Mujacic, 2004). Hier erfordert die funktionelle Synthese des Zielproteins eine leistungsstarke Proteinfaltungsmaschinerie in dem neuen Wirtstamm (De Marco *et al.*, 2007). Die inkorrekte Faltung eines Proteins begünstigt dessen Abbau durch Proteasen oder kann zu der Aggregation des Proteins und zu der Bildung von unlöslichen Einschlusskörpern, sogenannten *inclusion bodies*, führen (Goff & Goldberg, 1985; Wall & Pluckthun, 1995; Makrides, 1996). Hinzu kommen besondere Anforderungen an die Stoffwechsellistung der Wirtszelle, wenn für die Produktion einer Verbindung eine besondere Vorstufe bereitgestellt werden muss oder wenn für die Aktivierung der Verbindung posttranslationale Modifikationen durchzuführen sind (Lambalot *et al.*, 1996). So besitzt *E. coli* z. B. keine geeignete Phosphopantetheinyl-Transferase zur posttranslationalen Aktivierung von Polyketidsynthasen (Kealey *et al.*, 1998; Pfeifer *et al.*, 2001).

Die beschriebenen Probleme führen dazu, dass ein rekombinantes Protein nicht oder nur mit geringem Ertrag in *E. coli* exprimiert werden kann. Es gibt unterschiedliche Ansätze, um diese Probleme zu lösen. Um den unterschiedlichen Codon-Gebrauch zwischen dem Produktionsstamm und dem heterologen Wirtstamm anzugleichen, können Gene koexprimiert werden, die für die tRNAs der seltenen Codons kodieren (Forman *et al.*, 1998; Sørensen *et al.*, 2003; McNulty *et al.*, 2003). Um die Faltung von Proteinen in dem heterologen Bakterienstamm zu verbessern oder benötigte Kofaktoren bereitzustellen, können auch zusätzliche Gene koexprimiert werden, die für die spezifischen Chaperone kodieren bzw. für die erfolgreiche Synthese der Kofaktoren benötigt werden (Weickert *et al.*, 1996; Schlieker *et al.*, 2002; Baneyx & Mujacic, 2004). Der proteolytische Abbau von

rekombinanten Proteinen wird häufig durch die Verwendung von Protease-defizienten Expressionsstämmen vermieden (Sørensen *et al.*, 2005).

Die Nachteile dieser Methoden sind, dass sie sehr zeitaufwändig und kostenintensiv sind. Hinzu kommt, dass für die Synthese jeder interessanten Verbindung eine individuelle Optimierung des Expressionsstammes vorgenommen werden muss. Ein anderer Lösungsansatz ist daher, die heterologe Expression in alternativen Wirtsstämmen durchzuführen, die sich aufgrund von physiologischen, genetischen oder strukturellen Eigenschaften für eine effiziente Synthese der Zielproteine besser eignen als *E. coli* (Zhang *et al.*, 2008). Neben *E. coli* werden z. B. die Gram-positiven *Bacillus*-Stämme häufig als heterologe Wirtsstämmen genutzt. Im Gegensatz zu *E. coli* weisen die Bakterien der Gattung *Bacillus* keine äußere Membran auf, besitzen eine komplexe Sekretionsmaschinerie und können Proteine direkt in das Kulturmedium abgeben (Terpe, 2006). Zusätzlich besitzt *B. subtilis* eine Phosphopantetheinyl-Transferase mit einem breiten Substratspektrum, welche die posttranslationale Aktivierung von Polyketidsynthasen ermöglicht (Mofid *et al.*, 2002). *Pseudomonas putida* besitzt einen vielseitigen Stoffwechsel und wird aus diesem Grund auch häufig als heterologer Wirtsstamm eingesetzt (Marques & Ramos, 1993; Boivin *et al.*, 1994; Stephan *et al.*, 2006). Eine kurze Generationszeit, ein vollständig sequenziertes Genom und die etablierten Methoden zur molekulargenetischen Handhabung von *P. putida* begünstigen zusätzlich den Einsatz von *P. putida* als heterologen Wirtsstamm (Nelson *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu *E. coli* besitzt auch *P. putida* eine Phosphopantetheinyl-Transferase, die Polyketidsynthasen aktivieren kann. Zusätzlich ist der GC-Gehalt im Genom von *P. putida* relativ hoch, so dass sich *P. putida* besonders für die Expression von Genen aus Actinomyceten und Myxobakterien eignet (Finking *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2005).

Ein anderes Beispiel für einen alternativen Wirtsstamm ist das phototrophe Bakterium *Rhodobacter capsulatus*. *R. capsulatus* bildet unter phototrophen Bedingungen intrazelluläre Membranvesikel und eignet sich aufgrund der vergrößerten Membranoberfläche besonders für die Synthese von Membranproteinen (Drepper *et al.*, 2005; 2006). Darüber hinaus bietet *R. capsulatus* Vorteile bei der funktionellen Expression von Redoxproteinen. Unter phototrophen Bedingungen ist *R. capsulatus* in der Lage, nahezu alle beschriebenen Redox-Kofaktoren, z. B. Häm-Gruppen, Molybdän-Kofaktoren und Eisen-Schwefel-Kluster, zu synthetisieren und in die entsprechenden Proteine einzubauen (Solomon *et al.*, 1999; De Smet *et al.*, 2001a; Chevallet *et al.*, 2003; Smart *et al.*, 2004). So konnten im Gegensatz zu *E. coli* eine Oxidoreduktase (SorAB) aus *Stareya novella* sowie das Flavocytochrom c aus Purpurbakterien synthetisiert werden (De Smet *et al.*, 2001b; Kappler & McEwan, 2002).

b) Limitierung durch den Expressionsvektor

Für die erfolgreiche Synthese von Naturstoffen wird häufig eine größere Anzahl verschiedener Enzyme benötigt, die gemeinsam einen Enzymkomplex oder *metabolic pathway* bilden. Die Gene, die für solche Enzymsysteme kodieren, liegen meistens in großen funktionellen Klustern auf dem Chromosom des natürlichen Produktionsstammes vor (Ikeda *et al.*, 2003; Clardy, 2005). Durch die Größe der Genkluster wird ihre molekulargenetische Handhabung und gezielte Integration in die entsprechenden Expressionsvektoren erschwert. Die Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen wiederholen sich häufig in langen DNA-Fragmenten und deshalb ist die gezielte Restriktion und Ligation von komplexen Genklustern (> 20 kb) nicht mehr durchführbar (Zhang *et al.*, 1998). Zusätzlich führt die Fehlerrate von DNA-Polymerasen dazu, dass die Amplifizierung der Kluster mittels PCR nicht mehr möglich ist. Die Häufigkeit eines falsch eingebauten Nukleotids liegt bei $2,0 \times 10^{-5}$ für die Taq-Polymerase und bei $1,6 \times 10^{-6}$ für Proofreading-Enzyme (Lundberg *et al.*, 1991). Somit ist die Übertragung großer DNA-Fragmente durch eine gezielte Klonierung in einen Expressionsvektor häufig nicht möglich. Um dennoch große Genkluster molekulargenetisch handhaben zu können, wird häufig die Methode der homologen Rekombination angewendet. So basiert z. B. das Red/ET-Recombination Kit der Firma GeneBridges auf dem Prinzip der homologen Rekombination. Das Red/ET-Recombination Kit ermöglicht die schrittweise Integration zahlreicher Gene, die für einen komplexen Biosyntheseweg kodieren, in einem Plasmid (Zhang *et al.*, 2000; Braatsch *et al.*, 2008). Unter Verwendung der isolierten Plasmide RecE und RecT des λ -Prophagen bzw. der homologen Proteine Red α und Red β des λ -Phagen kann die homologe Rekombination von DNA-Fragmenten *in vivo* durchgeführt werden (Muyrers *et al.*, 1999; 2000; 2001). Mit Hilfe dieser Methode konnte ein Gencluster aus *Streptomyces* sp. Tü6071, das für das Antibiotikum Phenalinolacton kodiert, aus dem Genom von *Streptomyces* sp. isoliert und in einen Vektor integriert werden. Der Phenalinolacton-Gencluster besteht aus insgesamt 35 Genen, die in 11 Operons lokalisiert sind. Es waren drei Red/ET-Rekombinations-Schritte notwendig, um den vollständigen Phenalinolacton-Gencluster sowie regulatorische Elemente, z. B. wirtsspezifische Promotoren, in einem Plasmid zu integrieren. Daraufhin wurde der Vektor in verschiedene Streptomyceten-Stämme transferiert und der Phenalinolacton-Gencluster heterolog exprimiert (Binz *et al.*, 2008). Da dieses Verfahren auf der homologen Rekombination beruht, ist die Integration der einzelnen DNA-Elemente in einem Vektor unabhängig von Restriktionsschnittstellen und der Größe der zu klonierenden Genregion.

Ein weiteres Problem ist, dass grundsätzlich Expressionsvektoren lediglich für die Klonierung und Expression eines Gens oder einer aus wenigen Genen bestehenden Transkriptionseinheit ausgelegt sind. Um auch große DNA-Fragmente in heterologe Wirtsstämme übertragen zu können, wurden Cosmide und *bacterial artificial cromosomes* (BACs) entwickelt (O'Connor *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1995). Cosmide können Inserts bis zu einer Größe von 40 kb aufnehmen, BACs erlauben den Einbau von DNA-Fragmenten bis zu einer Größe von 300 kb (Shizuya *et al.*, 1992).

Allerdings liegen Expressionsvektoren, in die ein großes Insert integriert wurde, nur instabil und mit einer geringen Kopienzahl in der Zelle vor. Ohne Selektionsdruck können diese Plasmide der Zelle schnell verloren gehen (Herrero *et al.*, 1990; Kent *et al.*, 1998). Um die Stabilität der Zielgene in dem heterologen Bakterienstamm zu erhöhen, kann der Gencluster aus dem Klonierungsvektor in die chromosomale DNA des heterologen Bakterienstammes transferiert werden. Für die Integration der Gene in die chromosomale DNA des heterologen Wirtes wird häufig der Mechanismus der Transposition gewählt, da andere Methoden, z. B. die homologe Rekombination oder *random recombination*, weniger effizient als Transposition sind (Fu *et al.*, 2008). Zusätzlich ist der Prozess der Transposition unabhängig von der Größe des zu transferierenden Genclusters. Mit artifiziellen Transposons war es bereits möglich, Gencluster mit einer Größe von 86 kb zu übertragen (Basu *et al.*, 2005). Häufig basieren die artifiziellen Transposons auf dem „*cut and paste*“-Mechanismus des Transposons Tn5. Für den Prozess der Tn5-Transposition werden nur die Transposase sowie die spezifischen Erkennungssequenzen der Transposase benötigt (Goryshin & Reznikoff, 1998; Reznikoff, 2008). Im Gegensatz zu dem Transposon Tn7 benötigt das Transposon Tn5 keine spezifischen Sequenzen, um in die Ziel-DNA zu integrieren. Dadurch führt die Transposition mit dem Transposon Tn5 häufiger zum Erfolg (Lichtenstein & Brenner, 1981; McKown *et al.*, 1988; Reznikoff, 2003).

Für die heterologe Überexpression werden in die Expressionsvektoren häufig starke und induzierbare Promotoren integriert. Dadurch wird die gezielte Expression der Zielgene nach Beendigung einer ersten Wachstumsphase der Bakterien möglich. Diese Promotoren sollten zusätzlich eine geringe basale Expression aufweisen sowie einfach und kostengünstig zu induzieren sein (Terpe, 2006). Beispiele für solche Promotoren sind der *lac*-Promotor (Polisky *et al.*, 1976; Gronenborn, 1976; Fuller, 1982), der *tac*-Promotor (De Boer *et al.*, 1983; Brosius *et al.*, 1985) und der P_{BAD}-Promotor (Guzman *et al.*, 1995). Die *lac*- und *tac*-Promotoren werden durch die Zugabe von IPTG induziert, der P_{BAD}-Promotor durch die Zugabe von L-Arabinose. Im Vergleich zu dem *tac*-Promotor ist der *lac*-Promotor relativ

schwach und eignet sich aus diesem Grund besonders für die Synthese von toxischen Proteinen oder Membranproteinen. Der P_{BAD} -Promotor zeichnet sich vor allem durch eine sehr geringe basale Expression aus (Khlebnikov *et al.*, 2001). Der Nachteil der beschriebenen Promotoren ist, dass sie in alternativen Expressionsstämmen zu *E. coli* häufig schlecht oder nicht erkannt werden.

Mit dem T7 RNA-Polymerase-abhängigen Expressionssystem wird dieses Problem überwunden. Die rekombinanten Zielgene stehen hier unter der Kontrolle des T7-Promotors aus dem T7-Bakteriophagen (Studier & Moffatt, 1986). Der T7-Promotor wird ausschließlich von der spezifischen T7 RNA-Polymerase aus dem T7-Bakteriophagen erkannt (Kochetkov *et al.*, 1998). Um die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression der Zielgene in dem heterologen Bakterienstamm zu erreichen, muss zusätzlich ein T7 RNA-Polymerase-Gen in den Wirtstamm integriert werden. In dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) wurde das T7 RNA-Polymerase-Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors in das Genom integriert (Studier & Moffatt, 1986). Für andere Bakterien, z. B. *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Salmonella enterica* oder *Ralstonia eutropha*, wurden mittlerweile auch T7-Expressionssysteme konstruiert (Brunschwig & Darzins, 1992; Herrero *et al.*, 1993; McKinney *et al.*, 2002; Barnard *et al.*, 2004). Im Vergleich zu bakteriellen RNA-Polymerasen weist die T7 RNA-Polymerase eine sehr hohe Prozessivität auf. Daher können mit der T7 RNA-Polymerase sehr hohe Proteinausbeuten erzielt werden. Neben der spezifischen Promotor-Erkennung und der hohen Prozessivität begünstigt auch der einfache Aufbau der T7 RNA-Polymerase ihren Einsatz in Expressionssystemen. Die virale Polymerase besteht aus nur einer Untereinheit und benötigt keine zusätzlichen Proteinfaktoren. Somit eignet sich die T7 RNA-Polymerase als RNA-Polymerase für heterologe Expressionssysteme.

1.2. Bakterielle Naturstoffe

Die heterologe Synthese von Naturstoffen wird durch die in Abschnitt 1.1.2 beschriebenen Faktoren limitiert. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Strategien entwickelt, um die genannten Probleme zu überwinden, da die Naturstoffe biotechnologisch, medizinisch und wissenschaftlich von großer Bedeutung sind (Cragg *et al.*, 1997; Newman *et al.*, 2003; Baker *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).

Durch Metagenom- und Screeningverfahren werden ständig neue Gene identifiziert, die für die Synthese bioaktiver Verbindungen verantwortlich sind (Streit & Schmitz, 2004; Venter *et al.*, 2004). Neben den Bakterien zählen auch Pflanzen und Pilze zu den Produzenten von Naturstoffen (Croteau *et al.*, 2000; Tobert, 2003). Das Wirkungsspektrum der Naturstoffe ist sehr vielfältig. Sie werden in der Medizin u. a. erfolgreich als Antibiotika, Antimykotika und Zytostatika eingesetzt (Newman & Cragg, 2007). Zu den bekanntesten bakteriellen Naturstoffen gehören Polyketide und nicht-ribosomale Peptide. Sie werden durch die modular aufgebauten Polyketidsynthasen (PKS) und nicht-ribosomale Polyketidsynthasen (NRPS) in zahlreichen Schritten hergestellt (Cane & Walsh, 1999; Staunton & Weissman, 2001; Walsh, 2004). Weitere große Gruppen von Naturstoffen werden über den Isoprenoid- bzw. den Shikimat-Biosyntheseweg in Bakterien synthetisiert (Dewick, 2002; Knaggs, 2003).

Ein Beispiel für eine natürliche Verbindung mit antibakterieller Wirkung ist Daptomycin, ein cyclisches Lipopeptid, das von *Streptomyces roseosporus* produziert wird und eine antibakterielle Wirkung gegen Gram-positive Bakterien, z. B. *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*, besitzt (Abb. 1.1a; Debono *et al.*, 1988; Baltz, 1997). Die Besonderheit von Daptomycin ist, dass dieses Antibiotikum auch gegen antibiotikaresistente Bakterienstämme wie Vancomycin- und Methicillinresistente *S. aureus* sowie Penicillinresistente *S. pneumoniae* wirkt (Akins & Rybak, 2001; Cha *et al.*, 2003). In Gegenwart freier Calciumionen wird das Lipopeptid in die Zellmembran eingebaut und fungiert als Ionenkanal. Dies führt zur Depolarisation der Zellmembran, zu einer fehlerhaften DNA-, RNA- und Proteinsynthese und schließlich zum Zelltod (LaPlante & Rybak, 2004). Der Daptomycin-Genkluster umfasst eine Größe von 128 kb und enthält u. a. die Gene *dptA*, *dptBC* und *dptD*, die für die Untereinheiten einer nicht-ribosomalen Polyketidsynthase kodieren (Miao *et al.*, 2005). Unter dem Namen Cubicin ist Daptomycin seit 2003 in den USA und seit 2006 in Deutschland als Antibiotikum zugelassen. Aufgrund der zunehmenden Resistenzen der Bakterien gegenüber Antibiotika, verursacht durch unsachgemäße Verschreibung und

Dosierung der Antibiotika, ist gerade die Entdeckung immer neuer Antibiotika von großem Interesse (Clardy *et al.*, 2006; Newman & Cragg, 2007).

Zu den Polyketiden mit einer fungiziden Wirkung zählt z. B. Soraphen A, das von dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* hergestellt wird (Abb.1.1b) Soraphen A zeigt eine stark wachstumsinhibierende Wirkung gegenüber zahlreichen phytopathogenen Pilzen, während Bakterien gegenüber Soraphen A unempfindlich sind. Die fungizide Wirkung von Soraphen A basiert auf der Inhibierung der Acetyl-CoA-Carboxylase von Pilzen und Hefen (Gerth *et al.*, 1994; Vahlensieck *et al.*, 1994). Der Gencluster, der für die Synthese von Soraphen A benötigt wird, besitzt eine Gesamtlänge von 67,5 kb und beinhaltet die zwei Gene *sorA* und *sorB*, die jeweils für eine Polyketidsynthase kodieren (Schupp *et al.*, 1995; Ligon *et al.*, 2002). Diese beiden Gene werden flankiert durch die Gene *sorM* und *orf4* bzw. *sorR*, *sorC*, *sorD*, *sorF* und *sorE*, deren Genprodukte zusätzlich in die Synthese von Soraphen A involviert sind (Zirkle & Molnár, 2004).

Ein weiteres Beispiel für einen bioaktiven Naturstoff ist Epothilon. Wie Soraphen A wird auch Epothilon von dem Myxobakterium *S. cellulosum* produziert (Abb.1.1c). Aufgrund der Eigenschaft, Mikrotubuli zu stabilisieren und der daraus resultierenden Störung der mitotischen Zellteilung gehört Epothilon zu den Zytostatika. Epothilon wird durch eine Polyketidsynthase synthetisiert, die in verschiedene Module unterteilt werden kann. So besteht der 56 kb große Epothilon-Gencluster aus den Genen *epoA*, *epoB*, *epoC*, *epoD*, *epoE*, *epoF* und *epoK*, die für ein *loading modul*, eine nicht-ribosomale Polyketidsynthase, acht Polyketidsynthasen und eine Epoxidase kodieren (Julien *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000). Seit 2007 ist das Epothilon-Derivat Ixembra in den USA als Zytostatikum zugelassen.

Da die natürlichen Produzenten von bioaktiven Naturstoffen unter Laborbedingungen häufig sehr langsam wachsen oder gar nicht kultiviert werden können, wird die Synthese der natürlichen Produkte häufig in heterologen Bakterienstämmen durchgeführt. Die heterologe Synthese von Naturstoffen führt dazu, dass durch den Transfer eines Genclusters in einen heterologen Wirt auch Derivate der ursprünglichen Verbindung mit neuen Eigenschaften entstehen können (Walsh, 2002). Die Gene und die Genprodukte unterliegen in dem heterologen Bakterienstamm anderen regulatorischen Mechanismen als in dem natürlichen Produktionsstamm. Diese regulatorischen Mechanismen führen dazu, dass die ursprüngliche Verbindung modifiziert werden kann. Der Vorgang wird als kombinatorische Biosynthese bezeichnet und ist für die Entdeckung immer neuer Naturstoffe von großer Bedeutung (Cane *et al.*, 1998; Staunton & Wilkinson, 2001).

1.3. Beschreibung verschiedener Genkluster mit biotechnologischem Potenzial

Für die erfolgreiche Synthese von Naturprodukten werden häufig zahlreiche Gene benötigt, die im Chromosom des Produktionsstammes geklustert vorliegen (Bode & Müller, 2005; Dürr *et al.*, 2006). Dabei kodieren diese Gene Enzyme, die entweder gemeinsam einen Enzymkomplex oder einen *metabolic pathway* bilden. Die Genkluster besitzen oft einen komplexen Aufbau und bestehen aus verschiedenen Operons, die in unterschiedlichen Transkriptionsrichtungen angeordnet sind. Im Folgenden wird anhand des Hydrogenase-Genklusters aus *Rhodobacter capsulatus* und des Prodigiosin-Genklusters aus *Serratia marcescens* der Aufbau zweier Genkluster beschrieben.

1.3.1 Der Hydrogenase-Genkluster aus *R. capsulatus*

Der Hydrogenase-Genkluster *hup* (*hydrogen-uptake*) aus *R. capsulatus* kodiert für eine membrangebundene *uptake*-Hydrogenase, die zu der Klasse der [NiFe]-Hydrogenasen gehört und die Oxidation von molekularem Wasserstoff nach folgender Formel katalysiert: $H_2 \leftrightarrow 2H^+ + 2e^-$ (Vignais *et al.*, 2001; Vignais & Colbeau, 2004). Mit Hilfe der Hydrogenase wird es für die Zelle möglich, H_2 aufzunehmen und unter autotrophen Bedingungen mit H_2 als alleiniger Elektronenquelle zu wachsen (Colbeau *et al.*, 1993). Hydrogenasen sind unter den Bakterien und Archaea weit verbreitet, aber sind gelegentlich auch in Eukaryonten zu finden (Maróti *et al.*, 2003; Vignais & Billoud, 2007). Die Bakterien, in denen Hydrogenasen identifiziert wurden, zählen u. a. zu den Proteobakterien, Cyanobakterien und Rhizobien (Meyer *et al.*, 1978; Lambert & Smith, 1981; Vignais *et al.*, 2001). Aufgrund des stetig wachsenden Interesses an der biologischen Wasserstoffproduktion als erneuerbare Energiequelle sind die Hydrogenasen auch für die Biotechnologie von Bedeutung (Vignais & Colbeau, 2004; Mealli & Rauchfuss, 2007).

Die Hydrogenase aus *R. capsulatus* besteht aus einer großen (HupL; 65,8 kDa) und kleinen (HupS; 34,2 kDa) Untereinheit, die beide komplexe Metallkluster enthalten (Richaud *et al.*, 1990). In Abbildung 1.2 ist die Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* dargestellt, die zu der Hydrogenase aus *R. capsulatus* große Ähnlichkeiten aufweist. Die große Untereinheit HupL besitzt einen [NiFe]-Kluster, die kleine Untereinheit HupS drei FeS-Kluster (Vignais, 2008).

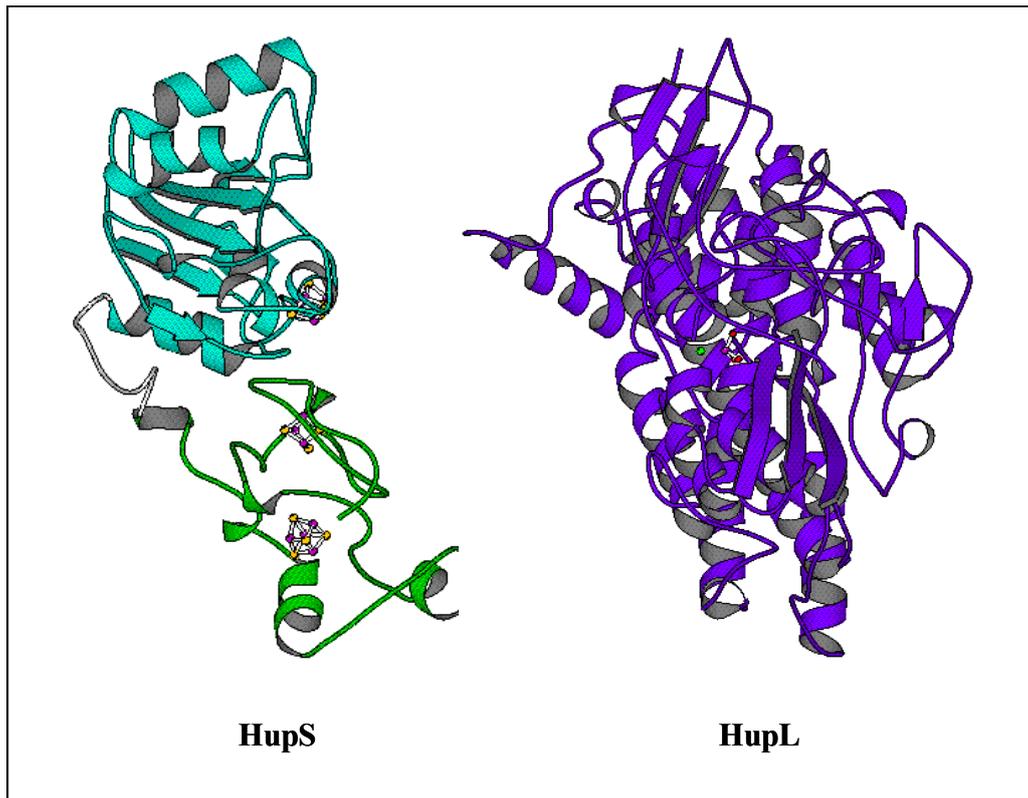


Abb. 1.2: Struktur der kleinen (HupS) und großen (HupL) Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* (nach: Volbeda *et al.*, 1995).

Die Strukturgene *hupL* und *hupS*, die für die große und kleine Untereinheit der Hydrogenase kodieren, sind in dem Hydrogenase-Gencluster *hup* lokalisiert. Der Gencluster mit einer Gesamtgröße von 25 kb ist vollständig sequenziert und beinhaltet neben den Strukturgenen noch 17 weitere *hup*- und *hyp*-Gene, deren Produkte in die Regulation der Synthese der Hydrogenase sowie in die Synthese und den Einbau der Kofaktoren involviert sind (Abb. 1.3; Colbeau *et al.*, 1998; Vignais *et al.*, 2005). Die Gene *hupU* und *hupV* z. B. kodieren für die große und kleine Untereinheit einer cytoplasmatischen Sensor-Hydrogenase. Die Sensor-Hydrogenase HupUV kann H₂ binden und ist über die Interaktion mit dem Zwei-Komponenten-System HupT/HupR, deren Gene auch in dem *hup*-Gencluster vorliegen, an der Regulation der Synthese der *uptake*-Hydrogenase beteiligt (Vignais *et al.*, 1997; Dischert *et al.*, 1999; Elsen *et al.*, 2003). Die Proteine, die durch die *hyp*-Gene kodiert werden, können dagegen die Kofaktoren binden und in die *uptake*-Hydrogenase einbauen (Lutz *et al.*, 1991; Jacobi *et al.*, 1992; Colbeau *et al.*, 1993).

Durch Sequenzanalysen und Gen-Fusionen wurde die Struktur des Hydrogenase-Genclusters untersucht (Vignais *et al.*, 2005). Alle Gene des *hup*-Klusters liegen in einer Orientierung vor und der Cluster kann in fünf verschiedene Operons unterteilt werden, die teilweise voneinander durch Transkriptionsterminatoren getrennt werden. Vor jedem Operon ist ein

spezifischer Promotor integriert, der für die Transkription des jeweiligen Operons verantwortlich ist (Abb. 1.3; Leclerc *et al.*, 1988; Cauvin *et al.*, 1991; Elsen *et al.*, 1996).

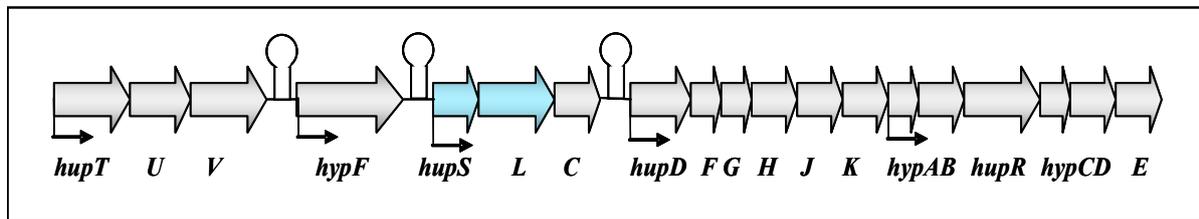


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Hydrogenase-Genclusters aus *R. capsulatus*. Die großen Pfeile stellen die einzelnen *hup*- und *hyp*-Gene des Klusters dar, die kleinen Pfeile symbolisieren Promotoren. Die Loops bilden die Transkriptionsterminatoren, die in dem Cluster lokalisiert sind.

Die Regulation der Biosynthese der Hydrogenase in *R. capsulatus* erfolgt sowohl über eine spezifische Signal-Transduktions-Kaskade als auch über ein globales Zwei-Komponenten-System (Vignais *et al.*, 2005). Die sensorische Hydrogenase HupUV, die Histidin-Kinase HupT und der Response-Regulator HupR bilden die Signal-Transduktions-Kaskade, die spezifisch auf die Konzentration an H_2 in der Zelle reagiert (Elsen *et al.*, 1996; Vignais *et al.*, 1997). H_2 wird durch die cytoplasmatische Sensor-Hydrogenase HupUV detektiert und beeinflusst die Bindung zwischen der Sensor-Hydrogenase HupUV und der Histidin-Kinase HupT. Bei einer hohen Konzentration von H_2 wird die Bindung zwischen den Proteinen HupUV und HupT geschwächt (Elsen *et al.*, 2003). Dadurch wird auch der Phosphotransfer von HupT auf den Responseregulator HupR reduziert (Davies *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu herkömmlichen Zweikomponentensystemen, in denen der Response-Regulator durch die Phosphorylierung aktiviert wird, bindet HupR in unphosphoryliertem Zustand an eine *enhancer site* vor dem *hupS*-Promotor und aktiviert die Transkription der Strukturgene *hupS* und *hupL* (Dischert *et al.*, 1999). Ist die Konzentration an H_2 in der Zelle niedrig, führt die starke Bindung zwischen HupUV und HupT zu einer verstärkten Phosphat-Übertragung von der Histidin-Kinase HupT auf den Response-Regulator HupR. Der Regulator HupR ist in phosphoryliertem Zustand inaktiv und kann die Transkription der *uptake*-Hydrogenase nicht mehr induzieren (Toussaint *et al.*, 1997).

Neben dieser spezifischen Signal-Transduktions-Kaskade ist auch ein globales Zwei-Komponenten-System an der Regulation der Synthese der Hydrogenase beteiligt. Das globale Zwei-Komponenten-System basiert auf der membrangebundenen Histidin-Kinase RegB und dem Response-Regulator RegA (Vignais *et al.*, 2005). RegA bindet unphosphoryliert an den Promotor, der vor dem Operon *hupSLC* lokalisiert ist und verhindert dadurch die Transkription der Strukturgene *hupS* und *hupL* der Hydrogenase. Unter anaeroben

Bedingungen ist die membrangebundene Histidin-Kinase RegB fähig, sich selbst zu phosphorylieren und die Phosphatgruppe daraufhin auf RegA zu übertragen (Elsen *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung von RegA führt dazu, dass sich der Response-Regulator von der DNA-Sequenz vor *hupSL* löst und der Hydrogenase-Gencluster transkribiert werden kann (Elsen *et al.*, 2004). Neben der Regulation der Transkription des Hydrogenase-Genclusters ist das Zwei-Komponenten-System RegA/RegB u. a. außerdem in die Regulation der Photosynthese, CO₂-Fixierung und N₂-Assimilation involviert (Joshi & Tabita, 1996; Elsen *et al.*, 2004).

1.3.2 Der Prodigiosin-Gencluster aus *S. marcescens*

Der Prodigiosin-Gencluster *pig* aus *S. marcescens* enthält die *pig*-Gene, die für die Biosynthese des roten Pigments Prodigiosin erforderlich sind. Prodigiosin gehört zu der Familie der Prodiginine, die sich durch eine Tripyrrol-Struktur auszeichnen, und wird als Sekundärmetabolit in *S. marcescens* gebildet (Thomson *et al.*, 2000). Neben *S. marcescens* stellen weitere Bakterien der Gattung *Serratia* sowie Actinomyceten, *Pseudoalteromonas denitrificans* und zahlreiche marine Bakterien, darunter auch *Hahella chejuensis*, Prodiginine her (Kawauchi *et al.*, 1997; Jeong *et al.*, 2005). Die Bedeutung von Prodigiosin für die Zelle sowie die Lokalisierung in der Zelle sind zurzeit noch unbekannt (Harris *et al.*, 2004). Prodigiosin ist von großem Interesse für die Biotechnologie, weil es aktiv gegen Bakterien, Pilze und Protozoen wirkt (Williams & Quadri, 1980; Demain, 1995). Außerdem wurde gezeigt, dass Prodigiosin und Derivate von Prodigiosin in Krebszellen Apoptose auslösen können, während gesunde Zellen nicht beeinflusst werden (Montaner *et al.*, 2000; Williamson *et al.*, 2007).

Die Biosynthese von Prodigiosin erfolgt über zwei Biosynthesewege, deren Endprodukte, 2-Methyl-3-n-amylopyrrol (MAP) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd (MBC), in einem letzten Schritt zu Prodigiosin kondensiert werden (Abb. 1.4; Williamson *et al.*, 2005; 2006a; Chawrai *et al.*, 2008).

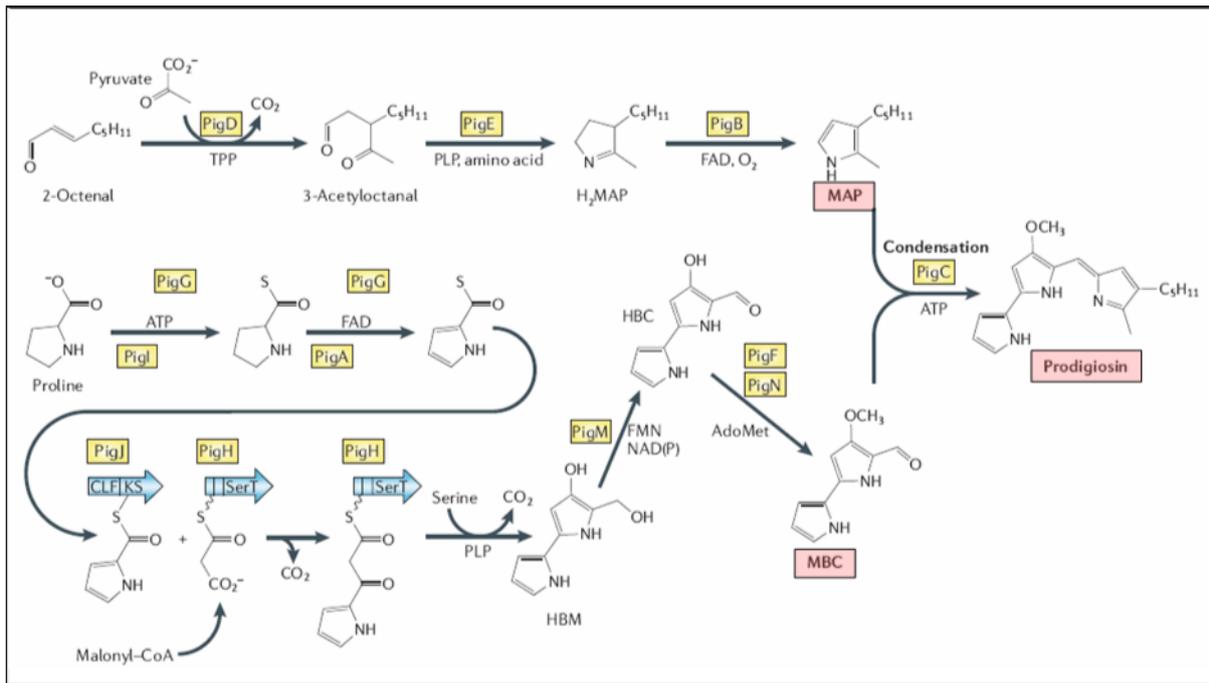


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Biosyntheseweges von Prodigiosin in *Serratia marcescens*. Prodigiosin wird über einen gegabelten Biosyntheseweg hergestellt. Die Endprodukte der Biosynthesewege MAP (2-Methyl-3-n-amylopyrrol) und MBC (4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd) werden im letzten Schritt zu Prodigiosin kondensiert (nach: Williamson *et al.*, 2006a).

Die Enzyme, welche die Biosynthese von Prodigiosin katalysieren, werden durch 14 Gene kodiert, die in der chromosomalen DNA von *S. marcescens* gemeinsam in dem *pig*-Gencluster vorliegen (Harris *et al.*, 2004). Der Gencluster mit den Genen *pigA-pigN* umfasst eine Länge von 21,4 kb und wird durch die Gene *cueR* und *copA* flankiert (Abb. 1.5; Williamson *et al.*, 2006b). Ausgehend von einem Promotor vor *pigA* wird der Prodigiosin-Gencluster transkribiert. Die flankierenden Gene *cueR* und *copA* besitzen eigene Promotoren. Durch die Inaktivierung der einzelnen Gene des *pig*-Klusters, LC-MS-Analysen der entstandenen Zwischenprodukte und Komplementationsversuche wurden die Funktionen der einzelnen *Pig*-Enzyme in der Biosynthese von Prodigiosin ermittelt (Williamson *et al.*, 2005). Wie in Abbildung 1.4 dargestellt, erfolgt die Synthese von Prodigiosin ausgehend von den Vorstufen Pyruvat und 2-Octenal bzw. Prolin. An den einzelnen Schritten der Umsetzung dieser Vorstufen zu dem Endprodukt Prodigiosin sind die *Pig*-Enzyme beteiligt. Die *Pig*-Enzyme bilden somit einen *metabolic pathway*. Die Enzyme, die durch die Gene *cueR* und *copA* kodiert werden, sind nicht direkt an der Biosynthese von Prodigiosin beteiligt, sondern sind in die Regulation der Biosynthese von Prodigiosin involviert.

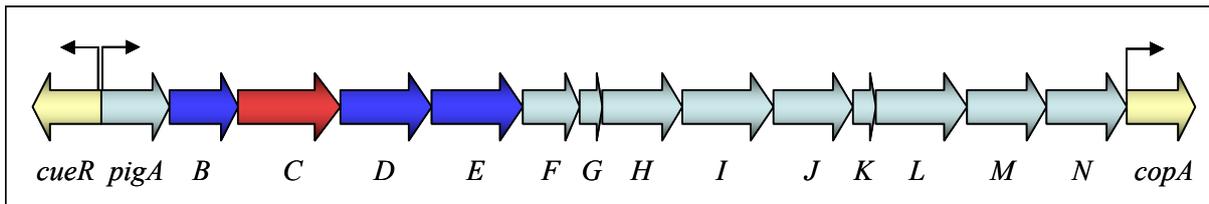


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Prodigiosin-Genklusters aus *Serratia marcescens*. Der *pig*-Kluster besteht aus 14 *pig*-Genen und wird durch *cueR* und *copA* (gelbe Pfeile) flankiert. Die Gene, die in die Synthese von MAP involviert sind, werden durch die dunkelblauen Pfeile symbolisiert; die Gene, die in die Synthese von MBC involviert sind, werden durch die hellblauen Pfeile dargestellt. Das *pigC*-Genprodukt (roter Pfeil) katalysiert die Kondensation von MAP und MBC zu Prodigiosin.

Die Regulation der Biosynthese der Prodiginine ist sehr komplex. Abhängig von dem jeweiligen Produktionsstamm sind sowohl physiologische wie auch äußere Einflüsse in ihre Regulation involviert (Williamson *et al.*, 2006a).

So wird z. B. durch spezifische Transkriptions-Regulatoren die Transkription der Prodiginin-Kluster beeinflusst (Takano *et al.*, 1992; Guthrie *et al.*, 1998). Beispiele für solche Transkriptions-Regulatoren sind die Proteine PigP und PigR aus *Serratia* 39006. Das regulatorische Protein PigP aus *Serratia* 39006 besitzt eine *helix-turn-helix*-Domäne, mit der das Protein sequenzspezifisch an DNA binden kann. Durch die spezifische Bindung von PigP an die DNA wird die Synthese sechs weiterer Prodigiosin-Regulatoren (PigQ, PigR, PigS, PigV, PigX und Rap) sowie die Transkription des Prodigiosin-Genklusters beeinflusst. Das führt zu einer verstärkten Prodigiosin-Synthese (Fineran *et al.*, 2005a). PigR, eine Adenylat-Cyclase, aktiviert dagegen die Prodigiosin-Produktion durch die Umwandlung von ATP in zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) (Fineran *et al.*, 2005a). Das durch PigR synthetisierte zyklische AMP bindet an ein Katabolit-Aktivator-Protein (CAP), das daraufhin an den Promotor des Prodigiosin-Genklusters binden kann. Durch die Bindung des CAP-cAMP-Komplexes an den Promotor wird die Transkription des Klusters gesteigert (Fineran *et al.*, 2005b).

Die Phosphat-Konzentration im Medium wirkt sich ebenfalls auf die Prodigiosin-Produktion in der Zelle aus (Slater *et al.*, 2003). Wenig Phosphat führt zu einer verstärkten Pigmentierung der Zellen. Die Phosphat-Konzentration im Medium wird durch die Sensor-Kinase PhoR ermittelt. Eine geringe Phosphat-Konzentration führt dazu, dass der Response-Regulator PhoB durch die Kinase PhoR phosphoryliert und somit aktiviert wird. PhoB kann an die „Pho-Box“, eine konservierte 7 bp Sequenz *upstream* des *pig*-Klusters, binden und die Transkription des Klusters verstärken (Williamson *et al.*, 2006a).

Neben den genannten Regulationsmechanismen wirken sich außerdem Temperatur, pH, Licht, Sauerstoff und Quorum Sensing auf die Produktion der Prodiginine aus (Williams & Quadri, 1980; Bennett & Bentley, 2000; Coulthurst *et al.*, 2004).

1.4 Das „*in vivo auto cloning and expression*“-System

Um die in Abschnitt 1.1.2 beschriebenen Probleme der heterologen Expression zu lösen und die simultane Expression mehrerer Gene eines Genklusters in einem heterologen Bakterienstamm zu ermöglichen, wurde das „*in vivo auto cloning and expression*“-System (IVAC) entwickelt. Basierend auf den Erfahrungen mit anderen Expressionssystemen wurde das IVAC-Expressionssystem konstruiert. Mit dem neuen IVAC-Expressionssystem soll es möglich werden, (a) einen Gencluster durch homologe Rekombination einer linken (L-IVAC) und rechten (R-IVAC) Kasette zu markieren (Abb. 1.6, Schritt 1), (b) die markierten Gene durch Konjugation in einen beliebigen Gram-negativen Bakterienstamm zu übertragen (Abb. 1.6, Schritt 2), (c) durch Transposition die Gene des Klusters stabil in das Genom eines heterologen Wirtes zu integrieren (Abb. 1.6, Schritt 3) und (d) abhängig von der T7 RNA-Polymerase zu exprimieren (Abb. 1.6, Schritt 4).

Das IVAC-Expressionssystem basiert auf zwei Kassetten, der L-IVAC- und der R-IVAC-Kassette. Der Aufbau der IVAC-Kassetten ist in Abbildung 1.7 dargestellt. Beide IVAC-Kassetten sind aus zahlreichen Komponenten zusammengesetzt, mit deren Hilfe die beschriebenen Schritte ermöglicht werden sollen. Sie enthalten je einen Selektionsmarker (Tc^R , Gm^R), ein Reportergen (Km^R , YFP), einen T7 RNA-Polymerase-abhängigen Promotor und Transpositions-Elemente. Der T7-Promotor der R-IVAC-Kassette wird durch einen *lac*-Operator kontrolliert. Ein zusätzlicher Bestandteil der L-IVAC-Kassette ist der *origin of transfer* (*oriT*). Die IVAC-Kassetten werden durch die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *ScaI* bzw. *SmaI* flankiert (Abb. 1.7). Durch die Hydrolyse mit diesen Restriktionsenzymen ist es möglich, die IVAC-Kassetten durch Restriktion gezielt aus einem Vektor zu isolieren.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte, die durch das neue IVAC-Expressionssystem vermittelt werden sollen, detailliert beschrieben.

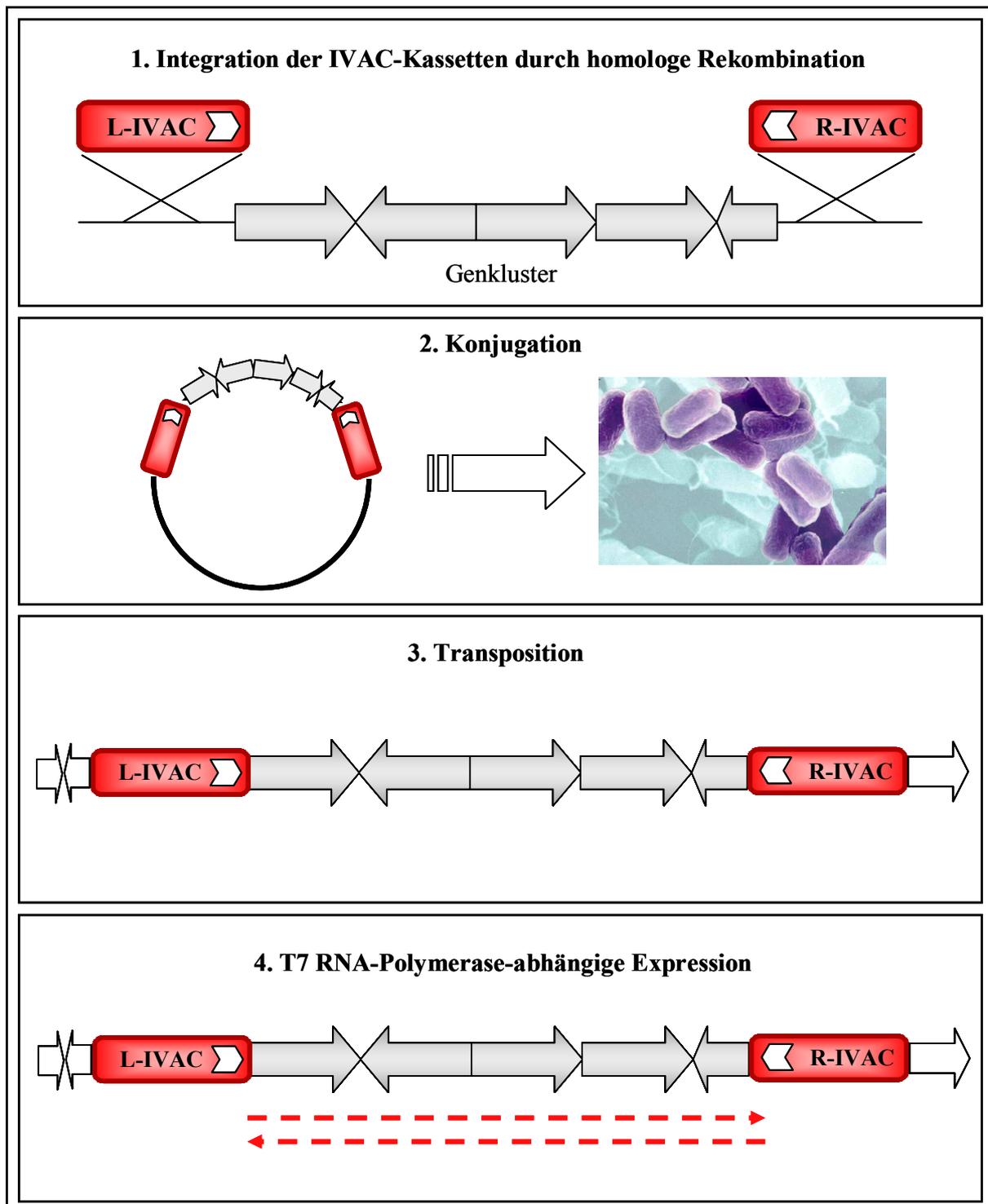


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der neuen IVAC-Technologie. Schritt 1: Die IVAC-Kassetten werden durch homologe Rekombination neben einem Genkluster integriert. Schritt 2: Der markierte Genkluster wird durch Konjugation in einen Rezipienten übertragen. Schritt 3: In der Rezipientenzelle wird der Genkluster zusammen mit den IVAC-Kassetten durch Transposition in das Genom integriert. Schritt 4: Alle Gene des Klusters werden abhängig von der T7 RNA-Polymerase transkribiert.

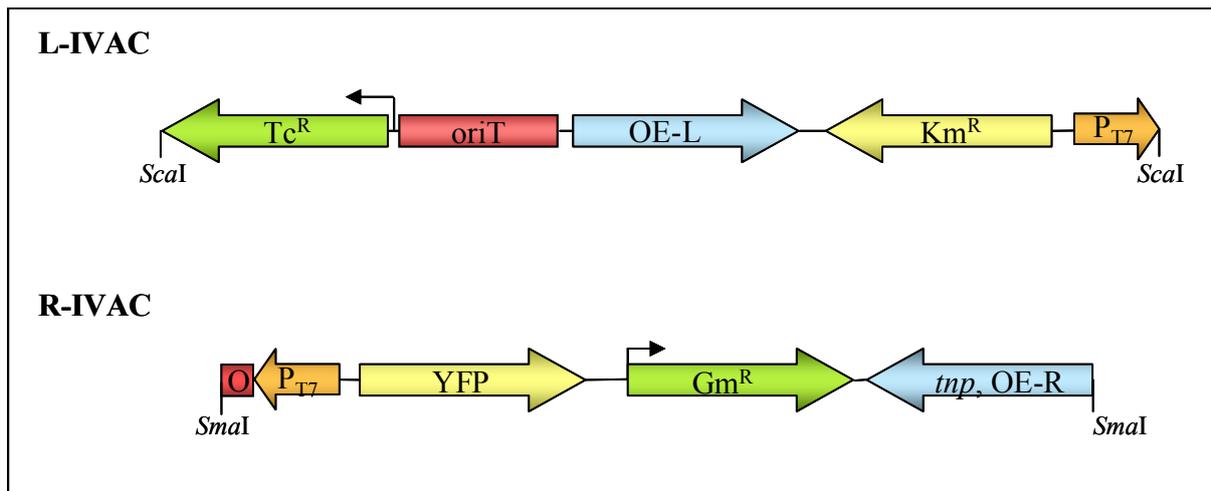


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der L-IVAC- und der R-IVAC-Kassette. Die einzelnen funktionellen Elemente der IVAC-Kassetten werden durch Pfeile dargestellt. In den IVAC-Kassetten sind je ein Selektionsmarker (Tc^R , Gm^R ; grün), ein Reportergen (Km^R , YFP; gelb), ein T7 RNA-Polymerase-abhängiger Promotor (orange) sowie Transposons-Elemente (das für die Transposase kodierende Gen *tnp* und die spezifischen Erkennungssequenzen OE-L und OE-R der Transposase; blau) integriert. Der T7 RNA-Polymerase-abhängiger Promotor der R-IVAC-Kassette steht unter der Kontrolle des *lac*-Operators (rot) und in der L-IVAC-Kassette ist zusätzlich ein *origin of transfer* (*oriT*; rot) lokalisiert. Die IVAC-Kassetten werden durch die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *ScaI* bzw. *SmaI* flankiert.

1.4.1 Die Markierung eines Genklusters durch die IVAC-Kassetten

Der erste Schritt der neuen IVAC-Technologie besteht in der Flankierung der zu exprimierenden Gene durch die IVAC-Kassetten. Um die IVAC-Kassetten in den Vektor, der die zu exprimierenden Gene trägt, integrieren zu können, wurde der Mechanismus der homologen Rekombination gewählt (Abb. 1.6, Schritt 1). Die gezielte Klonierung der IVAC-Kassetten in den Expressionsvektor durch Restriktion mit anschließender Ligation ist nur dann möglich, wenn sich die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme nicht in dem zu exprimierenden Gencluster wiederholen. Die Häufigkeit, mit der sich eine Restriktionsschnittstelle wiederholt, hängt vor allem von ihrer Länge, aber auch von ihrer Zusammensetzung ab. Spezifische Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen mit einer Größe von 6 bp wiederholen sich statistisch alle 4096 bp (Lottspeich & Zorbas, 1998). Dadurch wird die Größe des Genklusters, das durch gezielte Klonierung mit den IVAC-Kassetten markiert werden kann, begrenzt (Fu *et al.*, 2008).

Die Methode der homologen Rekombination ist der alternative Weg zu Restriktion und Ligation und ist vor allem im Umgang mit großen DNA-Fragmenten vorteilhaft. Im Gegensatz zu einer Klonierung ist die homologe Rekombination spezifisch und gleichzeitig unabhängig von der Länge des zu flankierenden Genklusters (Kuzminov, 1999; Rocha *et al.*, 2005). So nutzt z. B. auch das in Abschnitt 1.1.2 beschriebene Red/ET-Recombination Kit von der Firma GeneBridges die Methode der homologen Rekombination und ermöglicht so

die schrittweise Integration von zahlreichen Genen, die für einen komplexen Biosyntheseweg kodieren, in einem Plasmid (Zhang *et al.*, 2000; Braatsch *et al.*, 2008)

Der Nachweis der Integration der IVAC-Kassetten neben dem zu exprimierenden Gencluster soll über Selektionsmarker erfolgen. In der L-IVAC-Kassette ist als Selektionsmarker ein Tetracyclin-Resistenzgen und in der R-IVAC-Kassette ein Gentamycin-Resistenzgen enthalten (Abb. 1.7). Durch die sukzessive Integration der IVAC-Kassetten in den Vektor werden der Zelle spezielle Antibiotikaresistenzen verliehen, auf die selektioniert werden kann.

1.4.2 Der Transfer des markierten Genclusters in einen heterologen Bakterienstamm durch Konjugation

Der von den IVAC-Kassetten flankierte Gencluster soll anschließend durch Konjugation in einen beliebigen Gram-negativen Expressionsstamm übertragen werden (Abb. 1.6, Schritt 2). Durch diese Übertragung kann ein zu *E. coli* alternativer Expressionsstamm ausgesucht werden, der sich aufgrund von physiologischen, genetischen oder strukturellen Eigenschaften für eine effiziente Synthese der Zielproteine besser eignet als *E. coli*. Für den Transfer wurde die Methode der Konjugation und nicht die Transformation gewählt, da mit einer Konjugation eine höhere Ausbeute als mit Transformation erzielt werden kann. Die Konjugationsrate beträgt durchschnittlich 10^{-2} bis 10^{-3} (Pinedo & Smets, 2005).

Bei einer Konjugation können mobilisierbare Plasmide oder chromosomale DNA zwischen einem Donor und einem Rezipienten übertragen werden. Die für den komplexen Prozess der Konjugation benötigten Genprodukte werden durch die *tra*-Gene kodiert. Die Produkte der meisten *tra*-Gene sind in die Konstruktion des Pilus involviert, der den Kontakt zwischen Donorzelle und Rezipientenzelle herstellt (Köhler *et al.*, 2001). Sobald der Kontakt zwischen Spender und Empfänger hergestellt ist, induziert eine spezifische DNA-Endonuklease, die ebenfalls durch die *tra*-Gene kodiert wird, einen Einzelstrangbruch am *oriT* (*origin of transfer*) in dem Plasmid, das transferiert werden soll (Grohmann *et al.*, 2003). Anschließend entwindet eine Helicase die Doppelstränge des Plasmids. Der linearisierte Einzelstrang wird durch den „*rolling-circle*“-Mechanismus in den Rezipienten übertragen, der zirkuläre Einzelstrang verbleibt in der Donorzelle (Waters, 2001). Durch Replikation werden die Einzelstränge in beiden Zellen wieder zu Doppelsträngen aufgefüllt (Snyder & Champness, 1997).

Da eine Komponente der L-IVAC-Kassette der *oriT* ist, entsteht durch die Flankierung des Genklusters mit den IVAC-Kassetten ein Vektor, der bei einer Konjugation mobilisiert und in einen heterologen Wirt transferiert werden kann (Abb. 1.7).

1.4.3 Die stabile Integration des Genklusters in die chromosomale DNA des Rezipientenstammes durch Transposition

Nach der erfolgreichen Übertragung des IVAC-Expressionsvektors in den heterologen Bakterienstamm durch Konjugation soll der Gencluster zusammen mit den IVAC-Kassetten durch Transposition stabil in die chromosomale DNA des neuen Wirtsstammes integriert werden (Abb. 1.6, Schritt 3). Da gerade große Plasmide nur instabil in einer Zelle vorliegen, soll durch die Transposition die Stabilität, mit der die Gene in dem heterologen Bakterienstamm vorliegt, erhöht werden. Die Integration soll dabei über den Mechanismus der Transposition erfolgen, da die Transposition unabhängig von der Größe der zu übertragenden DNA-Sequenz und effizienter als homologe Rekombination ist (Goryshin & Reznikoff, 1998; Fu *et al.*, 2008). Die IVAC-vermittelte Transposition basiert auf dem Mechanismus des Tn5-Transposons, d.h. die Transposition verläuft über eine aus dem Genom ausgeschnittene DNA-Zwischenstufe („*cut and paste*“-Transposition) und ist unabhängig von spezifischen Sequenzen in der Ziel-DNA.

Der Prozess der Transposition ist eine Folge von mehreren Schritten. Im ersten Schritt binden zwei Transposasen an spezifische Erkennungssequenzen, welche die zu übertragende DNA-Sequenz flankieren (Reznikoff *et al.*, 2004; Klenchin *et al.*, 2008). Diese aus 19 bp bestehenden Erkennungssequenzen werden als *outside-ends* (OE) bezeichnet (Reznikoff, 2003). Nach der Bindung der Transposasen werden die Erkennungssequenzen OE-L (*outside-end left*) und OE-R (*outside-end right*) durch eine Oligomerisierung in direkte Nähe zueinander gebracht. Die dazwischenliegende DNA-Sequenz bildet eine Haarnadelstruktur aus, die aus der Donor-DNA herausgeschnitten werden kann (Gueguen *et al.*, 2005; Gradman *et al.*, 2008). Im letzten Schritt wird die DNA in eine Ziel-DNA integriert.

Für den Prozess der Transposition werden nur die Transposase sowie die spezifischen 19 bp-Erkennungssequenzen der Transposase (OE-L, OE-R) benötigt (Reznikoff, 2008). Um die stabile Integration des zu exprimierenden Genklusters und der IVAC-Kassetten in die chromosomale DNA des neuen Wirtsstammes durch Transposition zu ermöglichen, wurden sowohl das Gen *tnp*, das für die Transposase kodiert, als auch die Erkennungssequenzen OE-L und OE-R in die IVAC-Kassetten inseriert (Abb. 1.7). Somit entsteht durch die Markierung

eines Genklusters mit den IVAC-Kassetten ein artifizielles Tn5-Transposon, das den Transfer des Genklusters zusammen mit den IVAC-Kassetten über den „*cut and paste*“-Mechanismus in die chromosomale DNA des neuen Wirtes ermöglichen sollte.

1.4.4 Die T7 RNA-Polymerase abhängige Expression des Genklusters

Die spezifischen bakteriellen Promotorstrukturen von Genen unterscheiden sich stark in verschiedenen Bakterienstämmen und werden daher in heterologen Bakterienstämmen häufig nicht erkannt (Kanhare & Bansal, 2005). Um die funktionelle Expression der Zielgene mit dem IVAC-Expressionssystem in jedem beliebigen Wirtstamm zu erreichen, wurde je ein T7 RNA-Polymerase-abhängiger Promotor in beiden IVAC-Kassetten integriert (Abb. 1.7).

Es gab verschiedene Gründe, warum die T7 RNA-Polymerase als RNA-Polymerase für das IVAC-Expressionssystem ausgewählt wurde: (a) Die T7 RNA-Polymerase ist ein sehr einfach aufgebautes Enzym. Sie besteht aus nur einer Untereinheit und benötigt keine zusätzlichen Proteinfaktoren, (b) aufgrund der hohen Prozessivität der T7 RNA-Polymerase können mit der viralen T7 RNA-Polymerase hohe Proteinausbeuten erzielt werden (Studier & Moffatt, 1986) und (c) zusätzlich unterscheiden sich virale Transkriptionsterminatoren von bakteriellen Transkriptionsterminatoren (He *et al.*, 1998; Lyakhov *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Unterschiede in der Transkriptionstermination wurde vermutet, dass die virale T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht erkennt und sich somit besonders für die Expression komplexer Genkluster mit Operonstruktur, die durch Transkriptionsterminatoren unterbrochen sind, eignet.

Die T7-Promotoren der IVAC-Kassetten werden zueinander gegensätzlich angeordnet, um alle Gene des Klusters, unabhängig von ihrer Orientierung, transkribieren zu können (Abb. 1.6, Schritt 4). Der T7-Promotor in der R-IVAC-Kassette wurde zusätzlich unter die Kontrolle eines *lac*-Operators gestellt. Die IVAC-vermittelte vollständige Transkription der Gene soll anhand von Reporter genen nachgewiesen werden. In der L-IVAC-Kassette ist das Kanamycin-Resistenzgen, in der R-IVAC-Kassette das Gen YFP als Reporter gen integriert (Abb. 1.7).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit (Markert, 2005) wurden die beiden IVAC-Kassetten erfolgreich konstruiert. Das Ziel dieser Doktorarbeit bestand darin, die Fähigkeiten des IVAC-Expressionssystems in Bezug auf die funktionelle Expression komplexer Genkluster zu überprüfen.

Dabei sollte zunächst untersucht werden, ob die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren *in vivo* ignoriert und sich somit für die funktionelle Überexpression komplexer Genkluster eignet. Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde der Hydrogenase-Gencluster aus *R. capsulatus* abhängig von der T7 RNA-Polymerase exprimiert.

Anhand des *lac*-Operons aus *E. coli* und des Prodigiosin-Genclusters aus *S. marcescens* sollte schließlich die Funktionsfähigkeit des IVAC-Expressionssystems getestet werden. Es sollte überprüft werden, ob es mit Hilfe des IVAC-Expressionssystems möglich wird, (a) einen Gencluster mittels Konjugation in einen beliebigen Gram-negativen Bakterienstamm zu übertragen, (b) alle Gene durch Transposition stabil in das Genom des neuen Wirtes zu integrieren und (c) anschließend alle Gene des Klusters abhängig von der T7 RNA-Polymerase zu transkribieren.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika, Chemikalien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen in p.A.-Qualität bezogen:

- Antibiotika:** Gerbu (Geilberg), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen)
- Chemikalien:** Roth (Karlsruhe), Gibco BRL (Eggenstein), Amersham Pharmacia (Freiburg), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt)
- Enzyme:** Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Roth) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. T4-DNA-Ligase und T4-DNA-Polymerase wurden ebenfalls von der Firma Fermentas sowie von der Firma Roche (Mannheim) erworben. Lysozym, RNase und Proteinase K wurden von Sigma-Aldrich erworben, DNase wurde von Qiagen und Promega bezogen
- Medienkomponenten:** Difco (Detroit, USA), Fluka (Sternheim), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen)

2.2 Bakterienstämme

2.2.1 *Escherichia coli*

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten *E. coli*-Stämme

Stamm	relevante Eigenschaften	Quelle / Referenz
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> (Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>hsdR17</i>	Hanahan, 1983
JM110	<i>rpsL thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) [F ⁻ <i>traD36 proAB lacIqZ</i> Δ M15] Str ^R	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
S17-1	Ec294::[RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)] <i>pro res, recA</i> Tp ^r Sm ^r	Simon <i>et al.</i> , 1983
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> λ (DE3[<i>lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5</i>])	Studier & Moffatt, 1986

2.2.2 *Pseudomonas putida*

Tab. 2.2: Übersicht über die verwendeten *P. putida*-Stämme

Stamm	relevante Eigenschaften	Quelle / Referenz
KT2440	Wildtyp, katabolisiert Toluol	Nelson <i>et al.</i> , 2002
<i>P. putida</i> ::L> <i>lac</i> <R	<i>P. putida</i> ::pL> <i>lacZYA</i> <R	diese Arbeit
<i>P. putida</i> ::R> <i>lac</i> <L	<i>P. putida</i> ::pR> <i>lacZYA</i> <L	diese Arbeit
<i>P. putida</i> ::L>PIG<R	<i>P. putida</i> ::pL>PIG<R	diese Arbeit
<i>P. putida</i> ::R>PIG<L	<i>P. putida</i> ::pR>PIG<L	diese Arbeit

2.2.3 *Rhodobacter capsulatus*

Tab. 2.3: Übersicht über die verwendeten *R. capsulatus*-Stämme

Stamm	relevante Eigenschaften	Quelle / Referenz
B10S	spontane Sm ^R -Mutante des <i>R. capsulatus</i> B10	Klipp <i>et al.</i> , 1988
P _{T7} >hup	B10S <i>hupV</i> ::Ωspc.T7	Drepper <i>et al.</i> , 2005
<i>PaphII</i> >hup	B10S <i>hupV</i> :: <i>PaphII</i>	Arvani, S., unveröffentlicht
ΔUVSL	B10S <i>hupU</i> ::Sp ^R <i>hupS</i> ::Gm ^R	Arvani, S., unveröffentlicht
<i>R. capsulatus</i> ::L>lac<R	<i>R. capsulatus</i> ::pL>lacZYA<R	diese Arbeit
<i>R. capsulatus</i> ::R>lac<L	<i>R. capsulatus</i> ::pR>lacZYA<L	diese Arbeit
<i>R. capsulatus</i> ::L>PIG<R	<i>R. capsulatus</i> ::pL>PIG<R	diese Arbeit
<i>R. capsulatus</i> ::R>PIG<L	<i>R. capsulatus</i> ::pR>PIG<L	diese Arbeit

2.2.4 *Serratia marcescens*

Tab. 2.4: Verwendeter *S. marcescens*-Stamm

Stamm	relevante Eigenschaften	Quelle / Referenz
W838	Wildtyp <i>pig</i> ⁺	Laborstamm

2.3 Vektoren und Plasmide

Tab. 2.5: Übersicht über die verwendeten Vektoren

Vektoren für <i>E. coli</i>	Genotyp	Quelle / Referenz
pASK-IBA3	Amp ^R , Strep-tag	IBA, Göttingen
pET22b	ColE1 P _{T7Φ10} <i>lacI</i> ^q Amp ^R	Novagen, USA
pFS2I	<i>lacZYA</i> Cm ^R Tc ^R	Masepohl <i>et al.</i> , 1992
pHP45Ω	Sm ^R , Sp ^R , Amp ^R , 4,3 kbp	Prentki & Krisch, 1984
pIC20H	pUC18, Amp ^R	Marsh <i>et al.</i> , 1984
pSVB10	Amp ^R , <i>lacZα</i>	Arnold & Pühler, 1988
pUC18	Amp ^R <i>lacZα</i>	Vieira & Messing, 1982
pUC19	Amp ^R <i>lacZα</i>	Vieira & Messing, 1982
Vektoren mit weitem Wirtsbereich	Genotyp	Quelle / Referenz
pML5	RSF1010 Tc ^R <i>lacZYA</i>	Labes <i>et al.</i> , 1990
pML5-T7	pML5-Derivat Tc ^R <i>T7pol laqI</i> ^q	Drepper <i>et al.</i> , 2005
pML5-Pfru-T7	pML5-Derivat Tc ^R <i>T7pol</i>	Arvani, S., unveröffentl.
rekombinante Plasmide	Genotyp	Quelle / Referenz
pASK-lac	6727 bp Fragment (<i>lacZYA</i>) aus pFS2I in pASK-IBA3, Amp ^R	diese Arbeit
pIC20HL	3562 bp <i>ScaI</i> -Fragment (L-IVAC) aus pL-IVAC3 in pIC20H, Amp ^R , Tc ^R	diese Arbeit
pIC20HRL	3227 bp <i>SmaI</i> -Fragment (R-IVAC) aus pR-IVAC3 in pIC20HL, Amp ^R , Tc ^R , Gm ^R	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 2.5:

rekombinante Plasmide	Genotyp	Quelle / Referenz
pL>GFP	3562 bp <i>ScaI</i> -Fragment (L-IVAC) aus pL-IVAC3 in pSWGFP, Amp ^R , Tc ^R	diese Arbeit
pL>GFP<R	6789 bp <i>XbaI</i> -Fragment (IVAC-Kassetten) aus pIC20HRL in pSWGFP, Amp ^R , Tc ^R , Gm ^R	diese Arbeit
pL-IVAC3	3562 bp <i>ScaI</i> -Fragment (L-IVAC) in pUC18, Amp ^R , Tc ^R	Markert, A., Diplomarbeit
pL>lacZYA<R	6789 bp <i>XbaI</i> -Fragment (IVAC-Kassetten) aus pIC20HRL in pASK-lac, Amp ^R , Tc ^R	diese Arbeit
pL>PIG<R	6789 bp <i>XbaI</i> -Fragment (IVAC-Kassetten) aus pIC20HRL in pPIG, Amp ^R , Tc ^R	diese Arbeit
pPIG	<i>pig</i> -Kluster aus <i>S. marcescens</i> in pUC19, Amp ^R	diese Arbeit
pR>GFP	3227 bp <i>SmaI</i> -Fragment (R-IVAC) aus pR-IVAC3 in pSWGFP, Amp ^R , Gm ^R	diese Arbeit
pR>GFP<L	6789 bp <i>XbaI</i> -Fragment (IVAC-Kassetten) aus pIC20HRL in pSWGFP, Amp ^R , Tc ^R , Gm ^R	diese Arbeit
pR>IVAC3	3226 bp <i>SmaI</i> -Fragment (R-IVAC) in pUC19, Amp ^R , Gm ^R	Markert, A., Diplomarbeit
pR>lacZYA<L	6789 bp <i>XbaI</i> -Fragment (IVAC-Kassetten) aus pIC20HRL in pASK-lac, Amp ^R , Gm ^R	diese Arbeit
pR>PIG<L	6789 bp <i>XbaI</i> -Fragment (IVAC-Kassetten) aus pIC20HRL in pPIG, Amp ^R , Gm ^R	diese Arbeit
pSWGFP	pTZ110 mit promotorlosem <i>gfp</i> , Amp ^R	Wilhelm, S., unveröffentlicht

2.4 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen und sind in Tab. 2.6 aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden jeweils in dem vom Hersteller angegebenen Volumen A. dest. aufgenommen, so dass sie in einer Konzentration von 100 pmol/μL vorlagen.

Tab. 2.6: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
CueR-up	AGTTCGCTGATGTGCCTTTC
CueR-down	AGCTGGTGGCGTTATTCAAC
GFP-RT-up	TGGAGAGGGTGAAGGTGATGC
GFP-RT-down	GGGCATGGCACTCTTGAAAA
Gm-RT-up	GCGGGCTGCTCTTGATCTTT
Gm-RT-down	AGAACGTAAGCCGCGAGAGC

Fortsetzung Tab. 2.6:

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
hupC-up	GCTTTTTTCGGCCGCATCTAC
hupC-down	TACCAGCGCAGCTCGAAGAC
hupD-up	GAGGCGCTGATCGTCTTTGA
hupD-down	GTGGCGATGACGTCCTGAAA
hupG-up	GTGCTGAAAACCCCCTCGTT
hupG-down	TTCGCGGCAAGGATATGAGA
hupH-up	CGAGGACAGCTCTGCCGTTA
hupH-down	CAGATCGAAACTGGCCATGC
hupJ-up	GACGAATTCCGCCAGGTTCT
hupJ-down	GGATCGCTTTGCACGATGAA
hupK-up	CCGCGGCTCTTCAATCTGT
hupK-down	CAGAAGCTTCGGCCAGATCA
hupL-up	AACCTGCAGATCCACGACCA
hupL-down	TCTGCTGCAGTTCGAGGTC
hupR-up	GCGGCTTCTCAATTCCACCT
hupR-down	CGTCGAAACTGGCAAACCTGC
hupS-up	GGCAATTCGTCGAACACTGG
hupS-down	CGGTCGAACAGGCGTTGTAG
hupT-up	GCCTCATCGGCTATGTGCTG
hupT-down	AGCGAAGCCAGCTTTTCGTT
hupU-up	GTGACCGAGACGCTGATGCT
hupU-down	CGCCGAGGCCTTGTATTCAT
hupV-up	GCCGACGACCTGGAACCTTT
hupV-down	ATCGAAACTGCGCACGACAT
hypA-up	CGGTGCAGATCATCGACCTT
hypA-down	TCCTTGATCCGCATCTCGTC
hypB-up	TGCAACCAACCTCGTGTCTT
hypB-down	GGCATCATTCGTCGTCTGCT
hypC-up	ATGGCCTTGGCCGATGTCT
hypC-down	CAAAGCCGACATGGATCAGC
hypD-up	CTACGGGCTCGACAAGCTCA
hypD-down	CATCGCCAAAGGTGCAAAG
hypE-up	CTGTGACGGGGTTTTTCGTCA
hypE-down	CATTGACAATCGCCACATCG
hypF-up	CCTGTCTGGGCGAGAACCTT
hypF-down	CCGCTCGAAGCCCTTGTAAT
lacA-RT-up	CCTGGGTAGAACC GCCTGTC
lacA-RT-down	GGGTGTCCCGTAACGGAAAG
lacY-RT-up	TTCCCGTTTTTCCCGATTTG
lacY-RT-down	AAAGAACGGCGCAAACATCA
lacZ-RT-up	TCCATGTTGCCACTCGCTTT
lacZ-RT-down	TCGGGTTTTTCGACGTT CAGA
PigA-up	GCCTGTCGGCTCTGTTTATC
PigA-down	CTGTTCCAGACGCAGTTTCA
PigB-up	CGGGACAAC TATTCCTGCAT
PigB-down	GGTATCCAGGAAGGCGTACA

Fortsetzung Tab. 2.6:

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
PigC-up	GTTGAACTTTCCGGCGATAA
PigC-down	ACGGCGAATTTCGATAAACTG
PigD-up	CAGGAACGCATTCTGTTCAA
PigD-down	ATGCGTAAGCGTTTTGCTCT
PigE-up	ATTCGGATTCATCGCTCATC
PigE-down	AGGTTTTGTCGTTCCCACAG
PigF-up	CATGGGGTATCTCGACCAAC
PigF-down	GCGGATACAGGAAGGTATCG
PigG-up	GCATATCGCCACCCAGTATC
PigG-down	CATGAGACTCCTGACGCAGA
PigH-up	CGGTTTTGACCTTGAGCATT
PigH-down	ACCACGGTCTGGCAGAATAG
PigI-up	CGACATGGTGAAAATCAACG
PigI-down	GATCACGGCGATCAGTTTTT
PigJ-up	TCAGGTTTTCTGCCATCTCC
PigJ-down	GAAGCCGTCGGTTTTAATGA
PigK-up	GTCATCGAAGTCAGCCCTTC
PigK-down	TTCCGCCAACTGATTAAGC
PigL-up	ACGTTTCCCTCAGCCATTC
PigL-down	ATGTGTCCCAATCGCTGTTC
PigM-up	AGCATTCAAGCGCTTCTTTC
PigM-down	TTTCGTCGTTTACAGACACAGC
PigN-up	GCCGTTGTTTTGTTGATCCT
PigN-down	CCTCGCCGAAATAGCAATAG
PprpoD-up	AGAAGAATCCGAAAGCGGTGAC
PprpoD-down	TTGCGACCATTTTTCTTCAGGA
PR-1.I	ATATTCTAGAATCGGCACCCGCGCCACG
PR-1.II	ATATAAGCTTACTAGTCTAGCCATCGGCACGTTCTCCGC
PR-2.I	ATATTCTAGATCAGCACCATCCGGCGAAGGTA
PR-2.II	ATATAAGCTTACTAGTTTATTTTTTCGCCGACGATCAGGGTG
PR-3.I	ATATTCTAGACCAGTTAGCAACGGGAGCTCGC
PR-3.II	ATATAAGCTTACTAGTTTACAGCACGAAAGGAATGAAACAC
PR-4.I	ATATTCTAGACCCCAATGCGGCAGCGGTT
PR-4.II	ATATAAGCTTTCATTTCTCTGGGTTTAAAACGCAGCA
RerpoD-up	TACATCACCATCGACCAGCTCA
RerpoD-down	CTTCGCTTTCCTCGACCTCTTC
RT-Kan-up	GATTGAACAAGATGGATTGC
RT-Kan-down	TCGGTCTTGACAAAAGAAC
RT-YFP-up	CAGCCACAACGTCTATATCA
RT-YFP-down	TGGTAGCTCAGGTAGTGGTT

2.5 Nährmedien und Zusätze

Alle Nähr- und Testmedien wurden 20 min bei 121°C und 200 kPa autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wurden sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter mit Porendurchmesser von 0,45 µm) und dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur unterhalb von 60°C nachträglich zugesetzt.

2.5.1 Nährmedien für *E. coli*, *P. putida* und *S. marcescens*

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Trypton	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
A. dest.	ad 1000 mL

LB-Agar

Agar	15 g
LB-Medium	ad 1000 mL

α-Komplementations-Agar (Sambrook *et al.*, 1989)

1 mL 100 mM IPTG in 70% (v/v) Ethanol; 3 mL 2% (w/v) X-Gal in DMF; 300 mL LB-Agar

TB-Medium

Caseinhydrolysat	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerin	5 g
Lactose (20 g/L)	100 µl
Glucose (50 g/L)	10 µl
Kpi-Puffer (100 mM, pH 7)	ad 1000 mL

2.5.2 Medien für *R. capsulatus*

PY-Vollmedium

Bacto Peptone	10 g
Hefeextrakt	0,5 g
1M MgCl ₂	2 mL
1M CaCl ₂	2 mL
0,5% FeSO ₄	2,4 mL
A. dest.	ad 1000 mL

PY-Agar

Agar	15 g
PY-Medium	ad 1000 mL

RCV-Minimalmedium

10% DL-Malat	40 mL
20% MgSO ₄	1 mL
7,5% CaCl ₂	1 mL
1% EDTA	2 mL
0,5% FeSO ₄	2,4 mL
0,1% Thiamin	1 mL
Spurenelementlösung	1 mL
1M Phosphat-Puffer	9,6 mL
A. dest.	ad 1000 mL
pH 6,8	

RCV + N

10% (NH ₄) ₂ SO ₄	10 mL
RCV-Medium	ad 1000 mL

RCV + Serin

1M Serin	10 mL
RCV-Medium	ad 1000 mL

Spurenelementlösung für RCV-Medium

MnSO ₄ (x 1H ₂ O)	0,4 g
H ₃ BO ₄	0,7 g
Cu(NO ₃) ₂ (x 3H ₂ O)	0,01 g
ZnSO ₄ (x 7H ₂ O)	0,06 g
NaMoO ₄ (x 2H ₂ O)	0,02 g
A. dest.	ad 1000 mL

2.5.3 Antibiotika**Tab. 2.7: Endkonzentrationen der zur Selektion verwendeten Antibiotika**

Antibiotikum	Konzentration in <i>E. coli</i> -Medien	Konzentration in <i>P. putida</i> - Medien	Konzentration in <i>R. capsulatus</i> - Medien	Konzentration in <i>S. marcescens</i> - Medien
Ampicillin	100 µg/mL	-	-	100 µg/mL
Gentamycin	10 µg/mL	25 µg/mL	4 µg/mL	-
Kanamycin	50 µg/mL	25 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL
Spectinomycin	100 µg/mL	-	10 µg/mL	50 µg/mL
Streptomycin	-	-	200 µg/mL	100 µg/mL
Tetracyclin	50 µg/mL	25 µg/mL	1,5 µg/mL (PY) 0,25 µg/mL (RCV)	10 µg/mL
Irgasan	-	25 µg/mL	-	-

2.6 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

2.6.1 Anzucht von *E. coli*, *P. putida* und *S. marcescens*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C (*E. coli*) bzw. 30°C (*P. putida*, *S. marcescens*). Übernachtkulturen (ÜK) wurden für mindestens 16 h inkubiert. Kulturen mit einem Volumen bis zu 5 mL wurden im Reagenzglas auf einem Brutroller, größere Kulturen im Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen: max. $\frac{1}{10}$ des Gefäßvolumens) auf einem Inkubationsschüttler bei 200 UpM bebrütet. Vorkulturen wurden in LB-Medium (2.5.1) angelegt und entweder mit einer Einzelkolonie oder mit $\frac{1}{100}$ Volumen aus einer Gefrierkultur inokuliert. Hauptkulturen wurden aus einer ÜK auf eine Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} von 0,05 entsprach, angeimpft. Die Zelldichten von Kulturen wurden durch Trübungsmessungen in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 580 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Eine O.D._{580 nm} von 1 entspricht einer Zellzahl von etwa 2×10^9 pro mL Kultur. Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedium ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4°C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜK mit 7,5% (v/v) DMSO versetzt und bei -80°C gelagert. Stämme mit plasmid- oder genomkodierten Resistenzen wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (Tab. 2.7) kultiviert. Für den qualitativen Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität wurde α -Komplementationsagar nach Sambrook *et al.* verwendet (2.5.1).

2.6.2 Phototrophe Anzucht von *R. capsulatus* unter Starklichtbedingungen

R. capsulatus wurde vorzugsweise anaerob im Licht (photoheterotroph) angezogen. Die anaerobe Anzucht erfolgte als Einzelkolonieausstrich auf Festmedium in einem speziellen Anaerob-Inkubationstopf unter Verwendung des Gas-Pack Anaerobic-Systems (BBL). Die anaerobe Anzucht im Flüssigmedium wurde in gasdicht verschließbaren Röhrchen (Hungates), die mit Hilfe eines im Deckel befindlichen Septums mit Argon bzw. N₂ begast wurden, durchgeführt. Unter diesen Wuchsbedingungen wurde *R. capsulatus* für drei Tage im Starklicht (sechs Glühbirnen mit je 60 W; entspricht 2500 lux) inkubiert.

2.6.3 Aerobe Anzucht von *R. capsulatus* im Dunkeln

Die Inkubation von *R. capsulatus* Einzelkolonieausstrichen konnte außerdem unter aeroben Bedingungen im 30°C-Brutschrank und bei Dunkelheit erfolgen.

Mit Zellmaterial von anaerob angezogenen Plattenkulturen konnte *R. capsulatus* aerob in Flüssigmedium kultiviert werden. Dabei erfolgte die Inkubation in einem Reagenzglas üN im Dunkeln auf einem Brutroller.

2.7 Isolierung von Nukleinsäuren

2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. putida* erfolgte nach der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse oder durch die Verwendung von Mini- und Midipräp-Kits der Firmen Eppendorf (Hamburg) und Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller.

Die Konzentration von DNA-Präparationen wurde durch analytische Gelelektrophorese bestimmt.

2.7.2 Isolierung von chromosomaler DNA

Chromosomale DNA aus *E. coli*, *P. putida* oder *S. marcescens* wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen (Hilden) isoliert.

2.8 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung wurden DNA-Fragmente in Agarosegelen mit einer Konzentration von 0,6 % - 2 % (w/v) nach Sambrook *et al.* (1989) elektrophoretisch getrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 x TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na₂-EDTA, pH 8,3) verwendet. Als Längenstandard wurde die „1kb-ladder“ der Firma Fermentas eingesetzt. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurde das Videodokumentationssystem „EagleEye II“ der Firma Stratagene (Heidelberg) zusammen mit der Software „Gel Jet Imager Plus“ der Firma Intas (Göttingen) genutzt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep Gelcleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

2.9 *In-vitro*-Rekombination von DNA

Die Restriktion von DNA, Modifikation von DNA-Enden und Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach Sambrook *et al.* (1989) sowie nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des jeweiligen Enzyms in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. 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 pro Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Pfu*- oder Phusion-Polymerase im jeweiligen Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem jeweiligen von den Herstellern empfohlenen Programm durchgeführt. Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep Gelcleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg).

2.11 *Real-time* PCR

2.11.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung bakterieller Gesamt-RNA wurde ein Aliquot der Bakterienkultur (~ 2 mL) in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Das Zellpellet wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Isolierung von RNA aus *E. coli* und *P. putida* erfolgte durch die Verwendung des RNeasy Mini-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller. *R. capsulatus* wurde vor der Behandlung mit dem RNeasy Mini-Kit in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Kapsel, die *R. capsulatus* umgibt, aufzubrechen und die RNA isolieren zu können.

Die Entfernung der DNA aus den Proben erfolgte mit Hilfe des RNase-Free DNase Sets der Firma Qiagen und der RQ1 RNase-Free DNase der Firma Promega nach Angaben der Hersteller.

Die präparierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.11.2 Synthese der cDNA (reverse Transkription)

Die Synthese der cDNA erfolgte ausgehend von 500 ng Gesamt-RNA, die durch reverse Transkription mit den in Tabelle 2.6 angegebenen Oligonukleotiden und reverser Transkriptase (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) in cDNA umgeschrieben wurde.

Die synthetisierte cDNA wurde als *template* in der *Real-time* PCR eingesetzt.

2.11.3 *Real-time* PCR

Die *Real-time* PCR wurde mit dem RealMasterMix SYBR ROX Kit (5 Prime) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Als Reaktionsvolumen wurden 20 µl gewählt. Um ausschließen zu können, dass die bei der *Real-time* PCR detektierten PCR-Produkte auf Verunreinigungen der isolierten mRNA zurückzuführen sind, wurde die isolierte RNA, die nicht mittels reverser Transkriptase in ihre cDNA umgeschrieben wurde, direkt als *template* in der *Real-time* PCR eingesetzt.

2.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

2.13 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Die Transformation sowie die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach Hanahan (1983) durchgeführt.

2.14 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation und Transposition

2.14.1 Konjugation von *E. coli* S17-1 mit *P. putida* und Transposition

Zum konjugativen Transfer von mobilisierbaren Plasmiden wurde die Methode des „biparentalen matings“ genutzt. Der als Donor verwendete *E. coli*-Stamm S17-1 trägt die *tra*-Gene des RP4-Plasmids (Simon *et al.*, 1986) stabil im Genom integriert.

Als Rezipient diente der *P. putida*-Stamm KT2440. Die Anzucht der *P. putida*- und *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium (2.5.1) unter entsprechendem Selektionsdruck üN bei 30°C (*P. putida*) bzw. 37°C (*E. coli*).

Je 0,5 mL der Rezipientenkultur und der Donorkultur wurden in einem EPG gemischt und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 1 mL LB-Medium gewaschen, um die Zellen von den entsprechenden Antibiotika zu befreien. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (8000 UpM, EZ, RT), in ihrem Restüberstand resuspendiert und auf einen Kreuzungsfilter auf LB-Medium gegeben. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 30°C wurde der Filter in ein EPG mit LB-Medium gegeben und die Zellen wurden durch vortexen von dem Filter gelöst. Sollte das Plasmid nicht nur durch Konjugation übertragen, sondern durch Transposition stabil in dem Genom des Rezipienten integriert werden, verlängerte sich die Inkubationszeit von 4 auf 8 Stunden. Verdünnungen von 10^0 - 10^{-4} dieser Zellen wurden auf entsprechendem Selektivagar (2.5.1) ausplattiert. Zur Kontraselektion des *E. coli*-Donorstamms wurde Irgasan (Ciba Geigy, Basel) in einer Endkonzentration von 25 µg/mL eingesetzt.

2.14.2 Konjugation von *E. coli* S17-1 mit *R. capsulatus* und Transposition

Von einer anaeroben Stammplatte des *R. capsulatus* Rezipienten wurde eine aerobe $\bar{u}N$ -Kultur in 5 mL Minimalmedium (RCV + N) angesetzt. Der plasmidtragende S17-1 Donorstamm wurde in Form eines Einzelkolonieausstrichs selektiv auf Festmedium angezogen. Nach der Inkubation wurde von der S17-1-Stammplatte Zellmaterial aus dem Einzelkoloniebereich abgenommen und in 2 mL PY-Medium (ohne $FeSO_4$) vorsichtig suspendiert.

1 mL der Rezipientenkultur und 0,5 mL der Donorkultur wurden in einem EPG gemischt und abzentrifugiert (8000 UpM, EZ, RT). Das Sediment wurde im Rücklauf resuspendiert, auf einen Kreuzungsfilter auf PY-Platten aufgetragen und $\bar{u}N$ bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Filter in ein EPG mit 1 mL RCV-Medium gegeben und die Zellen wurden durch vortexen von dem Filter gelöst. Von der Bakteriensuspension wurde eine Verdünnungsreihe angelegt und die Zellen auf Selektivagar ausplattiert.

Bei der Integration eines Transposons in das Genom des Rezipienten wurde in gleicher Weise vorgegangen.

2.15 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Gesamtzellextrakt wurde durch Zentrifugation (15 min, 6.000 Upm, 4°C) gewonnen. Das Zellsediment wurde entsprechend einer $O.D._{580} = 20$ in 1 mL Zellaufschlusspuffer (50 mM Kpi, pH 6.5) aufgenommen und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Die so erhaltenen Gesamtzellextrakte (GZE) wurde bei -20°C gelagert.

2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli *et al.* (1970) bestehend aus einem 5 % Sammel- und einem 12 % Trenngel. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerin; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen und vor dem Auftragen 10 min bei 99°C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung in der Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma BioRad (München) erfolgte bei einer Spannung von 100-200 V. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Merril (1990) mit Coomassie Blue R-250 (Serva, Heidelberg) oder mittels „SimplyBlue SafeStain“ (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt.

2.17 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung der Apparatur „Mini-Trans-Blot, Electrophoretic Transfer Cell“ (BioRad, München) auf eine PVDF-Membran (BioRad, München) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte mittels Elektroblob in einem nach Dunn (1986) beschriebenen Puffer (10 mM $NaHCO_3$, 3 mM Na_2CO_3 , 20 % (v/v) Methanol) bei 150 mV für 15 min und bei 300 mV für weitere 20 min. Die PVDF-Membran wurde anschließend für 2,5 h in TBST (50 mM Tris/HCl pH 6,8, 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 0,2 % (v/v) Tween 20) mit 1 % (w/v) Milchpulver blockiert.

Der indirekte immunologische Nachweis wurde unter Verwendung eines spezifischen Antiserums durchgeführt. Die Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem „ECL-Western Blotting Detection“-System (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) unter Verwendung des Zweit-Antikörpers.

2.18 Messung der Fluoreszenz von GFP und YFP

Bei YFP („*yellow fluorescent protein*“) handelt es sich um eine Mutante des GFP („*green fluorescent protein*“) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Sowohl YFP als auch GFP werden als *in-vivo*-Fluoreszenzmarker verwendet. Die Testkulturen wurden üN auf dem Schüttler inkubiert und am darauffolgenden Tag auf eine O.D.₅₈₀ von 1 eingestellt. Die Zellen, gelöst in Tris-HCl, wurden entweder als Ganzzellextrakt oder erst nach einem Ultraschallaufschluss für die Messung verwendet. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Fluoreszenzphotometer. Nach der Anregung mit Licht von einer Wellenlänge von 488 nm emittieren YFP und GFP bei einer Wellenlänge von 527 nm (YFP) bzw. 509 nm (GFP). Durch die Bestimmung der maximalen Emission kann die relative Fluoreszenz pro Zellzahl bestimmt werden und ist ein Maß für die Expression.

2.19 Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität (ONPG-Test)

Das *lacZ*-Gen aus *E. coli* codiert für die β -Galaktosidase. Beim ONPG-Test ersetzt das synthetische Galactosid O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) Laktose als das natürliche Substrat der β -Galaktosidase. Es wird wie Laktose durch die Galaktosid-Permease in die Zelle hineingebracht und durch die β -Galaktosidase hydrolysiert. Hierbei entstehen die Reaktionsprodukte Galaktose und o-Nitrophenol. Letzteres verursacht eine Gelbfärbung und ist photometrisch messbar (440 nm). Die Berechnung der β -Galaktosidase-Aktivität in Miller-Units erfolgt nach folgender Formel: $U = (E_{420} / O.D._{580}) \times ((V_{ges} \times 1000) / (V_{Probe} \times t [min]))$

2.20 Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität

Hydrogenasen katalysieren die Umsetzung von molekularem Wasserstoff (H_2) in $2H^+$ und $2e^-$. Mit Hilfe des Viologens Benzylviologen als Redoxindikator konnte diese Reaktion nachgewiesen werden. Dafür wurden *R. capsulatus*-Hauptkulturen 3 Tage in 50 mL-Hungates photoheterotroph angezogen. Als Medium diente RCV mit Serin als Stickstoffquelle. Zusätzlich wurden 8 mM Fruktose zur Induktion der T7 RNA-Polymerase, 100 μ M $NiCl_2$ und die entsprechenden Antibiotika zu dem Medium gegeben. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zelldichten der Kulturen durch Trübungsmessungen in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 660 nm ermittelt und die Zellen entsprechend einer $O.D._{660} = 0,5$ in 2 mL KH_2PO_4 (pH 9; 20 mM) aufgenommen. Es folgten eine Zentrifugation (8000 UpM, EZ, RT) und ein Waschschritt mit 1 mL KH_2PO_4 . Die Zellen wurden in 1950 μ l KH_2PO_4 resuspendiert und in Anaerob-Küvetten gegeben. Zu der Zellsuspension wurde 50 μ l Benzylviologen (40 mM) gegeben, die Küvetten wurden luftdicht verschlossen und erst 5 min mit Argon, dann 5 min mit Wasserstoff begast. Die Zunahme des reduzierten Benzylviologens wurde in dem Spectrophotometer DU650 (Beckmann) bei 555 nm über 60 min verfolgt.

2.21 Messung von Absorptionsspektren

Zur Identifizierung von Prodigiosin wurden die Absorptionsspektren der unterschiedlich pigmentierten Kulturen gemessen. Prodigiosin zeigt ein Absorptionsmaximum bei 534 nm. Die Testkulturen wurden üN unter induzierten Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zelldichten der einzelnen Kulturen durch Trübungsmessungen in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 580 nm bestimmt und definierte Zellmengen ($O.D._{580} = 0,5$) entnommen. Die Kulturen wurden zentrifugiert (8000 UpM, EZ, RT) und der Überstand wurde verworfen. Mit acidifiziertem Ethanol (4% 1 M HCl) wurden die Pigmente aus den Zellen extrahiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (8000 UpM, EZ, RT) und die Absorption des Überstandes wurde am Spektralphotometer in dem Wellenlängenbereich von 300 nm bis 900 nm bestimmt.

2.22 Bestimmung der relativen Prodigiosin-Produktion (Williamson *et al.*, 2006b)

Zur Bestimmung der relativen Prodigiosin-Produktion pro Zelle wurden die Testkulturen üN angezogen. Die $O.D._{580}$ der ÜK wurde bestimmt und 1 mL jeder Kultur durch Zentrifugation (8000 UpM, EZ, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und Prodigiosin mit acidifiziertem Ethanol (4% 1 M HCl) aus den Zellen extrahiert. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (8000 UpM, EZ, RT) und die Absorption des Überstands bei 534 nm gemessen. Die relative Prodigiosin-Produktion wurde mit folgender Formel berechnet: $(O.D._{580}/A_{534}) \times 50$.

2.23 ESI-FTICR-MS

Zum Nachweis von Prodigiosin mittels Massenspektrometrie wurde Prodigiosin mit acidifiziertem Ethanol (4% 1M Essigsäure) aus der Kultur extrahiert. Die Analyse der Probe wurde mit einem LTQ FT Ultra Massenspektrometer (Thermo Fisher) durch das Zentrale Analytiklabor des Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

2.24 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen wurde durch die Computerprogramme „CLONE Manager for Windows 7“ (Scientific and Educational Software) und diversen Anwendungen des „Expert Protein Analysis“-Systems (<http://expasy.org/>) unterstützt. Homologievergleiche wurden mit den BLAST-Algorithmen des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt. Alignments wurden mit Bio-Edit (Hall, 1999) erstellt. Das Design von Primern wurde mit Hilfe des Primer3 Tools durchgeführt (Rozen & Skaletsky, 2000).

3. Ergebnisse

I. Die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression aller Gene eines Genklusters

3.1 Die Etablierung eines neuen Expressionssystems zur koordinierten Expression aller Gene eines Genklusters

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines neuen Expressionssystems, das sich insbesondere für die heterologe Expression komplexer Genkluster in beliebigen Gram-negativen Bakterienstämmen eignet. Mit Hilfe des neuen Expressionssystems soll es erstmals möglich werden, (a) große Genkluster durch die Integration einer linken (L-IVAC) und rechten (R-IVAC) Kasette zu markieren, (b) den markierten Abschnitt mittels Konjugation in einen Gram-negativen Bakterienstamm zu übertragen und (c) durch Transposition die zu exprimierenden Gene stabil in das Genom des neuen Wirtes zu integrieren. Mit der T7 RNA-Polymerase soll (d) die vollständige Expression aller Gene des Klusters, unabhängig von ihrer Anzahl und Orientierung, gewährleistet werden.

Bislang gibt es kein Expressionssystem, das die funktionelle Expression von komplexen Genklustern in beliebigen heterologen Bakterienstämmen ermöglicht. Ein Problem der heterologen Expression ist, dass verschiedene Bakterienstämme unterschiedliche Promotorstrukturen besitzen und die wirtsfremden Promotoren in den heterologen Bakterienstämmen häufig nicht erkannt werden. Somit ist die heterologe Expression von Genen häufig auf einige wenige nahe verwandte Wirtsstämme limitiert. Um eine heterologe Expression eines Gens auch in nicht verwandten Bakterienstämmen zu erreichen, muss ein wirtsspezifischer Promotor vor dem zu exprimierenden Gen integriert werden (Fu *et al.*, 2008). Für die Synthese vieler bakterieller Naturstoffe wird jedoch eine große Anzahl von Genen benötigt, die natürlicherweise in geklusterten Genregionen vorliegen. Die Genkluster weisen häufig eine komplexe Struktur auf und sind in verschiedene Operons unterteilt. Für die heterologe Expression solcher Kluster reicht es nicht, einen Promotor vor dem gesamten Genkluster zu integrieren. Durch die Operonstruktur der Kluster sind auch Transkriptionsterminatoren in dem Genklustern lokalisiert, an denen die Transkription der RNA-Polymerase abbricht. Es wäre notwendig, hinter jedem Transkriptionsterminator einen neuen wirtsspezifischen Promotor zu integrieren. Aufgrund der molekularbiologischen Handhabung der Kluster ist dies jedoch sehr zeitaufwändig oder sogar unmöglich.

Es ist bekannt, dass die viralen Transkriptionsterminatoren sich von den bakteriellen Transkriptionsterminatoren unterscheiden (He *et al.*, 1998). Daher wurde vermutet, dass virale Polymerasen, z. B. die T7 RNA-Polymerase, bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht erkennen und sich somit für die funktionelle Expression komplexer Genkluster eignen. Anhand des Hydrogenase-Genklusters aus *Rhodobacter capsulatus* wurde diese Hypothese überprüft. Die *uptake*-Hydrogenase aus *R. capsulatus* katalysiert die reversible Oxidation von molekularem Wasserstoff nach folgender Formel: $H_2 \leftrightarrow 2H^+ + 2e^-$ und ermöglicht so der Zelle, H_2 aufzunehmen und autotroph mit H_2 als alleiniger Elektronenquelle zu wachsen (Vignais & Billoud, 2007). Der Hydrogenase-Gencluster besteht aus insgesamt 19 Genen, die auf dem Chromosom von *R. capsulatus* in der *hup*-Region (*hydrogen-uptake*) vorliegen (Abb. 3.1a). Neben den Strukturgenen *hupS* und *hupL* sind Gene in dem Cluster lokalisiert, deren Genprodukte u. a. in die Regulation der Hydrogenase-Expression oder in die Synthese und den Einbau von Kofaktoren (HupS: drei Fe-S Cluster; HupL: [NiFe]-Cluster) involviert sind. Die gesamte Genregion umfasst eine Größe von 25 kb (Vignais & Colbeau, 2004). Alle *hup*- und *hyp*-Gene liegen in einer Orientierung vor. Der Cluster ist in fünf Operons unterteilt, die voneinander durch Transkriptionsterminatoren getrennt werden (Abb. 3.1a). Sowohl der Nachweis der Transkription des Hydrogenase-Genclusters mit einer RT-PCR als auch der Nachweis der funktionellen Synthese der Hydrogenase sind möglich, da der Hydrogenase-Cluster vollständig sequenziert und ein Hydrogenase-Aktivitätstest etabliert ist. Aufgrund des stetig wachsenden Interesses an der biologischen Wasserstoffproduktion, ist die Expression der Hydrogenase außerdem für die Biotechnologie von Bedeutung. Somit ist der Hydrogenase-Gencluster das ideale Beispiel, um zu überprüfen, ob die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren ignoriert und sich für die funktionelle Expression von komplexen Genclustern eignet.

3.1.1 Konstruktion eines T7 RNA-Polymerase-basierten Expressionssystems in *R. capsulatus*

Für die funktionelle Überexpression der *uptake*-Hydrogenase aus *R. capsulatus* müssen neben den Strukturgenen *hupS* und *hupL*, die für die kleine und große Untereinheit der Hydrogenase kodieren, auch die akzessorischen *hup*- und *hyp*-Gene des Klusters überexprimiert werden, deren Genprodukte u. a. in den Einbau und die Synthese der Kofaktoren oder die Faltung der Hydrogenase-Untereinheiten involviert sind.

Um zu überprüfen, ob sich die T7 RNA-Polymerase für die funktionelle Überexpression des Hydrogenase-Genklusters eignet, wurde ein T7 RNA-Polymerase-abhängiger Promotor *upstream* der Strukturgene *hupS* und *hupL* und der akzessorischen Gene in das Gen *hupV* inseriert (Abb. 3.1a). Das Gen *hupV* kodiert für die große Untereinheit der Sensor-Hydrogenase HupUV. Die Sensor-Hydrogenase ist, aufgrund ihrer Fähigkeit H₂ zu binden und durch die Interaktion mit dem Zweikomponenten-System HupT/HupR, direkt an der Regulation der Transkription der *uptake*-Hydrogenase beteiligt, aber nicht an ihrer funktionellen Expression. Die Untereinheiten der Sensor-Hydrogenase HupU und HupV zeigen große Ähnlichkeiten zu den Untereinheiten HupS und HupL der *uptake*-Hydrogenase, im Gegensatz zu der membrangebundenen *uptake*-Hydrogenase liegt die Sensor-Hydrogenase jedoch im Cytoplasma vor (Vignais *et al.*, 1997). Die Oxidation von molekularem H₂ kann auch durch die Sensor-Hydrogenase katalysiert werden. Durch die Deletion des Gens *hupV* wird das spezifische Regulationssystem ausgeschaltet, was zu einer verminderten *uptake*-Hydrogenase-Expression in dem neuen Expressionsstamm führt (Elsen *et al.*, 1996). Der Vorteil der Deletion des Gens *hupV* ist jedoch, dass in dem Hydrogenase-Aktivitätstest zum Nachweis der funktionellen Expression der *uptake*-Hydrogenase, der auf der Umsetzung des Substrats H₂ basiert, nur die spezifische Aktivität der *uptake*-Hydrogenase gemessen wird und nicht zusätzlich die Aktivität der Sensor-Hydrogenase HupUV. Als Kontrolle für das T7-Expressionssystem wurde ein bakterieller Promotor, der Promotor *PaphII* des Kanamycin-Resistenzgens, anstatt des T7-Promotors in das Gen *hupV* integriert (Abb. 3.1b).

Es wurden zwei Kassetten konstruiert, um die beiden Promotoren durch homologe Rekombination in das Gen *hupV* inserieren zu können. Die Kassetten besaßen folgende Eigenschaften: (a) in beiden Kassetten war je ein Resistenzgen als Selektionsmarker vorhanden (Spc^R, Km^R), (b) in beiden Kassetten war ein Promotor zur Transkription des Hydrogenase-Klusters lokalisiert (T7-Promotor, *PaphII*) und (c) vor den Promotoren wurde je ein Transkriptionsterminator inseriert, um auszuschließen, dass, ausgehend von Promotoren

vor den Kassetten, zusätzliches Transkript der Hydrogenase-Gene gebildet wird. Durch homologe Rekombination wurden die Kassetten erfolgreich in dem Gen *hupV* integriert (Abb. 3.1a, b; Arvani, S., unveröffentlicht). Die durch die Integration der Kassetten konstruierten Stämme werden im Folgenden als $P_{T7}>hup$ bzw. *PaphII*>hup bezeichnet.

Da der Stamm $P_{T7}>hup$ keine T7 RNA-Polymerase enthält, wurde zusätzlich der Vektor pML5-Pfru-T7 konstruiert. Der Vektor enthält neben einer Tetracyclinresistenz und einem *broad-host-range* ori ein T7 RNA-Polymerase-Gen (Abb. 3.2). Das T7 RNA-Polymerase-Gen wurde unter die Kontrolle des *R. capsulatus fru*-Promoters gestellt. Somit ist die Expression der T7 RNA-Polymerase in *R. capsulatus* durch die Zugabe von Fruktose induzierbar. Als Kontrolle wurde der Leervektor pML5, der kein T7 RNA-Polymerase-Gen besitzt, genutzt. Die Vektoren pML5-Pfru-T7 bzw. pML5 wurden für die funktionelle Expression der Hydrogenase in den Stamm $P_{T7}>hup$ durch Konjugation (2.14.2) übertragen.

Mittels RT-PCR und eines Hydrogenase-Aktivitätstests wurden im Folgenden sowohl die Transkription als auch die funktionelle Synthese der Hydrogenase in den neuen Expressionsstämmen $P_{T7}>hup$ und *PaphII*>hup untersucht. Als Kontrolle wurde auch der *R. capsulatus* Wildtypstamm B10S in Bezug auf Transkription und Synthese der Hydrogenase analysiert. Wenn die Vermutung bestätigt wird, dass die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht erkennt, ist in dem Stamm $P_{T7}>hup$ mit dem T7 RNA-Polymerase tragendem Plasmid pML5-Pfru-T7 zusätzliches Transkript zu dem Transkript, das durch die natürlichen Promotoren des Hydrogenase-Klusters synthetisiert wird, vorhanden (Abb. 3.1a). Im Gegensatz dazu sollte in dem Stamm *PaphII*>hup kein zusätzliches Transkript zu dem Wildtyp-Transkript detektiert werden. Der Transkriptionsterminator, der hinter dem Gen *hupV* lokalisiert ist, verhindert die fortlaufende Transkription der bakteriellen Polymerase (Abb. 3.1b).

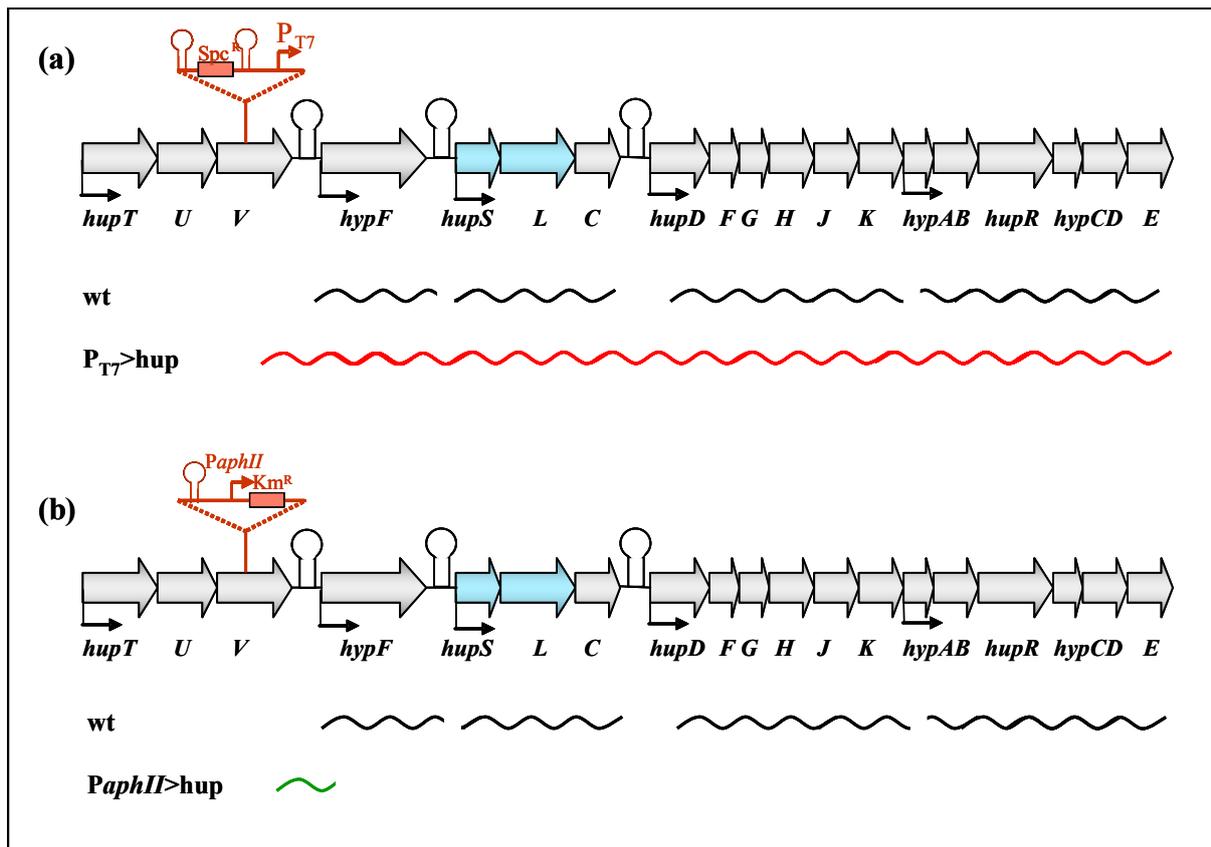


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Hydrogenase-Genclusters aus *R. capsulatus* und Konstruktion der Expressionsstämme $P_{T7}>hup$ und $PaphII>hup$. (a) Konstruktion des T7-Expressionsstamms $P_{T7}>hup$. Durch homologe Rekombination wurde eine Kasse mit einem T7-Promotor in das Gen *hupV* des Hydrogenase-Genclusters in *R. capsulatus* B10S inseriert. Wenn die Vermutung bestätigt wird, dass die T7 RNA-Polymerase keine bakteriellen Transkriptionsterminatoren erkennt, wird zusätzlich zu dem Wildtyp-Transkript (schwarze Linien) Transkript der T7 RNA-Polymerase synthetisiert (rote Linie). (b) Konstruktion des Expressionsstamms $PaphII>hup$ durch die Integration der Kasse $PaphII$ in das Gen *hupV* von *R. capsulatus* B10S. Der Transkriptionsterminator, der hinter dem Gen *hupV* lokalisiert ist, sollte die Transkription der bakteriellen Polymerase unterbrechen (grüne Linie). Die großen Pfeile stellen die einzelnen *hup*- und *hyp*-Gene des Klusters dar, die kleinen Pfeile die Promotoren. Die Strukturen *hupS* und *hupL* sind blau markiert. Die Loops symbolisieren die Transkriptionsterminatoren, die im Cluster lokalisiert sind. Die durch homologe Rekombination integrierten Kassetten sind rot hervorgehoben. Die wellenförmigen Linien stellen die vermuteten Transkripte im Wildtyp (schwarz), im Stamm $P_{T7}>hup$ (rot) und im Stamm $PaphII>hup$ (grün) dar.

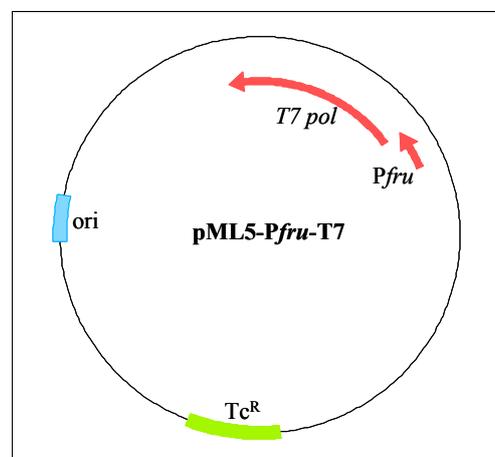


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Vektors **pML5-Pfru-T7**. Das T7 RNA-Polymerase-Gen (*T7 pol*) steht unter der Kontrolle des Fruktose-Promotors (P_{fru}). *ori* = origin of replication; Tc^R = Tetracyclinresistenz-Gen

3.1.2 Analyse der T7 RNA-Polymerase-abhängigen Transkription des Hydrogenase-Genklusters in *R. capsulatus*

Um zu untersuchen, ob die T7 RNA-Polymerase die bakteriellen Transkriptionsterminatoren, die in dem Hydrogenase-Gencluster lokalisiert sind, ignoriert, wurden mit einer RT-PCR die Transkriptkonzentrationen aller Gene des Hydrogenase-Klusters in dem *R. capsulatus* Wildtyp und den neuen Expressionsstämmen P_{T7}>hup und PaphII>hup bestimmt. Erkennt die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht, ist in dem Stamm P_{T7}>hup mit dem T7 RNA-Polymerase tragenden Plasmid pML5-Pfru-T7 zusätzlich zu der vom Wildtyp gebildeten mRNA Transkript vorhanden. Die gesteigerten Transkriptkonzentrationen der einzelnen Gene im Vergleich zu dem *R. capsulatus* Wildtyp sind dann mit einer RT-PCR nachweisbar (Abb. 3.1a). Der zusätzliche bakterielle Promotor PaphII in dem Stamm PaphII>hup sollte dagegen zu keiner Steigerung der Transkription des Hydrogenase-Genklusters im Vergleich zum Wildtyp führen. Ein Transkriptionsterminator, der direkt hinter dem Gen *hupV* lokalisiert ist, verhindert die fortlaufende Transkription der bakteriellen Polymerase (Abb. 3.1b).

Der *R. capsulatus* Wildtyp und die Expressionsstämme P_{T7}>hup und PaphII>hup wurden unter Bedingungen inkubiert, welche die natürliche Expression der Hydrogenase induzieren, d. h. die Stämme wurden heterotroph im Licht unter Ausschluss von Sauerstoff angezogen (2.6.2) und dem Medium wurde Serin als Stickstoff-Quelle zugesetzt. Mit Serin als einziger Stickstoff-Quelle im Medium fixiert *R. capsulatus* Luftstickstoff und durch die Stickstofffixierung wird Wasserstoff gebildet, der als Induktor für die Synthese der Hydrogenase dient.

Die Expression der T7 RNA-Polymerase wurde durch die Zugabe von 8 mM Fruktose induziert. Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase (O.D.₆₆₀ = 1) wurden jeweils 2 ml Kultur der verschiedenen *R. capsulatus*-Stämme für die Analyse in der RT-PCR entnommen. Die mRNA der verschiedenen Stämme wurde isoliert (2.11.1) und als *template* in der reversen Transkription zur Synthese der cDNA eingesetzt (2.11.2). Als Primer in der reversen Transkription wurden jeweils nur die spezifischen *down*-Primer der einzelnen Hydrogenase-Gene verwendet, die an das gebildete Transkript binden. Die Transkription der Gene *hupF*, *hupK* und *hupR* konnte nicht analysiert werden, da für diese Gene keine geeigneten Primer synthetisiert werden konnten. Zur Bestimmung der Transkription des *hup*-Klusters wurde die bei der reversen Transkription gebildete cDNA als *template* in der RT-PCR (2.11.3) verwendet.

Wie erwartet konnte Transkript aller *hup*- und *hyp*-Gene in dem *R. capsulatus* Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 3.3). Die RNA-Konzentrationen der einzelnen Gene des Hydrogenase-Klusters lagen zwischen 0,005 pg (*hypC*) und 0,46 pg (*hypB*). Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, kann der Hydrogenase-Genkluster in unterschiedliche Operons unterteilt werden. Unerwarteterweise wurde jedoch nicht jeweils das erste Gen eines Operons, das sich direkt hinter einem Promotor befindet, am stärksten transkribiert. Stattdessen wurden die Strukturgene *hupS* und *hupL* und die Gene *hupG*, *hypA* und *hypB*, deren Genprodukte am Einbau und der Synthese der Kofaktoren beteiligt sind (Colbeau *et al.*, 1993), verhältnismäßig stark exprimiert.

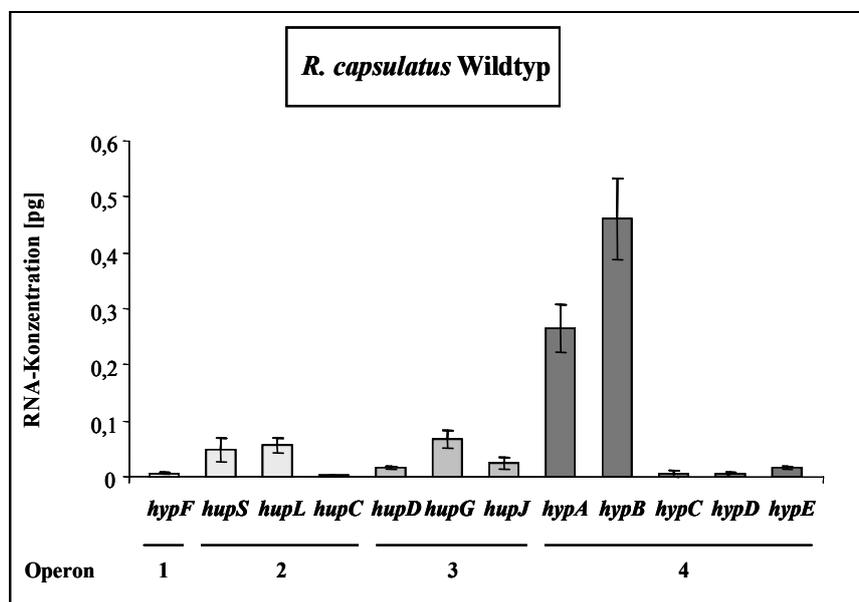


Abb. 3.3: Nachweis der Transkription des Hydrogenase-Genklusters in dem *R. capsulatus* Wildtypstamm B10S. Mit einer RT-PCR konnte die Transkription aller Gene des Hydrogenase-Genklusters bestätigt werden. Der *R. capsulatus* Wildtypstamm B10S wurde dazu unter Hydrogenase-induzierenden Bedingungen inkubiert, die mRNA isoliert und jeweils 150 ng als *template* in der reversen Transkription eingesetzt. In der RT-PCR wurde dann die synthetisierte cDNA als *template* verwendet. Die Abbildung stellt die unterschiedlichen RNA-Konzentrationen der einzelnen *hup*- und *hyp*-Gene des Klusters dar. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen RNA-Konzentrationen der Gene auf die natürliche Regulation der Hydrogenase-Expression in der Zelle oder auf unterschiedliche RT-PCR-Effizienzen aufgrund der verschiedenen Primerpaare zurückzuführen sind, wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt. (a) Alternative Primerpaare für die Gene *hupL* und *hupC* wurden synthetisiert und in einer RT-PCR eingesetzt, um am Beispiel dieser zwei Gene zu testen, ob andere Primer zu unterschiedlichen Ergebnissen in der RT-PCR führen. Wie in Abbildung 3.4a dargestellt, führten die alternativen Primer jedoch zu ähnlichen Ergebnissen wie die ersten Primerpaare. (b) Die Fähigkeiten aller eingesetzten Primer, an ein *template* zu

binden, wurden getestet. Dafür wurden in einer PCR die verschiedenen Primer jeweils mit einer definierten Konzentration an chromosomaler DNA aus *R. capsulatus* als *template* eingesetzt. Im Gegensatz zu der RT-PCR sind die *template*-Konzentrationen jetzt in allen Ansätzen konstant und je mehr PCR-Produkt entsteht, desto besser bindet das beteiligte Primerpaar. In Abbildung 3.4b ist das Ergebnis dieser Kontrolle dargestellt. Die weißen Balken zeigen die unterschiedlichen RNA-Konzentrationen der *hup*- und *hyp*-Gene in dem *R. capsulatus* Wildtyp, die grauen Balken stellen die gebildeten Produkt-Konzentrationen aus dem Kontrollexperiment dar. Im Vergleich zu den unterschiedlichen Transkriptkonzentrationen blieben die Konzentrationen der PCR-Produkte mit chromosomaler DNA als *template* stabil. Die verschiedenen Primer unterscheiden sich somit nicht erheblich in ihrer Fähigkeit, an ein *template* zu binden. Die unterschiedlichen RNA-Konzentrationen der *hup*- und *hyp*-Gene im *R. capsulatus* Wildtyp sind somit auf die natürliche Regulation der Expression der Hydrogenase-Gene zurückzuführen und nicht auf die Bedingungen in der RT-PCR. Es wäre möglich, dass Endonukleasen die synthetisierte mRNA prozessieren und diese Prozessierung zu den unterschiedlichen Transkriptkonzentrationen der Gene führt.

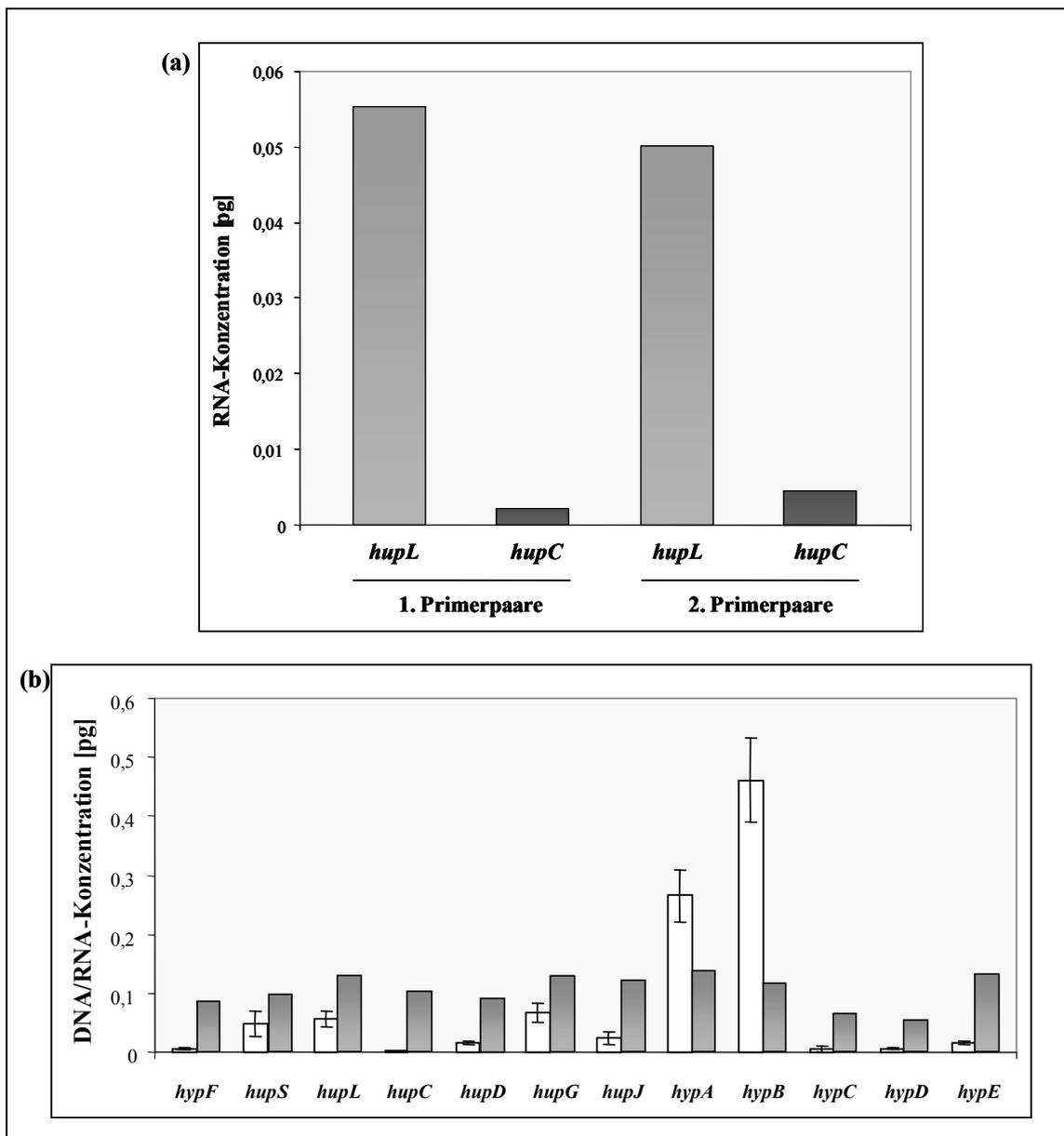


Abb. 3.4: Überprüfung der einzelnen Primerpaare, die in der reversen Transkription zum Nachweis der Transkription der Gene des Hydrogenase-Genklusters im *R. capsulatus* Wildtypstamm B10S eingesetzt wurden. (a) Vergleich der PCR-Effizienzen, die durch den Einsatz zweier alternativer Primerpaare in der RT-PCR entstehen. (b) Vergleich der unterschiedlichen Transkriptionskonzentrationen der einzelnen *hup*- und *hyp*-Gene im *R. capsulatus*-Wildtyp B10S (weiße Balken) mit der PCR-Effizienz, die durch den Einsatz verschiedener Primer in der reversen Transkription hervorgerufen wird (graue Balken). Zur Bestimmung der PCR-Effizienz wurde als *template* in der PCR eine definierte Konzentration (150 ng) von chromosomaler DNA eingesetzt.

In den Expressionsstämmen *PaphII*>hup und P_{T7} >hup wurde das Gen *hupV* durch die Integration von Kassetten, in denen der Promotor *PaphII* bzw. der T7-Promotor vorlag, deletiert. Es wurde erwartet, dass in diesen Expressionsstämmen die Transkription der einzelnen Gene des Hydrogenase-Genklusters im Vergleich zu dem *R. capsulatus* Wildtyp reduziert ist. Durch die Deletion des Gens *hupV* wird die Sensor-Hydrogenase HupUV, die in die Regulation der *uptake*-Hydrogenase-Expression involviert ist, ausgeschaltet. Dadurch wird die Synthese der *uptake*-Hydrogenase reduziert (Elsen *et al.*, 1996). Der zusätzliche bakterielle Promotor *PaphII* sollte gleichzeitig zu keiner Steigerung der Hydrogenase-Transkription führen, da ein Transkriptionsterminator *downstream* von *hupV* die fortlaufende Transkription der bakteriellen Polymerase verhindert. In dem Expressionsstamm P_{T7} >hup ohne das T7 RNA-Polymerase-Gen tragende Plasmid pML5-Pfru-T7 wurde auch keine zusätzliche Transkription des Klusters erwartet, da in diesem Stamm keine T7 RNA-Polymerase vorliegt. In Abbildung 3.5 sind die Ergebnisse der RT-PCR mit den Expressionsstämmen *PaphII*>hup und P_{T7} >hup dargestellt. In dem Stamm *PaphII*>hup wurde ebenso wie in dem *R. capsulatus* Wildtyp Transkript von nahezu allen Genen des Klusters detektiert (Abb. 3.5a). Wie erwartet führte die Deletion des Gens *hupV* durch die Integration einer Kasette jedoch zu einer verminderten Transkription des Hydrogenase-Genklusters. Die RNA-Konzentrationen der einzelnen Gene des Hydrogenase-Klusters lagen jetzt zwischen $1,54 \times 10^{-3}$ pg (*hypF*) und 0,06 pg (*hypA*). Die mRNA einiger Gene (*hupC*, *hupD*, *hypC*, *hypD*, *hypE*) konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Gene werden im Wildtyp am schwächsten exprimiert und liegen wahrscheinlich aufgrund der Reduktion der Transkription des gesamten Klusters im Stamm *PaphII*>hup unter der Nachweisgrenze der RT-PCR.

Die Untersuchung der Transkription des Hydrogenase-Klusters in dem Stamm P_{T7} >hup mit dem Plasmid pML5, das kein T7 RNA-Polymerase-Gen enthält, führte zu vergleichbaren Ergebnissen wie in dem Stamm *PaphII*>hup. Außer den Genen *hupC*, *hupD*, *hypC*, *hypD* und *hypE* konnte Transkript aller im Hydrogenase-Kluster lokalisierter Gene aufgezeigt werden (Abb. 3.5b). Die einzelnen RNA-Konzentrationen der Gene lagen zwischen $1,02 \times 10^{-3}$ pg (*hypF*) und 0,09 pg (*hypA*).

Wie erwartet wurde durch die Deletion des Gens *hupV* sowohl in dem Expressionsstamm *PaphII*>hup als auch in dem Stamm P_{T7} >hup die Transkription des gesamten Klusters reduziert. Interessanterweise änderten sich jedoch in beiden Expressionsstämmen die Verhältnisse der mRNA-Konzentrationen der einzelnen Gene zueinander im Vergleich zum Wildtyp kaum. Die Strukturgene *hupS* und *hupL*, sowie *hupG*, *hypA* und *hypB* werden auch in

den Stämmen *PaphII*>hup und P_{T7} >hup am stärksten exprimiert. Im Gegensatz zu dem Wildtyp wird nur das Gen *hypB* verhältnismäßig gering exprimiert.

Die Ergebnisse der RT-PCR belegen, dass mit dem bakteriellen Promotor *PaphII* in dem Stamm *PaphII*>hup keine zusätzliche Transkription des Hydrogenase-Genklusters im Vergleich zu dem *R. capsulatus* Wildtyp erzielt werden konnte. Durch die Deletion des Gens *hupV* in dem Stamm *PaphII*>hup wurde die Transkription des Klusters sogar vermindert. Eine bakterielle Polymerase eignet sich somit nicht für die funktionelle Überexpression komplexer Genkluster, da eine fortlaufende Transkription der bakteriellen RNA-Polymerase durch Transkriptionsterminatoren verhindert wird.

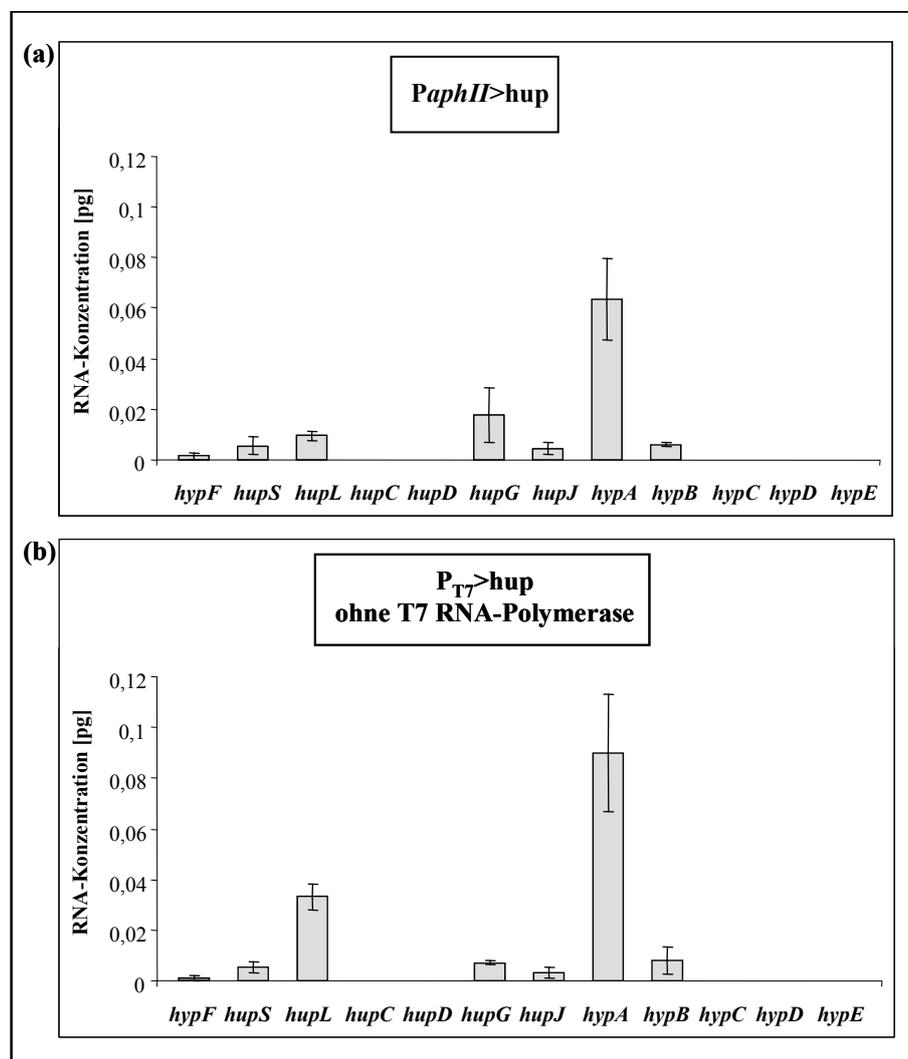


Abb. 3.5: Nachweis der Transkription des Hydrogenase-Genklusters in den *R. capsulatus*-Stämmen (a) *PaphII*>hup und (b) P_{T7} >hup. Mit einer RT-PCR konnte die Transkription der Gene des Hydrogenase-Genklusters in den Stämmen *PaphII*>hup (B10S *hupV*::*PaphII*) und P_{T7} >hup (B10S *hupV*:: Ω spcT7) nachgewiesen werden. Dazu wurden die Stämme unter Hydrogenase-induzierenden Bedingungen inkubiert, die mRNA isoliert und jeweils 150 ng als *template* in der reversen Transkription eingesetzt. Die Abbildung stellt die unterschiedlichen mRNA-Konzentrationen der einzelnen *hup*- und *hyp*-Gene des Klusters dar. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Um zu überprüfen, ob die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren ignoriert und sich für die funktionelle Überexpression komplexer Genkluster eignet, wurde das Plasmid pML5-*Pfru*-T7, in dem das Gen der T7 RNA-Polymerase inseriert ist, in den Stamm P_{T7}>hup durch Konjugation (2.14.2) übertragen. Wenn sich die Vermutung bestätigt, dass die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht erkennt, sollte in dem T7-Expressionsstamm mit der RT-PCR zusätzliches Transkript zu dem Wildtyp-Transkript nachzuweisen sein.

In Abbildung 3.6 sind die Ergebnisse der RT-PCR des T7-Expressionsstamms P_{T7}>hup mit T7 RNA-Polymerase dargestellt. Wie erwartet wurde abhängig von der T7 RNA-Polymerase die Transkription aller Gene des Hydrogenase-Genklusters im Vergleich zum Wildtyp gesteigert. Die RNA-Konzentrationen der einzelnen Gene lagen jetzt zwischen 0,083 pg (*hupC*) und 4,93 pg (*hypA*) und übertrafen damit deutlich die Transkript-Konzentrationen im *R. capsulatus* Wildtyp-Stamm (Abb. 3.7). Die Steigerung der Transkription aller Gene des Klusters durch die T7 RNA-Polymerase verdeutlicht, dass die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht erkennt. Im Gegensatz zu der bakteriellen Polymerase im Stamm *PaphII*>hup wird zusätzliches Transkript gebildet. Die bakterielle Polymerase dagegen ist nicht in der Lage, die Gene des Hydrogenase-Genklusters zu überexprimieren, da eine fortlaufende Transkription durch Terminationen verhindert wird.

Unerwartet wurden jedoch auch in dem Stamm P_{T7}>hup mit T7 RNA-Polymerase ähnliche Verhältnisse der mRNA-Konzentrationen der einzelnen Hydrogenase-Gene zueinander beobachtet wie in dem *R. capsulatus* Wildtyp und in den Stämmen *PaphII*>hup und P_{T7}>hup ohne T7 RNA-Polymerase. Die T7 RNA-Polymerase bildet somit nicht ein langes und stabiles Transkript, wie es in Abbildung 3.1a dargestellt ist. Ein langes Transkript würde zu einer konstanten Überexpression aller Gene mit gleicher RNA-Konzentration führen. Stattdessen unterliegt wahrscheinlich auch das von der T7 RNA-Polymerase synthetisierte Transkript den natürlichen Regulationsprozessen in der Zelle und wird von Endonukleasen prozessiert.

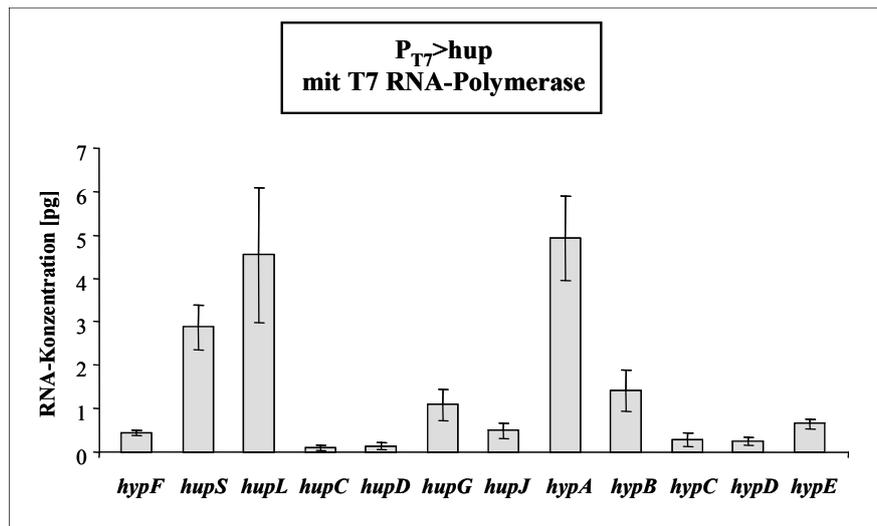


Abb. 3.6: Nachweis der T7 RNA-Polymerase-abhängigen Transkription aller Gene des Hydrogenase-Genklusters in dem *R. capsulatus*-Stamm $P_{T7}>hup$ mit T7 RNA-Polymerase. Durch Konjugation wurde das T7 RNA-Polymerase tragende Plasmid pML5-Pfru-T7 in den T7-Expressionsstamm $P_{T7}>hup$ (B10S *hupV*:: Ω spcT7) übertragen und die T7 RNA-Polymerase abhängige Expression der Hydrogenase durch die Zugabe von 8 mM Fruktose induziert. Der Stamm wurde unter Hydrogenase-induzierenden Bedingungen inkubiert, die mRNA isoliert und jeweils 150 ng als *template* in der reversen Transkription eingesetzt. In der RT-PCR wurde dann die synthetisierte cDNA als *template* verwendet. Die Abbildung stellt die unterschiedlichen RNA-Konzentrationen der einzelnen *hup*- und *hyp*-Gene des Klusters dar. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

In Tabelle 3.1 werden die Ergebnisse der RT-PCR zum Nachweis der Transkription des Hydrogenase-Genklusters zusammengefasst. Wie aus Tabelle 3.1 hervorgeht, wird durch die Integration des Promotors *PaphII* bzw. des T7-Promotors die Expression aller Gene des Hydrogenase-Klusters im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Es konnte eine Verminderung der Transkription um den Faktor 0,02 (*hypB*) bis 0,43 (*hypF*) festgestellt werden. Mit dem zusätzlichen bakteriellen Promotor *PaphII* konnte somit keine Steigerung der Transkription der Gene des Hydrogenase-Klusters erzielt werden, da vermutlich die Transkription der bakteriellen RNA-Polymerase durch Transkriptionsterminatoren unterbrochen wird.

Die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression des Hydrogenase-Klusters in dem Stamm $P_{T7}>hup$ führte dagegen zu einer erhöhten Transkription aller Gene des Hydrogenase-Klusters. Im Vergleich zu dem *R. capsulatus* Wildtyp wurde die Transkription maximal um den Faktor 81 (*hupL*) erhöht. Dieses Ergebnis lässt die Aussage zu, dass die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht erkennt und sich somit für die koordinierte Expression aller Gene einer Genregion eignet.

Gen	<i>PaphII</i> >hup	P _{T7} >hup – T7 Polymerase	P _{T7} >hup + T7 Polymerase
<i>hypF</i>	0,35	0,43	74
<i>hupS</i>	0,08	0,1	59
<i>hupL</i>	0,16	0,25	81
<i>hupC</i>	-	-	40
<i>hupD</i>	-	-	8
<i>hupG</i>	0,25	0,1	16
<i>hupJ</i>	0,15	0,11	20
<i>hypA</i>	0,25	0,5	18
<i>hypB</i>	0,02	0,03	3
<i>hypC</i>	-	-	55
<i>hypD</i>	-	-	38
<i>hypE</i>	-	-	41

Tabelle 3.1: Veränderung der Transkription einzelner Hydrogenase-Gene durch die artifizielle Expression des Hydrogenase-Klusters mit einem zusätzlichen bakteriellen (*PaphII*>hup) bzw. viralen Promotor (P_{T7}>hup) im Vergleich zu dem *R. capsulatus* Wildtyp.

Die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression der Gene des Hydrogenase-Genklusters in dem T7-Expressionsstamm P_{T7}>hup führte zu einer verstärkten Transkription aller Gene des Klusters. Die Ergebnisse der RT-PCR belegen, dass die T7 RNA-Polymerase im Gegensatz zu bakteriellen Polymerasen bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht erkennt. Wider Erwarten führte die Transkription mit der T7 RNA-Polymerase nicht zu einer konstanten Überexpression aller Gene des Klusters. Stattdessen wurde das durch die T7 RNA-Polymerase gebildete Transkript wahrscheinlich durch Endonukleasen wie in dem *R. capsulatus* Wildtyp modifiziert.

3.1.3 Einfluss der verstärkten Transkription des Hydrogenase-Genclusters auf die funktionelle Synthese der Hydrogenase

Die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression des Hydrogenase-Genclusters in dem Stamm $P_{T7}>hup$ führt zu einer gesteigerten Transkription aller Gene des Hydrogenase-Klusters. Eine verstärkte Transkription von Genen bedeutet jedoch nicht unbedingt auch die Erhöhung der funktionellen Synthese des Zielproteins. Die exprimierten Proteine können durch Proteasen abgebaut oder in *inclusion bodies* angereichert werden. Bei der Synthese von Redox-Enzymen, wie z. B. der Hydrogenase, müssen außerdem die Kofaktoren der Enzyme synthetisiert und in die Enzyme eingebaut werden. Ohne die Kofaktoren sind die Enzyme nicht funktionell und es wird keine gesteigerte Enzymaktivität erreicht.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen, dass mit der T7 RNA-Polymerase die Transkription der Strukturgene *hupS* und *hupL* um den Faktor 59 (*hupS*) bzw. 81 (*hupL*) im Vergleich zu dem *R. capsulatus* Wildtyp gesteigert werden konnte. Somit konnte maximal eine 59-fache Steigerung der Hydrogenase-Aktivität in dem T7-Expressionsstamm $P_{T7}>hup$ im Vergleich zu dem *R. capsulatus* Wildtypstamm erwartet werden.

Um die funktionelle Expression der Hydrogenase in dem T7-Expressionsstamm $P_{T7}>hup$ zu untersuchen, wurde ein Hydrogenase-Aktivitätstest (2.20) durchgeführt. Dafür wurden der *R. capsulatus* Wildtyp sowie der Stamm $P_{T7}>hup$ unter den in 3.1.2 beschriebenen Bedingungen inkubiert. Durch die Zugabe von 8 mM Fruktose wurde die Expression der Zielgene induziert. Als Kontrolle dienten der T7-Expressionsstamm $P_{T7}>hup$ ohne das T7 RNA-Polymerase-tragende Plasmid pML5-Pfru-T7 und der Stamm *PaphII>hup*. Als Kontrollstamm wurde außerdem die *R. capsulatus* Mutante $\Delta UVSL$ angezogen, die aufgrund von Deletionen in den Genen *hupUV* und *hupSL* weder eine aktive Sensor- noch *uptake*-Hydrogenase synthetisieren kann. Im Gegensatz zu der RT-PCR wurden die Proben für den Hydrogenase-Aktivitätstest (2.20) in der stationären Phase der Kulturen entnommen. Die Aktivität der Hydrogenase in den unterschiedlichen Stämmen wurde am Spectrophotometer indirekt durch die Reduktion des Viologens Benzylviologen bestimmt (2.20). Die für die Reduktion des Benzylviologens benötigten Elektronen stammen aus der Oxidation des Hydrogenase-Substrates H_2 zu $2H^+$ und $2e^-$. Die Reduktion von Benzylviologen führt zu einem Farbumschlag, der photometrisch messbar ist.

Abbildung 3.7 fasst die Ergebnisse des Hydrogenase-Aktivitätstests zusammen. Zur Bestimmung der Spezifität des Enzymtests wurde als Negativkontrolle der Stamm *R. capsulatus* $\Delta UVSL$ verwendet, der weder eine aktive *uptake*-Hydrogenase noch die Sensor-

Hydrogenase HupUV synthetisiert. Wie erwartet, wurde keine Hydrogenase-Aktivität nachgewiesen. Als eine weitere Negativkontrolle zur Bestimmung der Spezifität der Viologen-Reduktion wurde der T7-Expressionsstamm $P_{T7}>hup$, zu dem kein Wasserstoff als Substrat zugegeben wurde, genutzt. Auch mit dieser Kontrolle konnte keine Hydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.7).

In dem *R. capsulatus* Wildtyp wurde eine Hydrogenase-Aktivität von 23 mUnits/min detektiert. Trotz einer deutlich geringeren Transkription des *hup*-Klusters, wiesen die HupV-Mutanten *PaphII*>*hup* und $P_{T7}>hup$ im Verhältnis zu dem *R. capsulatus* Wildtyp eine vergleichbare Aktivität der Hydrogenase auf. Es wurden Hydrogenase-Aktivitäten von 22 mUnits/min (*PaphII*>*hup*) bzw. 21 mUnits/min ($P_{T7}>hup$) gemessen.

In den Stamm $P_{T7}>hup$ mit dem T7 RNA-Polymerase-Gen tragenden Plasmid pML5-*Pfru*-T7 wurde eine Hydrogenase-Aktivität von 34 mUnits/min nachgewiesen. Das entspricht einer Steigerung der Hydrogenase-Aktivität im Vergleich zu dem *R. capsulatus* Wildtyp um den Faktor 1,47. Im Vergleich zu der erwarteten Steigerung der Hydrogenase-Aktivität um den Faktor 59, ist die gemessene Enzymaktivität sehr gering. Dieses Ergebnis resultiert möglicherweise daraus, dass für die erfolgreiche Überexpression eines aktiven Proteins neben der Steigerung der Transkription noch andere Faktoren (z. B. die Synthese und der Einbau der Kofaktoren) in den Prozess der Expression involviert sind.

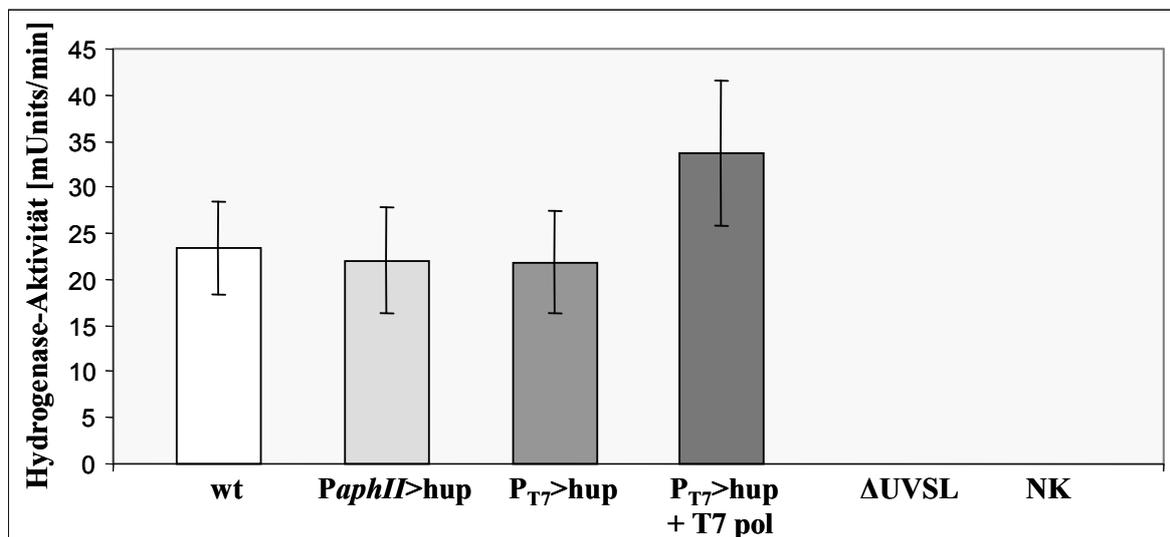


Abb. 3.7: Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität in verschiedenen *R. capsulatus*-Stämmen. Die Hydrogenase-Aktivität folgender Stämme wurde untersucht: *R. capsulatus* Wildtypstamm B10S (wt), *PaphII*>*hup* (B10S *hupV*::*PaphII*), $P_{T7}>hup$ (B10S *hupV*:: $\Omega spcT7$) ohne bzw. mit T7 RNA-Polymerase und die *R. capsulatus*-Mutante $\Delta UVSL$ (B10S *hupU*:: Spc^R , *hupS*:: Gm^R). Als Negativkontrolle (NK) wurde der T7-Expressionsstamm $P_{T7}>hup$ mit T7 RNA-Polymerase verwendet, zu dem nicht das Substrat (H_2) des Hydrogenase-Aktivitätstests zugegeben wurde. Alle Stämme wurden unter Hydrogenase-induzierenden Bedingungen angezogen und die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression der Hydrogenase-Gene durch die Zugabe von 8 mM Fruktose induziert. Die dargestellten Aktivitäten entsprechen Mittelwerten aus drei unabhängigen Messungen.

Im Vergleich zu dem *R. capsulatus* Wildtyp führte die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression der Gene des Hydrogenase-Genclusters in dem Stamm P_{T7}>hup zu einer Steigerung der funktionellen Synthese der Hydrogenase um 47 %.

II. Das IVAC-Expressionssystem

3.2 Konstruktion des „*in vivo auto cloning and expression*“-Systems (IVAC-System)

Basierend auf den Ergebnissen bezüglich der T7 RNA-Polymerase wurde das „*in vivo auto cloning and expression*“-System (IVAC) entwickelt. Das IVAC-Expressionssystem besteht aus zwei Kassetten, der L-IVAC- und der R-IVAC-Kassette. Jede Kassette besteht aus verschiedenen funktionellen Elementen, die in einer genau definierten Anordnung zueinander vorliegen, um die einzelnen Funktionen des IVAC-Systems erfüllen zu können (Abb. 3.8a, 3.9a). Das IVAC-Expressionssystem wurde konstruiert, um folgende Schritte zu ermöglichen: (a) die Markierung jedes beliebigen Genklusters durch homologe Rekombination, (b) den Transfer des markierten Klusters in einen Gram-negativen Bakterienstamm durch Konjugation, (c) die stabile Integration des Klusters in die chromosomale DNA des heterologen Expressionswirtes durch Transposition und (d) die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression aller Gene des markierten Genklusters.

Aufgrund des komplexen Aufbaus der L-IVAC- und R-IVAC-Kassetten war eine spezielle Klonierungsstrategie zu ihrer Konstruktion notwendig. Die einzelnen Bestandteile der Kassetten wurden entweder durch eine PCR amplifiziert oder lagen als synthetisches Oligonukleotid vor und wurden durch die kompatiblen Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Bgl*II oder *Bcl*II flankiert. Durch eine gezielte Kombination dieser kompatiblen Schnittstellen konnten die einzelnen Komponenten der IVAC-Kassetten sukzessive in einem Vektor zusammengeführt werden. Die verwendeten Klonierungsstrategien zur Konstruktion beider Kassetten sind detailliert in Abbildung 3.8b und 3.9b dargestellt. Im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit (Markert, 2005) konnten die beiden IVAC-Kassetten erfolgreich hergestellt und die Funktionen einzelner Komponenten, z. B. der Resistenzgene und des *origin of transfer*, überprüft werden. Die konstruierten Vektoren, in denen die vollständigen IVAC-Kassetten vorliegen, werden im Folgenden als pL-IVAC3 bzw. pR-IVAC3 bezeichnet.

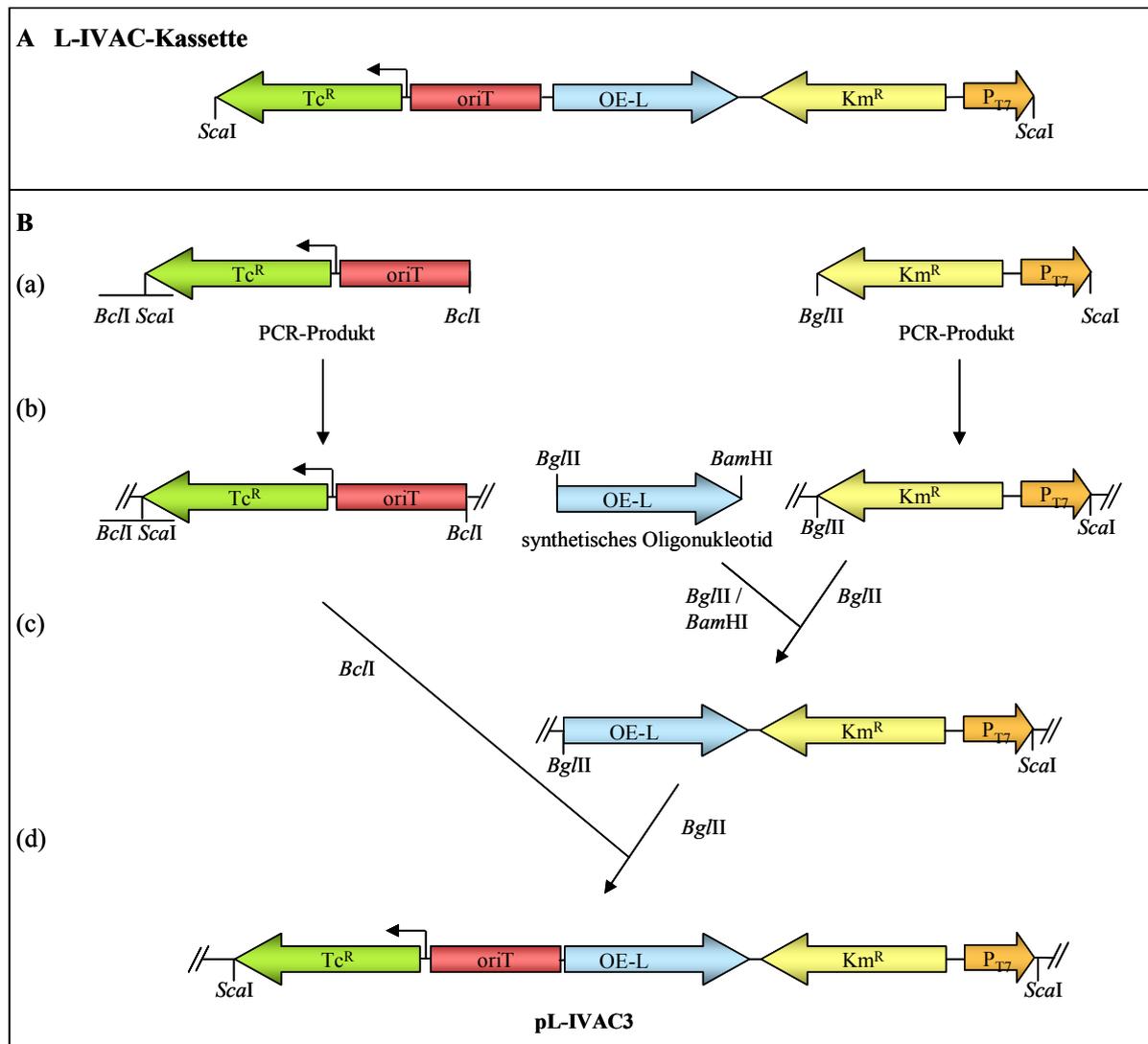


Abb. 3.8: (A) Schematischer Aufbau der L-IVAC-Kassette. Die L-IVAC-Kassette enthält einen Selektionsmarker (Tc^R), ein Reportergen (Km^R), einen T7 RNA-Polymerase-abhängigen Promotor und Transpositions-Elemente (OE-L). Ein zusätzlicher Bestandteil der L-IVAC-Kassette ist der *origin of transfer* (oriT). Die IVAC-Kassette wird durch die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *ScaI* flankiert. Die großen Pfeile symbolisieren die Gene, aus denen die IVAC-Kassette zusammengesetzt ist; die kleinen Pfeile stellen Promotoren dar. (B) Schematische Darstellung der Konstruktion der L-IVAC-Kassette. (a) Durch eine PCR wurden die Gene, die für die Antibiotikaresistenzen und den oriT kodieren, amplifiziert und (b) in die Vektoren pUC18 bzw. pSVB10 kloniert. (c) Das Oligonukleotid, das die spezifische Erkennungssequenz OE-L für die Transposase enthält, wurde in das rekombinante Plasmid mit der Kanamycinresistenz und dem T7 RNA-Polymerase-abhängigen Promotor kloniert. (d) Die L-IVAC-Kassette wurde durch die Insertion des Tetracyclinresistenzgens und des oriT vervollständigt. Der Vektor mit der vollständigen L-IVAC-Kassette wurde als pL-IVAC3 bezeichnet.

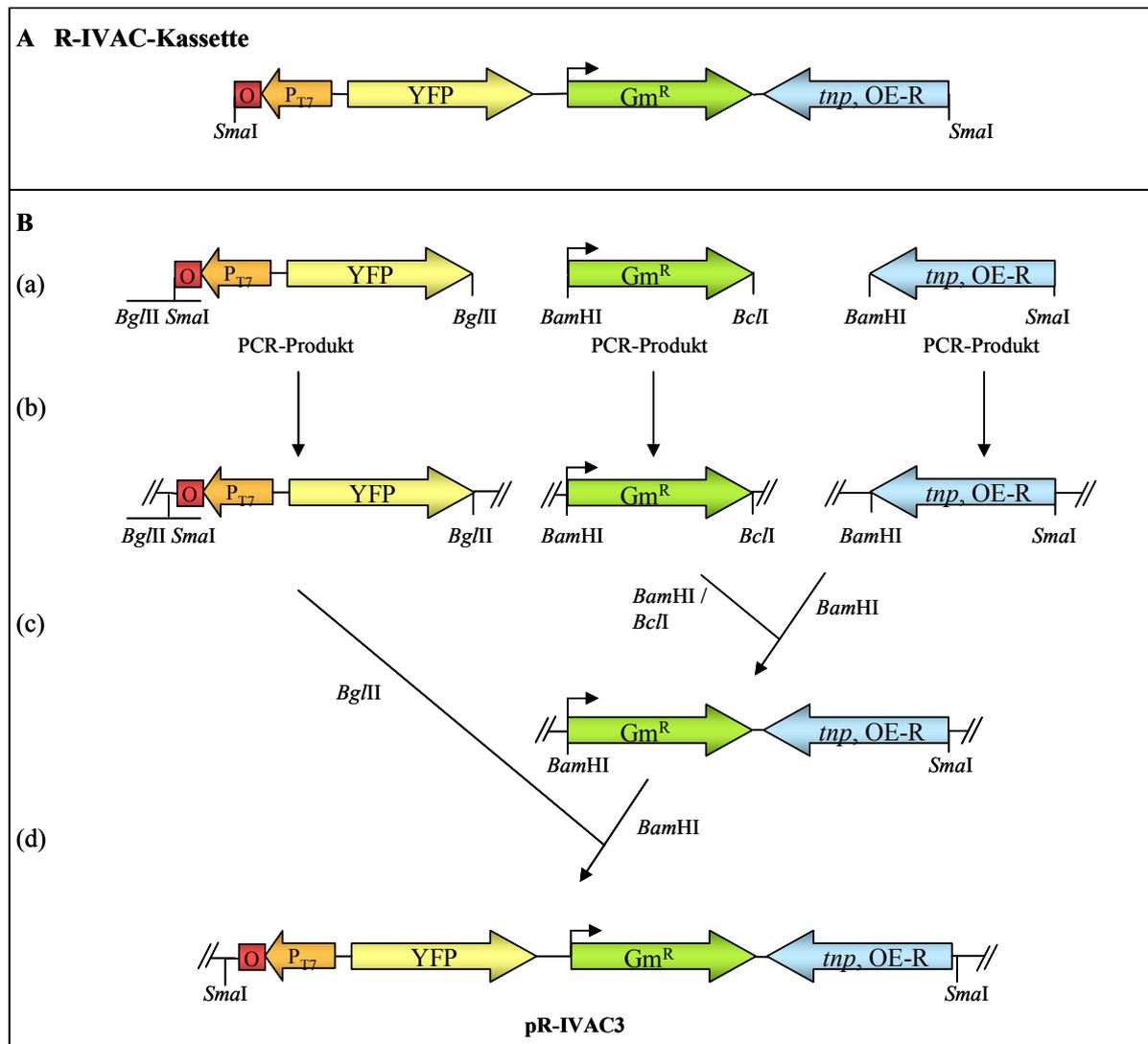


Abb. 3.9: (A) Schematischer Aufbau der R-IVAC-Kassette. Die R-IVAC-Kassette enthält einen Selektionsmarker (Gm^R), ein Reportergen (YFP), einen T7 RNA-Polymerase-abhängigen Promotor und Transpositions-Elemente (*tnp*, OE-R). Der T7-Promotor der R-IVAC-Kassette wird durch einen *lac*-Operator kontrolliert. Die R-IVAC-Kassette wird durch die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *Sma*I flankiert. Die großen Pfeile stellen die Gene, aus denen die IVAC-Kassette zusammengesetzt ist, die kleinen Pfeile die Promotoren dar. (B) Schematische Darstellung der Konstruktion der R-IVAC-Kassette. (a) Die einzelnen Bestandteile der R-IVAC-Kassette wurden durch PCR amplifiziert und (b) in die Vektoren pUC18 bzw. pSVB10 kloniert. (c) Durch Hydrolyse mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Bcl*I bzw. *Bgl*II wurden zwei Komponenten der R-IVAC-Kassette wieder aus den Vektoren isoliert und (d) sukzessive in einem Vektor zu der vollständigen R-IVAC-Kassette vereinigt. Der konstruierte Vektor wurde im Folgenden als pR-IVAC3 bezeichnet.

Um die IVAC-Kassetten in den Vektor, der die zu exprimierenden Gene trägt, zu integrieren, wurde der Mechanismus der homologen Rekombination gewählt. Die gezielte Klonierung der IVAC-Kassetten in einen Expressionsvektor durch Restriktion und Ligation ist prinzipiell auch möglich, aber nur dann, wenn sich die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen nicht in dem zu markierenden Gencluster wiederholen. Zur Vereinfachung der gezielten Integration der IVAC-Kassetten in einen Expressionsvektor durch Restriktion und Ligation wurden die IVAC-Kassetten nach ihrer Konstruktion zusammen in einem Vektor integriert. Durch Hydrolyse mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen *ScaI* (L-IVAC) bzw. *SmaI* (R-IVAC) wurden die IVAC-Kassetten aus den Vektoren pL-IVAC3 und pR-IVAC3 wieder isoliert und sukzessive in den Vektor pIC20H kloniert (s. Anhang, Abb. 8.1). Der konstruierte Vektor, in dem beide IVAC-Kassetten zusammen vorlagen, wurde als pIC20HRL bezeichnet. Die IVAC-Kassetten wurden so in dem Vektor pIC20HRL angeordnet, dass es durch Restriktion des Vektors pIC20HRL mit dem Enzym *XbaI* nun möglich war, in einem Klonierungsschritt beide IVAC-Kassetten zusammenhängend aus dem Vektor pIC20HRL zu isolieren und durch Ligation in ein anderes Plasmid zu transferieren (s. Anhang, Abb. 8.1).

3.3 Analyse der T7 RNA-Polymerase-abhängigen Transkription von Genen mit dem IVAC-Expressionssystem

Die IVAC-vermittelte Expression von Genen in einem heterologen Bakterienstamm soll mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase erfolgen. Dafür ist in beiden IVAC-Kassetten je ein T7-Promotor lokalisiert (Abb. 3.8a, 3.9a). Die IVAC-Kassetten sollen im Folgenden so zu dem zu exprimierenden Gencluster angeordnet werden, dass die T7-Promotoren gegensätzlich orientiert sind und die Expression aller Gene eines Klusters, unabhängig von ihrer Anzahl und Transkriptionsrichtung, erlauben.

3.3.1 Überprüfung der Funktionalität der in den IVAC-Kassetten lokalisierten T7-Promotoren

Im Gegensatz zu dem T7-Promotor der L-IVAC-Kassette wird der T7-Promotor der R-IVAC-Kassette durch einen *lac*-Operator kontrolliert (Abb. 3.9a). Aufgrund des zusätzlichen *lac*-Operators in der R-IVAC-Kassette bestand die Möglichkeit, dass ausgehend von diesem T7-Promotor weniger Transkript gebildet wird als vom T7-Promotor der L-IVAC-Kassette aus.

Die Analyse, ob der *lac*-Operator in der R-IVAC-Kassette einen Einfluss auf die Promotorstärke des T7-Promotors hat, wurde mit einer GFP-Fusion durchgeführt. Dafür wurden die einzelnen Kassetten durch Hydrolyse mit *ScaI* (L-IVAC) bzw. *SmaI* (R-IVAC) aus den Vektoren pL-IVAC3 und pR-IVAC3 isoliert und jeweils in den Vektor pSWGFP, der das promotorlose Gen *gfp* enthält, kloniert. Die konstruierten Expressionsplasmide werden im Folgenden als pL>GFP und pR>GFP bezeichnet (Abb. 3.10; s. Anhang, Abb. 8.2, 8.3).

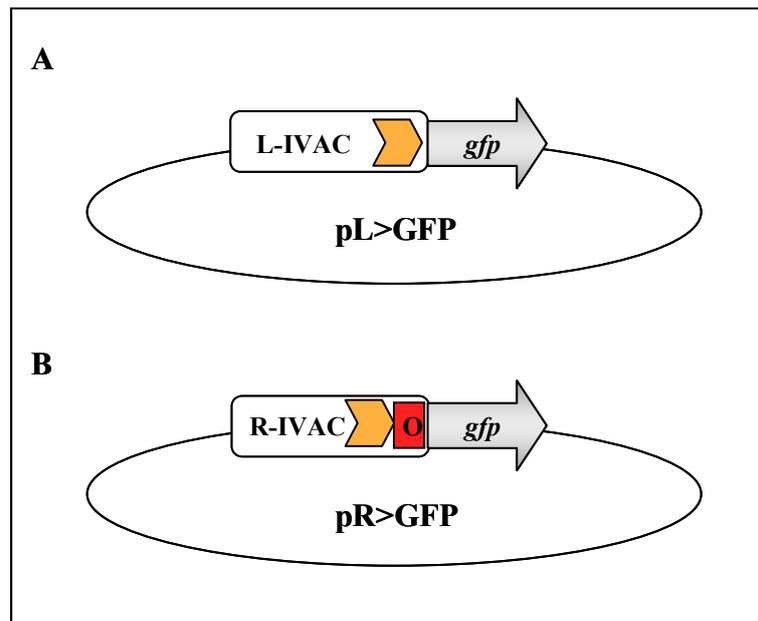


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Vektoren pL>GFP und pR>GFP. (a) Die L-IVAC-Kassette wurde durch Restriktion mit *ScaI* aus dem Vektor pL-IVAC3 isoliert und in den Vektor pSWGFP, in dem das promotorlose Gen *gfp* lokalisiert ist, kloniert. (b) In der R-IVAC-Kassette wird der T7 RNA-Polymerase-abhängige Promotor durch einen *lac*-Operator (rotes Viereck) kontrolliert. Die R-IVAC-Kassette wurde durch Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* aus dem Vektor pR-IVAC3 isoliert und in den Vektor pSWGFP integriert. Sowohl das Gen *gfp* als auch die IVAC-Kassetten sind schematisch dargestellt. Die orangefarbenen Pfeile stellen die T7-Promotoren dar.

Der *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3), der die T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors *lacUV5* exprimiert, wurde mit den erzeugten Plasmiden transformiert (2.13), bis zur frühlogarithmischen Wachstumsphase angezogen und die T7-RNA-Polymerase-abhängige Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Als Kontrolle dienten identische Kulturen, bei denen die Expression des Gens *gfp* nicht induziert wurde. Die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression des Reportergens *gfp* wurde mittels RT-PCR (2.11) und GFP-Fluoreszenzmessungen (2.18) analysiert.

Wenn die Promotorstärke des T7-Promotors in der R-IVAC-Kassette aufgrund des *lac*-Operators reduziert ist, wird weniger Transkript von *gfp* in diesem *E. coli*-Stamm gebildet als in dem *E. coli*-Stamm mit dem Plasmid pL>GFP. Die unterschiedlichen Transkriptkonzentrationen von *gfp* können mit einer RT-PCR detektiert werden. Die Proben für die RT-

PCR wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase entnommen und die mRNA der einzelnen Proben wurde isoliert (2.11.1). In der nachfolgenden reversen Transkription (2.11.2) wurden jeweils 500 ng RNA als *template* für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde dann als *template* in der RT-PCR (2.11.3) verwendet. Die Ergebnisse der RT-PCR (2.11) sind in Abb. 3.11 dargestellt und können wie folgt zusammengefasst werden: (a) unter induzierten Bedingungen führte die Anwesenheit des T7-Promotors unabhängig von der verwendeten IVAC-Kassette zu einer signifikanten Erhöhung der Expression des Gens *gfp* und (b) das Gen *gfp* wurde ausgehend von den T7-Promotoren beider IVAC-Kassetten verhältnismäßig gleich stark transkribiert. Es wurden RNA-Konzentrationen von 0,77 ng (pL>GFP) bzw. 0,61 ng (pR>GFP) detektiert.

Anschließend wurde in den Proteinextrakten der entsprechenden Expressionsstämmen die GFP-spezifische Fluoreszenz quantifiziert (2.18). Dazu wurden die *E. coli* Expressionsstämme BL21(DE3), die mit den Plasmiden pL>GFP und pR>GFP transformiert worden waren, unter induzierten bzw. uninduzierten Bedingungen kultiviert. Die Ergebnisse dieser Fluoreszenzmessungen sind in der Abbildung 3.12 dargestellt. Wie erwartet, konnte in den *E. coli*-Stämmen, die das Plasmid pL>GFP oder pR>GFP trugen, nur nach Induktion der *gfp*-Expression mit IPTG eine spezifische Fluoreszenz bei der Wellenlänge von 509 nm nachgewiesen werden. In Abwesenheit des Induktors war kaum GFP-Fluoreszenz detektierbar. Die gemessenen relativen Fluoreszenzen von 244 (pL>GFP) bzw. 288 (pR>GFP) der verschiedenen Expressionsstämme wichen dabei nicht entscheidend voneinander ab.

Die Ergebnisse der RT-PCR und der Fluoreszenzmessungen belegen somit, dass (a) die T7 RNA-Polymerase-abhängigen Promotoren der IVAC-Kassetten induzierbar und somit funktionell sind und (b) der *lac*-Operator keinen Einfluss auf die Promotorstärke des T7-Promotors in der R-IVAC-Kassette hat. Es konnte mit beiden IVAC-Kassetten sowohl verhältnismäßig gleich viel Transkript von dem Gen *gfp* als auch verhältnismäßig gleiche spezifische Fluoreszenz des Proteins GFP nachgewiesen werden.

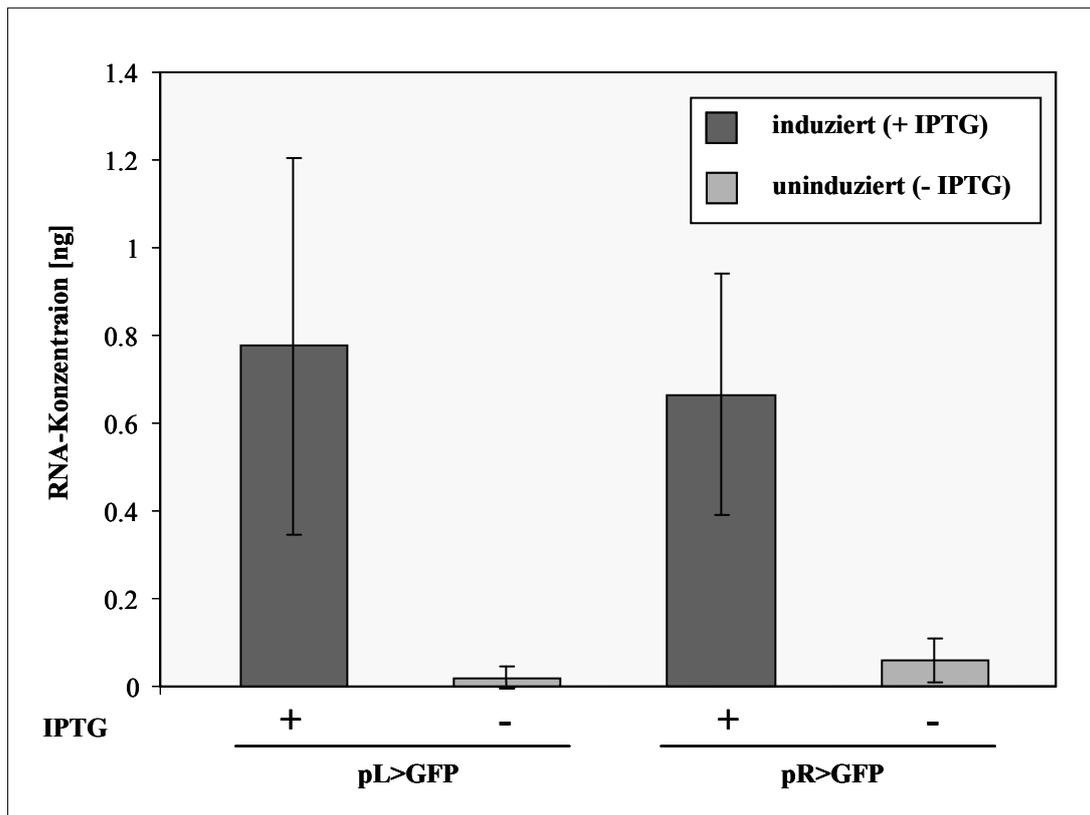


Abb. 3.11: Untersuchung der Transkription des Gens *gfp* in verschiedenen *E. coli* BL21(DE3)-Stämmen. Die Expression des Reportergens *gfp* wurde in den *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen, die mit den Plasmiden pL>GFP bzw. pR>GFP transformiert worden waren, bestimmt. Durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG (+ IPTG) wurde die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression von *gfp* induziert. Als Negativkontrolle wurden die Stämme ohne IPTG kultiviert (- IPTG). Die Proben für die RT-PCR wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Kulturen ($O.D._{580} = 1$) entnommen und die mRNA der verschiedenen Stämme wurde isoliert. Jeweils 500 ng der isolierten RNA wurde in der darauffolgenden reversen Transkription als *template* eingesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

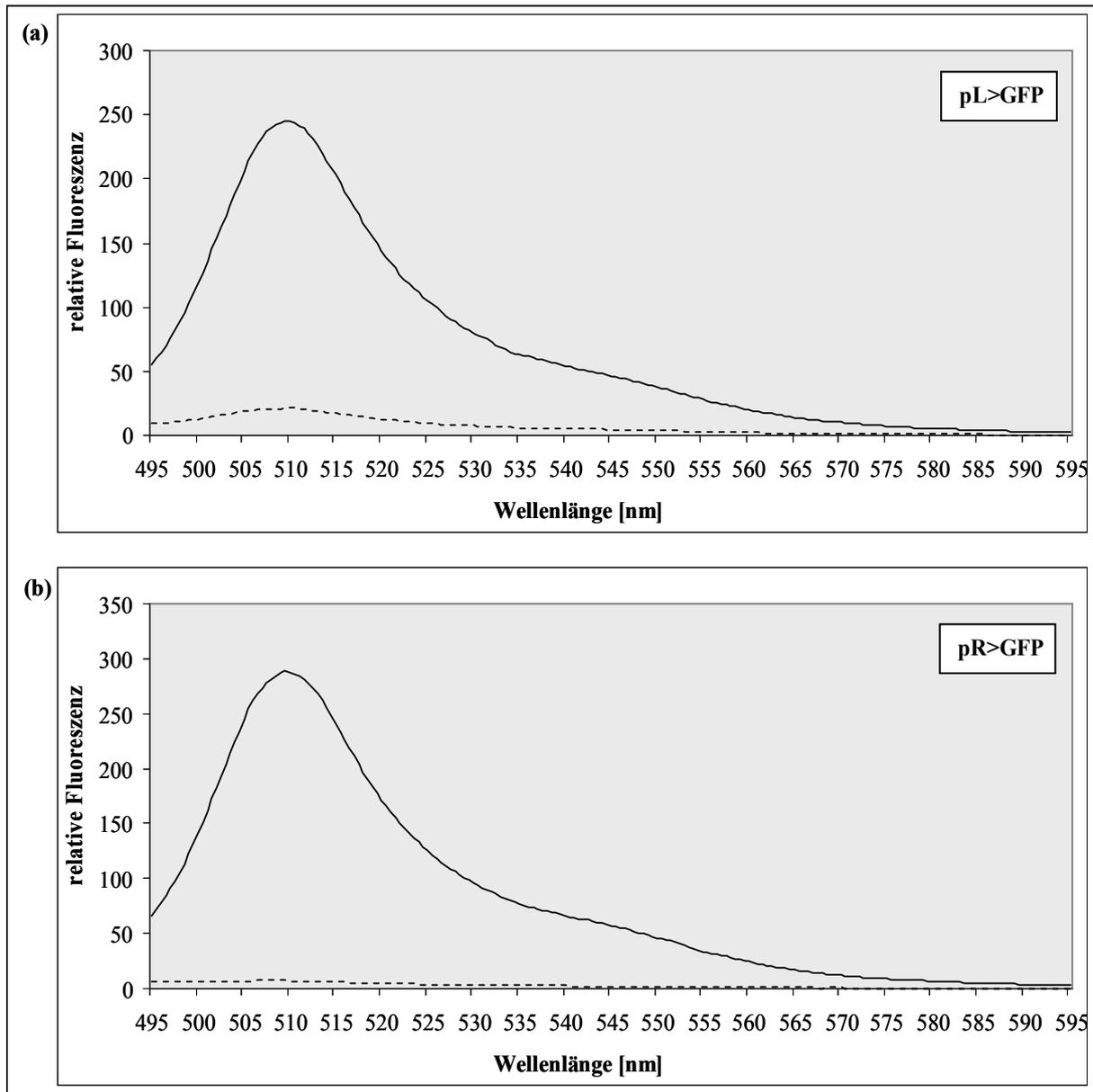


Abb. 3.12: Bestimmung der T7 RNA-Polymerase-abhängigen funktionellen Synthese von GFP in *E. coli* BL21(DE3). Die Fluoreszenz von GFP wurde in den *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen bestimmt, die (a) mit dem Plasmid pL>GFP bzw. (b) mit Plasmid dem pR>GFP transformiert worden waren und unter induzierten Bedingungen (durchgezogene Linie) bzw. uninduzierten Bedingungen (gestrichelte Linie) angezogen wurden. Die Kulturen wurden μ N bei 37°C inkubiert. Für die Messung der Fluoreszenz wurden die Testkulturen auf eine identische O.D.₅₈₀ = 1 eingestellt. Die Anregung der Fluoreszenz von GFP erfolgte bei 488 nm. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt. Die Standardabweichung der Messungen lag unter 10 %.

Mit dem Reportergen *gfp* als Beispiel konnte gezeigt werden, dass die T7-Promotoren beider IVAC-Kassetten funktionell sind und eine T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression mit den konstruierten IVAC-Kassetten möglich ist. Der *lac*-Operator in der R-IVAC-Kassette hat dabei keinen Einfluss auf die Promotorstärke des T7-Promotors.

3.3.2 Einfluss der gegensätzlich angeordneten T7-Promotoren auf die Expression eines Zielgens

Die Funktionalität der einzelnen T7 RNA-Polymerase-abhängigen Promotoren, die in der L-IVAC- bzw. R-IVAC-Kassette lokalisiert sind, konnte erfolgreich nachgewiesen werden (3.3.1). Da Gene eines Genklusters häufig nicht in einer Orientierung vorliegen, werden die T7-Promotoren der IVAC-Kassetten zueinander gegensätzlich angeordnet, um so die vollständige Transkription aller Gene eines Klusters, unabhängig von ihrer Transkriptionsrichtung, zu gewährleisten. Durch die entgegengesetzte Anordnung der T7-Promotoren bestanden die Möglichkeiten, dass (a) durch eine wechselseitige Behinderung der Polymerasen die Transkription der zwischenliegenden Gene vorzeitig beendet wird (Abb. 3.13a) oder (b) die zueinander komplementären RNA-Moleküle hybridisieren und so die Translation der Zielgene verhindern (Abb. 3.13b). Im Folgenden wurde untersucht, ob mit den gegenläufig transkribierenden T7 RNA-Polymerasen des IVAC-Expressionssystems die Überexpression von Genen möglich wird.

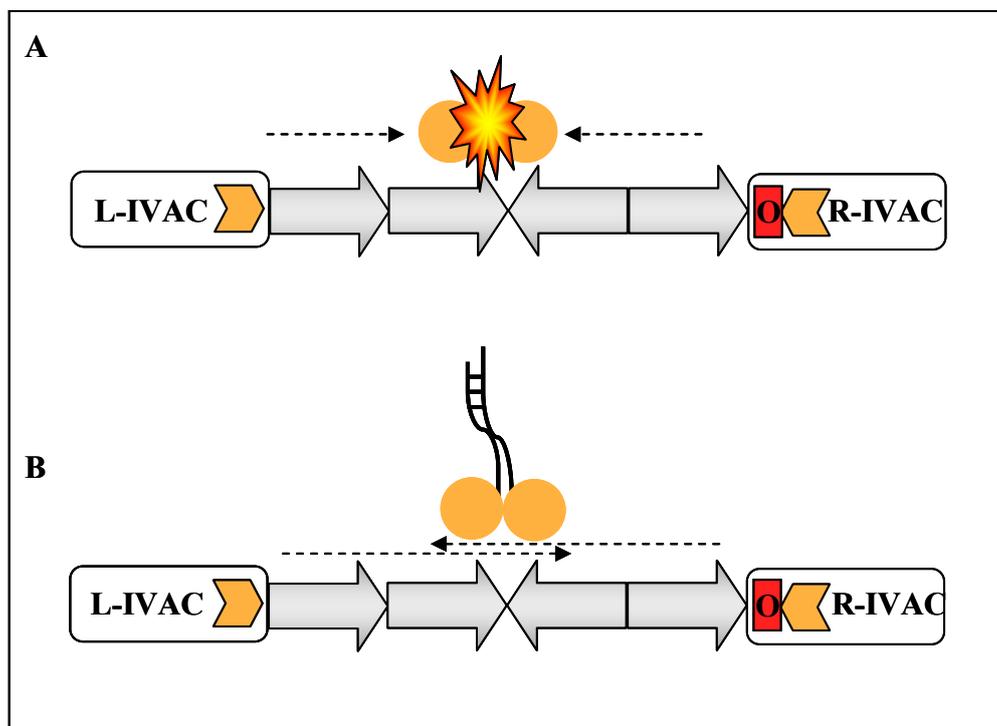


Abb. 3.13: Schematische Darstellung der möglichen limitierenden Faktoren der IVAC-vermittelten Expression von Genen. Die einzelnen Gene eines Genklusters (graue Pfeile) und die IVAC-Kassetten (weiße Vierecke) sind schematisch dargestellt. Die Kreise (orange) symbolisieren die T7 RNA-Polymerasen, die Pfeile (orange) die T7-Promotoren. (A) Durch eine gegenseitige Behinderung der Polymerasen kann die Transkription der Gene vorzeitig abgebrochen werden. (B) Die Hybridisierung von Transkript und Antisense-RNA könnte zu einer Inhibierung der Translation führen.

Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurden die IVAC-Kassetten zunächst durch Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I zusammenhängend aus dem Vektor pIC20HRL isoliert und dann in zwei verschiedenen Orientierungen in den Vektor pSWGFP, der das promotorlose Gen *gfp* enthält, kloniert (Abb. 3.14; s. Anhang, Abb. 8.4). In der Orientierung I sind die IVAC-Kassetten so angeordnet, dass die T7 RNA-Polymerase vom T7-Promotor der L-IVAC-Kassette aus das Gen *gfp* transkribiert, während die T7 RNA-Polymerase von der R-IVAC-Kassette aus GFP-Antisense-RNA synthetisiert (Abb. 3.14a). In der Orientierung II sind die IVAC-Kassetten gegensätzlich orientiert und Transkript von *gfp* wird von der R-IVAC-Kassette aus gebildet (Abb. 3.14b). Die konstruierten Plasmide werden im Folgenden als pL>GFP<R (Orientierung I) bzw. pR>GFP<L (Orientierung II) bezeichnet.

Abweichend von der ursprünglichen Idee, dass die IVAC-Kassetten das zu exprimierende Gen direkt flankieren, wurden die IVAC-Kassetten so in den Vektor pSWGFP kloniert, dass zwischen dem T7-Promotor einer IVAC-Kassette und dem Gen *gfp* noch die Vektorsequenz liegt. Diese Anordnung sollte jedoch keinen Einfluss auf die Synthese der Antisense-RNA haben, da bereits in früheren Versuchen gezeigt werden konnte, dass die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht erkennt und die Expression zahlreicher Gene ermöglicht. Es wurde diese alternative Anordnung der IVAC-Kassetten gewählt, da es so möglich wurde, die IVAC-Kassetten zusammen in einem Klonierungsschritt in dem Vektor mit dem *lac*-Operon zu integrieren.

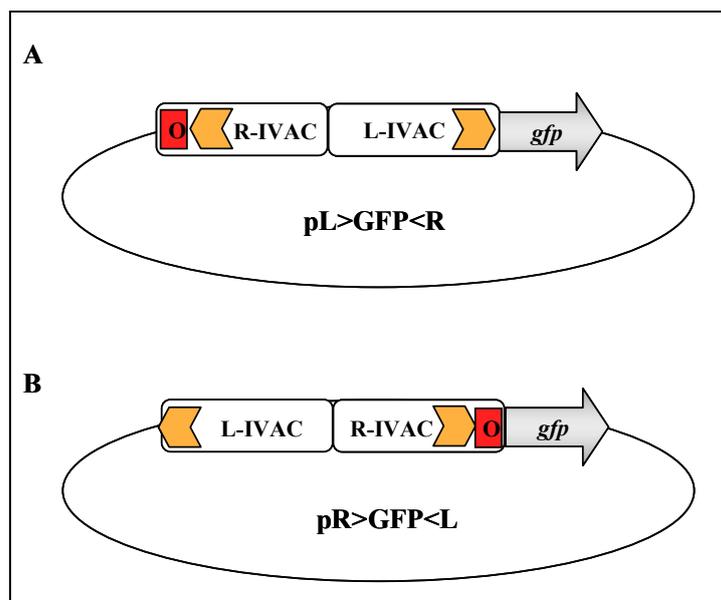


Abb. 3.14: Schematische Darstellung der Vektoren pL>GFP<R und pR>GFP<L. Die IVAC-Kassetten wurden durch Restriktion mit *Xba*I aus dem Vektor pIC20HRL isoliert und in den Vektor pSWGFP, in dem das promotorlose Gen *gfp* lokalisiert ist, kloniert. Abhängig von der Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem Gen *gfp* wurden die Vektoren als pL>GFP<R bzw. pR>GFP<L bezeichnet. Sowohl das Gen *gfp* als auch die IVAC-Kassetten sind schematisch dargestellt. Die Pfeile in orange stellen die T7-Promotoren dar. Der T7-Promotor der R-IVAC-Kassette wird durch einen *lac*-Operator (rotes Viereck) kontrolliert.

Der T7-Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) wurde mit den neu konstruierten Plasmiden transformiert und die Expression von *gfp* wurde mittels RT-PCR (2.11) und Fluoreszenzmessungen (2.18) analysiert. Die erhaltenen *E. coli*-Expressionsstämme wurden in LB-Medium angezogen. Nachdem die Kulturen die frühlogarithmische Wachstumsphase erreicht hatten, wurde die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression von *gfp* durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Als Kontrollen dienten Kulturen, bei denen die Expression des Gens *gfp* nicht durch die Zugabe von IPTG induziert wurde. Um festzustellen, ob die gegenläufigen T7 RNA-Polymerasen zu einer verminderten Expression von *gfp* führen, wurden auch *E. coli*-Kulturen, die mit den Vektoren pL>GFP und pR>GFP transformiert worden waren, auf die Expression von *gfp* getestet (3.3.1). Im Gegensatz zu den Plasmiden pL>GFP<R und pR>GFP<L ist in diesen Kontroll-Plasmiden nur je eine IVAC-Kassette und somit auch nur ein T7 RNA-Polymerase-Promotor lokalisiert. Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase ($O.D._{580} = 1$) wurden die Proben für die RT-PCR entnommen. Die mRNA der einzelnen Kulturen wurde isoliert (2.11.1) und jeweils 500 ng der RNA als *template* in der reversen Transkription (2.11.2) eingesetzt. Die während der reversen Transkription synthetisierte cDNA wurde dann als *template* in der RT-PCR verwendet.

Die Ergebnisse der RT-PCR sind in Abbildung 3.15 dargestellt und können wie folgt zusammengefasst werden: (a) in allen getesteten *E. coli*-Stämmen konnte Transkript von dem Gen *gfp* nachgewiesen werden, (b) die Zugabe von IPTG führte, unabhängig von dem getesteten Stamm, zu einer Erhöhung der Transkription von *gfp* und (c) durch die gegenläufigen T7 RNA-Polymerasen wurde die Transkription von *gfp* reduziert. Im Vergleich zu den *E. coli*-Stämmen, in denen die Plasmide pL>GFP bzw. pR>GFP mit jeweils nur einer IVAC-Kassette vorlagen, wurde die Transkription des Gens *gfp* um 21,0 % (pL>GFP<R) bzw. 92,5 % (pR>GFP<L) reduziert.

Die Ergebnisse der RT-PCR belegen, dass durch die entgegengesetzte Anordnung der T7 RNA-Promotoren eine wechselseitige Behinderung der Polymerasen stattfindet und die Transkription des Gens *gfp* dadurch reduziert wird.

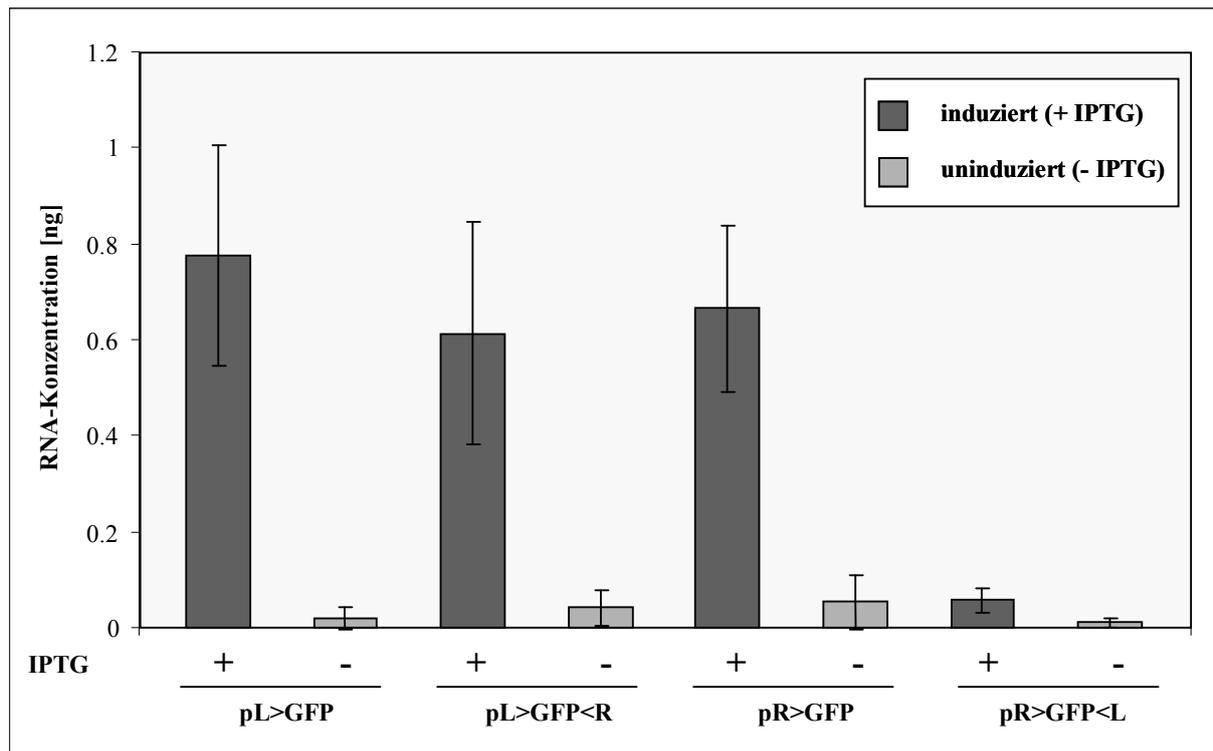


Abb. 3.15: Nachweis der Transkription des Gens *gfp* in verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Die Expression von dem Reportergen *gfp* wurde in den *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen, die mit den Plasmiden pL>GFP, pR>GFP, pL>GFP<R bzw. pR>GFP<L transformiert worden waren, bestimmt. Durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression des Gens *gfp* induziert (+ IPTG). Als Negativkontrolle wurden die Stämme ohne IPTG kultiviert (- IPTG). Die Proben für die RT-PCR wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Kulturen ($O.D._{580} = 1$) entnommen und die mRNA der verschiedenen Stämme wurde isoliert. Jeweils 500 ng der isolierten RNA wurde in der darauffolgenden reversen Transkription als *template* eingesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch die entgegengesetzt transkribierenden T7 RNA-Polymerasen die Transkription des Zielgens reduziert wird, stellte sich die Frage, inwiefern eine mögliche Hybridisierung der zueinander komplementären RNA-Moleküle die funktionelle Expression des Gens *gfp* zusätzlich inhibiert.

Die Analyse der funktionellen Expression des Gens *gfp* in den verschiedenen *E. coli*-Stämmen erfolgte über den Nachweis der spezifischen Fluoreszenz (2.18). Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Nach der Überexpression und Induktion der T7 RNA-Polymerase durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG zeigten die *E. coli*-Stämme, in denen die Plasmide pL>GFP bzw. pR>GFP vorlagen, spezifische Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 509 nm. Bezogen auf eine optische Dichte der Kulturen von 1 wurde eine relative Fluoreszenz von 244 (pL>GFP) bzw. 288 (pR>GFP) nachgewiesen (Abb. 3.16a, b).

Wie anhand der Ergebnisse der RT-PCR erwartet, wurde in den *E. coli*-Stämmen, die mit den Plasmiden pL>GFP<R bzw. pR>GFP<L transformiert worden waren, eine geringere Fluoreszenz gemessen. Im Vergleich zu den *E. coli*-Stämmen, in denen die Plasmide mit nur

einer IVAC-Kassette vorlagen, war die relative Fluoreszenz um 23,0 % (pL>GFP<R) bzw. 91,4 % (pR>GFP<L) reduziert. Da schon die gegenseitige Behinderung der T7 RNA-Polymerasen zu einer Abnahme der Transkription des Gens *gfp* von 21,0 % (pL>GFP<R) bzw. 92,5 % (pR>GFP<L) geführt hatte, konnte mit den Fluoreszenzmessungen gezeigt werden, dass die Translation nicht zusätzlich behindert worden war. Bei einer zusätzlichen Behinderung der Translation durch die Hybridisierung von den RNA-Molekülen wäre eine noch geringere Fluoreszenz (< 21,0 % bzw. < 92,5 %) detektiert worden.

Diese Ergebnisse zeigen somit, dass abhängig von der T7 RNA-Polymerase das zwischen den IVAC-Kassetten liegende Gen erfolgreich exprimiert werden kann. Aufgrund der wechselseitigen Behinderung der T7 RNA-Polymerasen ist die Expression des Gens mit dem IVAC-Expressionssystem im Vergleich zu einer Expression mit nur einem T7-Promotor jedoch reduziert. Eine mögliche Hybridisierung der komplementären RNA-Moleküle hat dagegen keinen Einfluss auf die Synthese des Zielproteins.

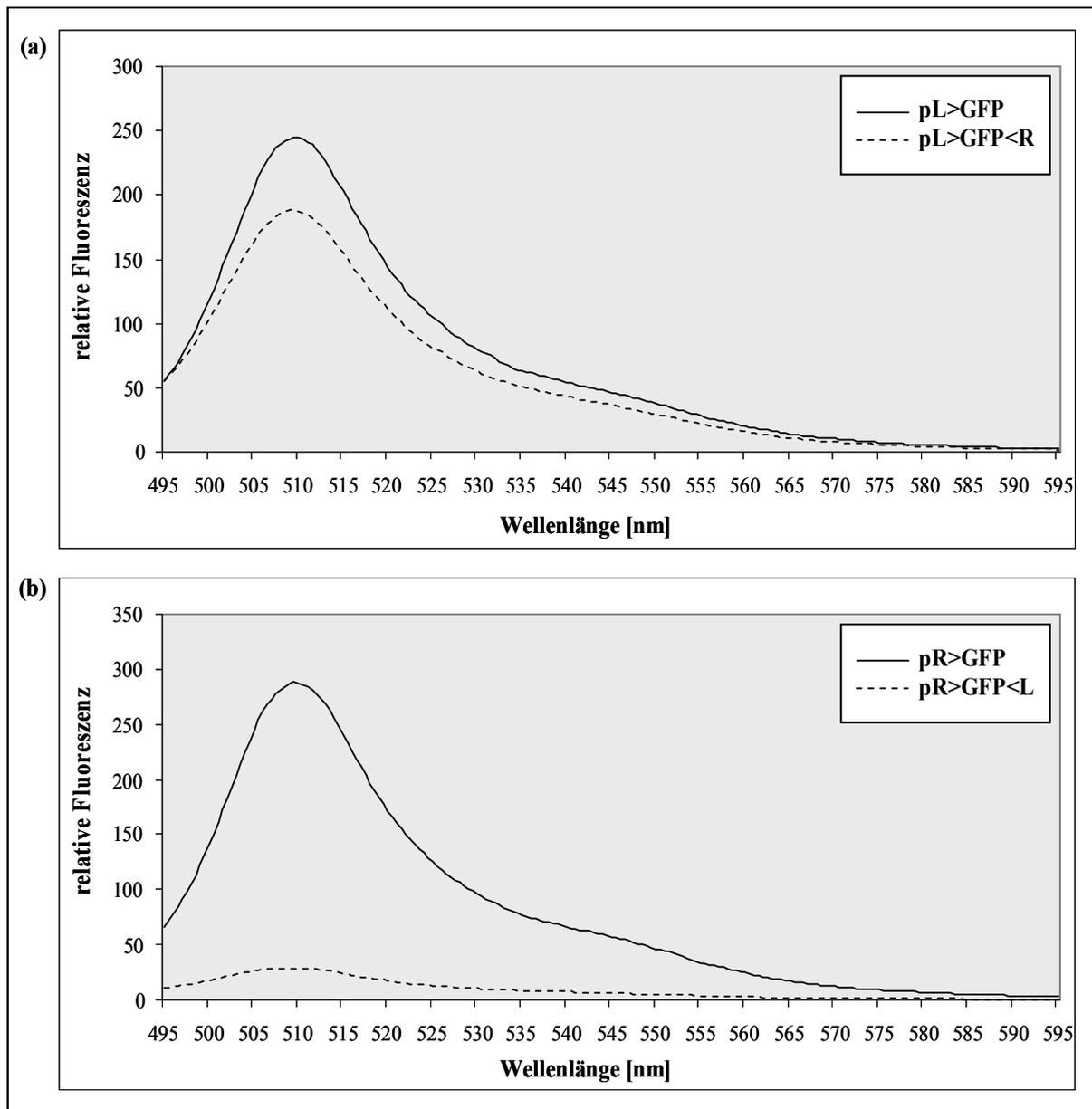


Abb. 3.16: Vergleich der T7 RNA-Polymerase-abhängigen Expression des Gens *gfp* in verschiedenen *E. coli* BL21(DE3)-Stämmen. Die Fluoreszenz von GFP wurde in den *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen verglichen, die (a) mit dem Plasmid pL>GFP bzw. dem Plasmid pL>GFP<R und (b) mit dem Plasmid pR>GFP bzw. dem Plasmid pR>GFP<K transformiert worden waren und unter induzierten Bedingungen (durchgezogene Linie) bzw. uninduzierten Bedingungen (gestrichelte Linie) angezogen wurden. Die Induktion des Gens *gfp* erfolgte durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG. Die Kulturen wurden μ N bei 37°C inkubiert. Für die Messung der Fluoreszenz wurden die Testkulturen auf eine identische O.D.₅₈₀ = 1 eingestellt. Die Anregung der Fluoreszenz von GFP erfolgte bei 488 nm. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt. Die Standardabweichung der Messungen lag unter 10 %.

Die IVAC-Kassetten vermitteln erfolgreich die T7 RNA-Polymerase-abhängige Transkription von Genen. Im Gegensatz zu der Überexpression mit nur einer T7 RNA-Polymerase wird durch die entgegengesetzt verlaufenden Transkriptionsrichtungen der zwei T7 RNA-Polymerasen die Transkription und funktionelle Expression der Zielgene jedoch reduziert.

3.4 Die IVAC-vermittelte Integration und heterologe Expression eines Genklusters in den Bakterienstämmen *Pseudomonas putida* und *Rhodobacter capsulatus* am Beispiel des *lac*-Operons

Bislang konnten die funktionellen Eigenschaften der einzelnen funktionellen Elemente der IVAC-Kassetten erfolgreich nachgewiesen werden. So konnte die Funktionalität der Resistenzgene, des *origin of transfer* und der T7 RNA-Polymerase-Promotoren der IVAC-Kassetten experimentell gezeigt werden. Im Folgenden sollte am Beispiel eines Genklusters untersucht werden, ob es mit dem IVAC-Expressionssystem möglich wird (a) einen Genkluster durch Konjugation in einen heterologen Wirtstamm zu übertragen, (b) alle Gene eines Klusters durch Transposition in das Genom des Wirtes zu transferieren und (c) mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase zu exprimieren. Dazu wurde das *lac*-Operon *lacZYA* aus *E. coli* als Testkluster ausgewählt, das unter der Verwendung des IVAC-Expressionssystems heterolog in *P. putida* und *R. capsulatus* exprimiert werden sollte.

Das *lac*-Operon besteht aus den drei Genen *lacZ*, *lacY* und *lacA*. Das Gen *lacZ* kodiert für die β -Galaktosidase, die Lactose in Glucose und Galaktose spaltet. Das zweite Gen, *lacY*, kodiert für eine Permease, die Lactose in die Zelle transportiert. Das Genprodukt von *lacA* ist eine Transacetylase, deren Bedeutung im Lactosestoffwechsel noch unklar ist. Alle Gene liegen in der gleichen Orientierung in dem *lac*-Operon vor, das eine Gesamtlänge von 6,7 kb umfasst. Das *lac*-Operon eignet sich als Beispiel für das IVAC-Expressionssystem, da der Cluster aufgrund der geringen Anzahl von Genen molekulargenetisch einfach zu handhaben ist, die Gene des Operons komplett sequenziert sind und ein Aktivitätstest für die β -Galaktosidase etabliert ist.

Für die IVAC-abhängige Expression der Gene des *lac*-Operons wurde zunächst durch die Hydrolyse des Vektors pFS2I mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Mun*I das *lac*-Operon aus dem Vektor pFS2I isoliert und in den Vektor pASK-IBA3, der nach der Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Bam*HI linearisiert vorlag, kloniert (s. Anhang, Abb. 8.5). Der konstruierte Vektor wurde als pASK-*lac* bezeichnet. Die IVAC-Kassetten wurden durch Hydrolyse mit *Xba*I aus dem Vektor pIC20HRL zusammenhängend isoliert und in zwei unterschiedlichen Orientierungen in den erzeugten Vektor pASK-*lac* mit *lac*-Operon transferiert. So wurden zwei Plasmide konstruiert, die sowohl das *lac*-Operon als auch die IVAC-Kassetten enthalten. Abhängig von der Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem *lac*-Operon wurden die konstruierten Plasmide als pL>*lacZYA*<R bzw. pR>*lacZYA*<L bezeichnet (Abb. 3.17; s. Anhang, Abb. 8.6). In dem Plasmid pL>*lacZYA*<R sind die IVAC-

Kassetten so angeordnet, dass die T7 RNA-Polymerase von der L-IVAC-Kassette aus das *lac*-Operon transkribiert, in dem Plasmid pR>lacZYA<L transkribiert die T7 RNA-Polymerase das *lac*-Operon ausgehend vom T7-Promotor der R-IVAC-Kassette.

Wie bereits in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, wurden auch bei der Konstruktion der Plasmide pL>lacZYA<R und pR>lacZYA<L die IVAC-Kassetten zusammenhängend in einem Klonierungsschritt in das Expressionsplasmid übertragen. Aufgrund der Klonierungsstrategie wurden die IVAC-Kassetten so in dem Vektor integriert, dass die T7 RNA-Polymerase, die das *lac*-Operon transkribiert, erst die komplette Vektorsequenz transkribieren muss, bevor sie die *lac*-Gene erreicht. Wie bereits in früheren Untersuchungen zur T7 RNA-Polymerase gezeigt werden konnte, ist die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression von Genen jedoch unabhängig von der Anzahl der Gene und von Transkriptionsterminatoren (3.1). Darum sollte auch mit dieser Anordnung die vollständige Expression der Gene des *lac*-Operons erreicht werden.

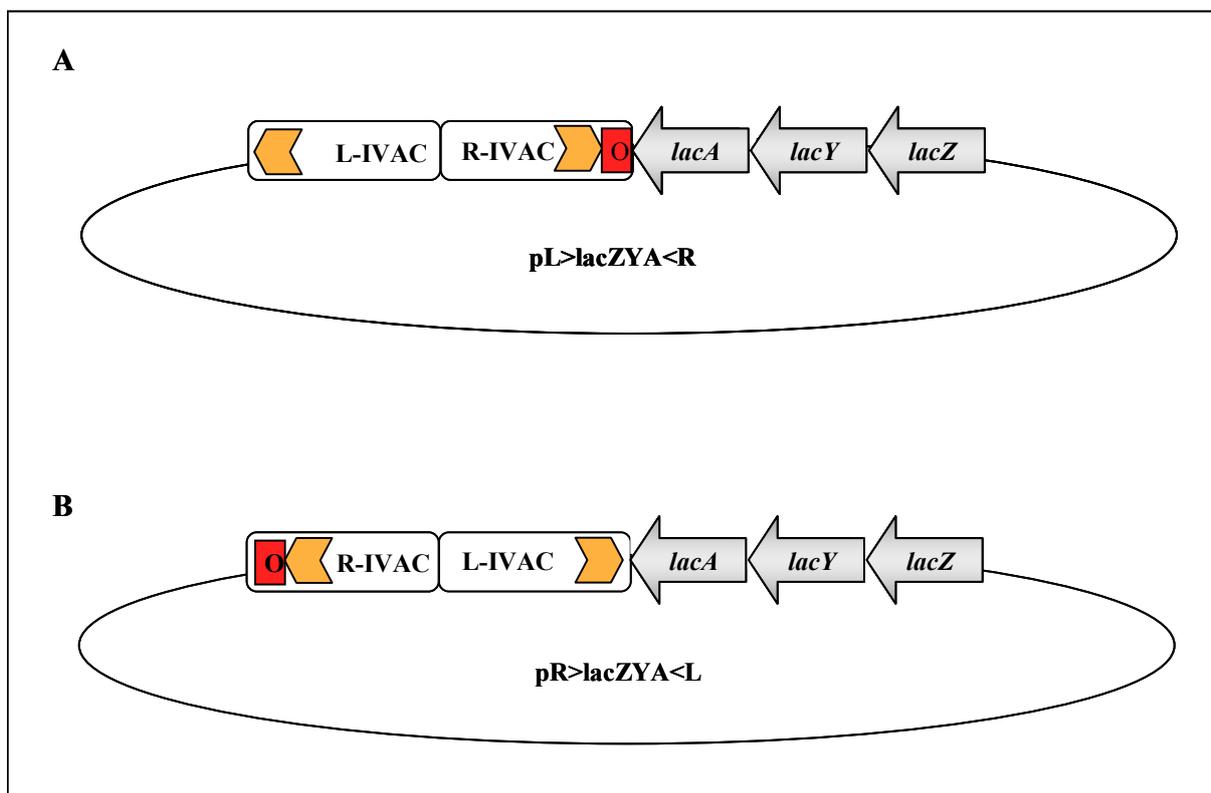


Abb. 3.17: Schematische Darstellung der Vektoren pL>lacZYA<R und pR>lacZYA<L. Die IVAC-Kassetten wurden durch Restriktion mit *Xba*I aus dem Vektor pIC20HRL isoliert und in den Vektor pASK-lac, in dem das *lac*-Operon lokalisiert ist, kloniert. Abhängig von der Orientierung der IVAC-Kassetten zu den Genen des *lac*-Operons wurden die Vektoren als pL>lacZYA<R bzw. pR>lacZYA<L bezeichnet. Sowohl das *lac*-Operon als auch die IVAC-Kassetten sind schematisch dargestellt. Die orangefarbenen Pfeile stellen die T7-Promotoren dar. Der T7-Promotor der R-IVAC-Kassette wird zusätzlich durch einen *lac*-Operator (rotes Viereck) kontrolliert.

3.4.1 Nachweis der IVAC-vermittelten Übertragung und Transposition des *lac*-Operons in die heterologen Wirtsstämme *P. putida* und *R. capsulatus*

In den IVAC-Kassetten sind sowohl ein *oriT* als auch Tn5-Transpositionselemente lokalisiert. Durch die Markierung eines Genclusters mit den IVAC-Kassetten entsteht somit ein artifizielles Tn5-Transposon. Im Gegensatz zu dem natürlichen Transposon Tn5, das die Übertragung von drei Antibiotikaresistenz-Genen vermittelt und eine Größe von 5,7 kb besitzt, sollen mit Hilfe der IVAC-Kassetten weitaus größere Gencluster übertragen werden. Zur Überprüfung, ob der Transfer und die stabile Etablierung eines Genclusters mittels Konjugation und Transposition in einen bakteriellen Wirt unter Verwendung des IVAC-Expressionssystems möglich wird, wurden zunächst die Plasmide pL>lacZYA<R bzw. pR>lacZYA<L durch Transformation jeweils in den Donorstamm *E. coli* S17-1 übertragen. Als Rezipienten dienten die heterologen Wirtsstämme *P. putida* und *R. capsulatus*. Konjugation und Transposition (2.14) der Plasmide pL>lacZYA<R und pR>lacZYA<L wurden durch Selektion auf das Antibiotikum Gentamycin nachgewiesen und die Transpositionsraten bestimmt. Im Gegensatz zu der Transpositionsrate des natürlichen Transposons Tn5 ($6,5 \times 10^{-5}$; Naumann & Reznikoff, 2002) wichen die Transpositionsraten der IVAC-vermittelten Konjugation und Transposition nicht deutlich ab. Bei dem heterologen Wirt *R. capsulatus* wurde eine Transpositionsrate von $1,6 \times 10^{-6}$ ($\pm 0,4 \times 10^{-6}$), bei *P. putida* von $6,5 \times 10^{-5}$ ($\pm 2,6 \times 10^{-5}$) ermittelt. Der Vergleich mit dem natürlichen Transposon Tn5 zeigt, dass sich die rekombinanten IVAC-Transposons problemlos auf die ausgewählten Wirtsstämme übertragen und in ihre Chromosomen integrieren ließen. Die konstruierten Stämme werden im Folgenden als *P. putida*::L>lac<R und *P. putida*::R>lac<L bzw. *R. capsulatus*::L>lac<R und *R. capsulatus*::R>lac<L bezeichnet.

Am Beispiel des *lac*-Operons konnte gezeigt werden, dass das IVAC-System erfolgreich die stabile Integration von Genen in die chromosomale DNA eines heterologen Bakterienstammes durch Konjugation sowie nachfolgender Transposition vermittelt. Die Transpositionsraten unterscheiden sich dabei nicht deutlich von den Transpositionsraten des natürlichen Transposons Tn5.

3.4.2 Analyse der T7 RNA-Polymerase-abhängigen Expression des *lac*-Operons mit dem IVAC-System

Nach der erfolgreichen Übertragung des von den IVAC-Kassetten flankierten Genclusters *lacZYA* in die heterologen Bakterienstämme *P. putida* und *R. capsulatus* durch Konjugation und der stabilen Integration des Klusters in die chromosomale DNA der heterologen Wirte durch Transposition sollten alle Gene des Klusters abhängig von der T7 RNA-Polymerase transkribiert werden. Um die Expression aller Gene des Klusters, unabhängig von ihrer Orientierung zu erreichen, ist in beiden IVAC-Kassetten je ein T7 RNA-Polymerase-abhängiger Promoter integriert. Es konnte bereits am Beispiel des Gens *gfp* experimentell gezeigt werden, dass durch die gegensätzliche Anordnung der T7-Promotoren die IVAC-vermittelte Expression des Zielgens vermindert wird (3.3.2). Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob alle Gene eines Genclusters, unabhängig von ihrer Transkriptionsrichtung, mit Hilfe des IVAC-Expressionssystems exprimiert werden können. Da die heterologen Wirtsstämme *P. putida* und *R. capsulatus* kein T7 RNA-Polymerase-Gen besitzen, wurde dieses über Derivate des replikativen *broad host range* Plasmids pML5 in den konstruierten Stämmen etabliert. Das Plasmid pML5T7 trägt das Gen der T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lac*-Promotors (Drepper *et al.*, 2005) und wurde in *P. putida* verwendet. In dem Plasmid pML5-Pfru-T7 steht das T7 RNA-Polymerase-Gen unter der Kontrolle des *Rhodobacter*-spezifischen Fruktose-Promotors. Durch die Zugabe von IPTG bzw. Fruktose kann die Expression der Zielgene induziert werden (Abb. 3.18).

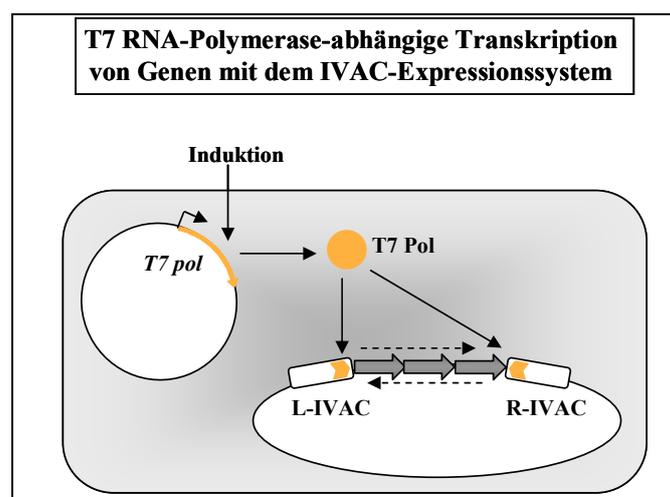


Abb. 3.18: Schematische Darstellung der IVAC-vermittelten Expression von Genen eines Genclusters. Das Gen *T7pol*, das für die T7 RNA-Polymerase kodiert, liegt unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors vor. Durch die Zugabe eines Induktors wird die Expression der T7 RNA-Polymerase, dargestellt durch einen orangefarbenen Kreis, erreicht. Da die T7-Promotoren (Blockpfeile in orange) der IVAC-Kassetten (weiße Vierecke) gegensätzlich angeordnet sind, soll die Expression aller Zielgene (graue Blockpfeile) unabhängig von ihrer Orientierung erfolgen.

Zur Überprüfung, ob alle Gene eines Klusters, unabhängig von ihrer Transkriptionsrichtung im Cluster, von der T7 RNA-Polymerase transkribiert werden können, wurde eine RT-PCR (2.11) durchgeführt. Dazu wurden die Expressionsstämme in den entsprechenden Kulturmedien (2.5) angezogen. Durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG (*P. putida*) bzw. 8 mM Fruktose (*R. capsulatus*) wurde die Expression der Zielgene induziert. Als Kontrollen dienten Expressionsstämme, in denen anstatt des Plasmids pML5-T7 bzw. pML5-Pfru-T7 der Leervektor pML5 ohne das T7 RNA-Polymerase-Gen vorlag. Die Proben für die RT-PCR wurden am Ende der exponentiellen Wachstumsphase der Kulturen entnommen und die mRNA wurde isoliert (2.11.1). Jeweils 500 ng isolierte mRNA wurde als *template* in der darauffolgenden reversen Transkription (2.11.2) eingesetzt. In der reversen Transkription wurden Primer sowohl zum Nachweis der Sense-Transkripte als auch der Antisense-Transkripte der Gene *lacZ*, *lacY* und *lacA* verwendet. Neben dem Nachweis der Transkripte wurde auch die Synthese der Antisense-Transkripte untersucht, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob der zwischen den IVAC-Kassetten liegende Gencluster von beiden Seiten aus abhängig von der T7 RNA-Polymerase transkribiert wird. Die in der reversen Transkription synthetisierte cDNA wurde anschließend in der RT-PCR (2.11.3) als *template* eingesetzt.

Wie in der Abbildung 3.19 a-d dargestellt, konnten sowohl die spezifischen Sense- als auch Antisense-Transkripte aller Gene des *lac*-Operons, unabhängig von dem verwendeten heterologen Wirtstamm und unabhängig von der Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem *lac*-Operon, nachgewiesen werden.

In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der RT-PCR mit den verschiedenen Expressionsstämmen und der jeweiligen Kontrollen dargestellt. Im Gegensatz zu dem heterologen Bakterienstamm *R. capsulatus* konnte in den heterologen *P. putida*-Stämmen, in denen der Leervektor pML5 ohne T7 RNA-Polymerase-Gen vorlag, eine geringe Transkriptkonzentration der Gene *lacZ*, *lacY* und *lacA* detektiert werden (Tab. 3.2). Die detektierten RNA-Konzentrationen lagen zwischen 0,01 ng und 0,04 ng. Dieses Ergebnis kann darauf zurückgeführt werden, dass eine RNA-Polymerase aus *P. putida* den spezifischen Promotor des *lac*-Operons erkennt.

Im Gegensatz zu den Expressionsstämmen *P. putida*::R>lac<L, *R. capsulatus*::L>lac<R und *R. capsulatus*::R>lac<L wurde nach der Induktion der Expression der Gene des *lac*-Operons überraschenderweise in dem Stamm *P. putida*::L>lac<R eine geringere Transkription der Gene des *lac*-Operons festgestellt als unter uninduzierten Bedingungen. Im Vergleich zu den Kulturen, die unter uninduzierten Bedingungen kultiviert worden waren, wurde die Transkriptkonzentration um 86 % (*lacZ*), 80 % (*lacY*) und 76 % (*lacA*) reduziert (Tab. 3.2).

Unter uninduzierten Bedingungen war die von dem T7-Promotor der L-IVAC-Kassette ausgehende Synthese der Antisense-RNA in dem Stamm *P. putida*::R>lac<L ebenso verstärkt. Eine mögliche Erklärung für dieses überraschende Ergebnis wird in dem Abschnitt 4.4.1 diskutiert.

Da in beiden heterologen Bakterienstämmen sowohl die Sense- als auch die Antisense-RNA aller Gene des *lac*-Operons nachgewiesen werden konnte, kann die Aussage getroffen werden, dass mit dem IVAC-Expressionssystem die Gene eines Genclusters, unabhängig von der Transkriptionsrichtung, exprimiert werden können. Die in Abschnitt 3.3.2 beschriebene Behinderung der T7 RNA-Polymerasen führt somit zu einer Abnahme, aber keiner vollständigen Inhibierung der Transkription. Mit Hilfe des IVAC-Expressionssystems ist es somit möglich, alle Gene eines Genclusters, unabhängig von ihrer Orientierung, vollständig zu transkribieren.

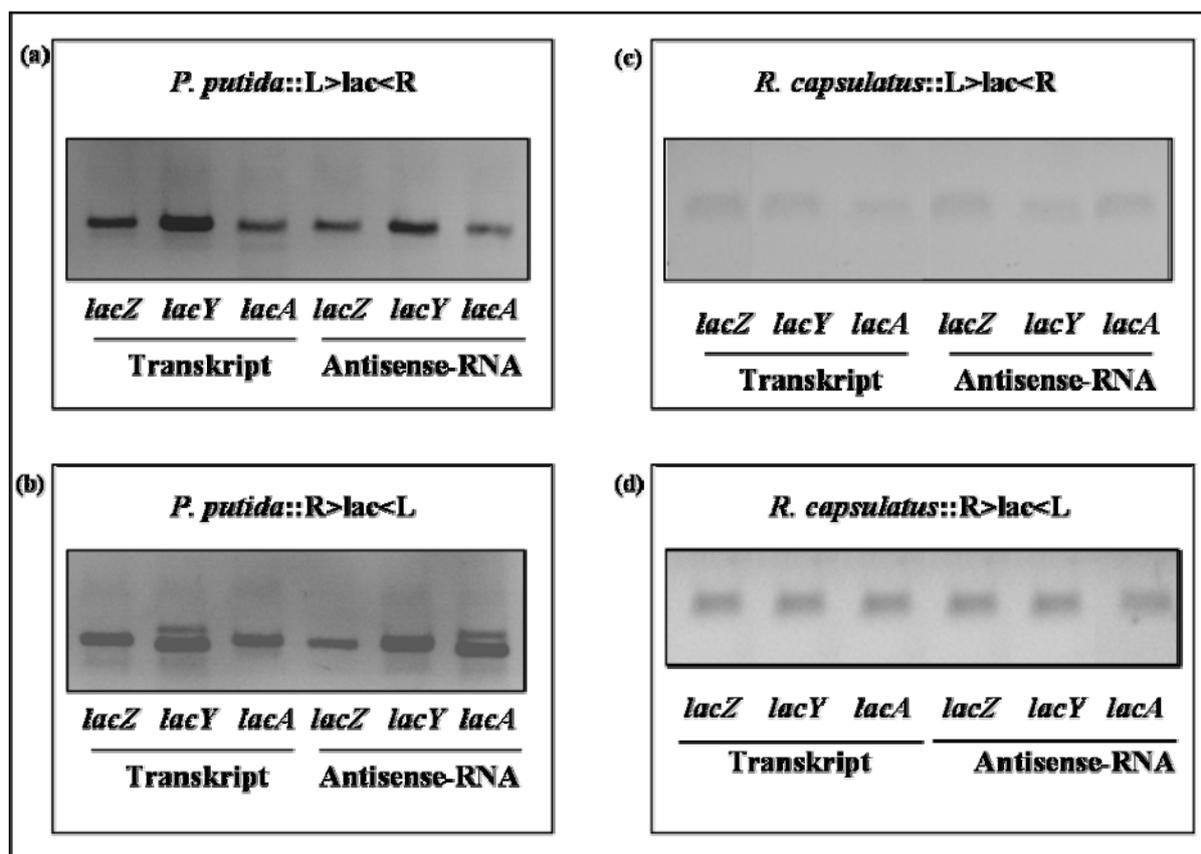


Abb. 3.19: Nachweis der IVAC-vermittelten Expression aller Gene des *lac*-Operons in den heterologen Bakterienstämmen *P. putida* und *R. capsulatus*. Durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG bzw. 8 mM Fruktose wurde die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression aller Gene des *lac*-Operons in den Expressionsstämmen (a) *P. putida*::L>lac<R, (b) *P. putida*::R>lac<L, (c) *R. capsulatus*::L>lac<R und (d) *R. capsulatus*::R>lac<L induziert. Die Proben für die RT-PCR wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Kulturen ($O.D_{580} = 1$) entnommen und die mRNA der verschiedenen Stämme wurde isoliert. Jeweils 500 ng der isolierten RNA wurde in der darauffolgenden reversen Transkription als *template* eingesetzt. Durch den Einsatz der spezifischen *up*- und *down*-Primer in der reversen Transkription konnte sowohl die Sense- als auch die Antisense-RNA detektiert werden. Zur Überprüfung der RT-PCR wurden von jedem PCR-Ansatz 5 μ l auf ein Agarosegel aufgetragen.

		Transkript [pg]			Antisense-RNA [pg]		
<i>P. putida</i>		<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>	<i>lacA</i>	<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>	<i>lacA</i>
L>lac<R	-T7pol	0,03	0,03	0,04	0,01	0,01	0,01
	+T7pol (-IPTG)	3,77	0,40	2,22	3,7	0,41	0,12
	+T7pol (+IPTG)	0,54	0,08	0,55	6,10	0,83	0,27
R>lac<L	-T7pol	0,01	0,03	0,01	-	0,01	0,01
	+T7pol (-IPTG)	0,05	0,02	0,05	4,81	12,92	0,09
	+T7pol (+IPTG)	0,21	0,05	0,21	4,71	1,49	0,47
<i>R. capsulatus</i>		<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>	<i>lacA</i>	<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>	<i>lacA</i>
L>lac<R	-T7pol	-	-	-	-	-	-
	+T7pol (-Frc)	0,05	0,04	0,08	0,03	0,02	0,06
	+T7pol (+Frc)	0,35	0,21	0,22	0,76	0,64	1,09
R>lac<L	-T7pol	-	-	-	-	-	-
	+T7pol (-Frc)	0,05	0,02	0,02	0,02	0,04	0,06
	+T7pol (+Frc)	0,60	0,62	0,76	1,74	0,97	2,29

Tab. 3.2: Nachweis der IVAC-vermittelten Synthese der Sense- und Antisense-RNA der Gene des *lac*-Operons in den heterologen Bakterienstämmen *P. putida*::L>lac<R, *P. putida*::R>lac<L, *R. capsulatus*::L>lac<R und *R. capsulatus*::R>lac<L.

Die T7 RNA-Polymerase-abhängige Transkription von mehreren Genen wird mit dem IVAC-System möglich. Durch die gegensätzlich angeordneten T7-Promotoren werden alle Gene, unabhängig von ihrer Orientierung, transkribiert.

3.4.3 Untersuchung der IVAC-vermittelten funktionellen Expression des *lac*-Operons in den heterologen Wirtsstämmen *P. putida* und *R. capsulatus*

Nachdem sowohl erfolgreich die Sense- als auch die Antisense-Transkripte aller Gene des *lac*-Operons in den heterologen Wirtsstämmen *P. putida* und *R. capsulatus* nachgewiesen werden konnten, wurde den Fragen nachgegangen, ob (a) der Integrationsort des rekombinanten IVAC-Transposons und (b) die Wahl des heterologen Bakterienstammes einen Einfluss auf die Expression der Zielgene haben. Dazu wurde die funktionelle Expression der β -Galaktosidase mit einem Enzymaktivitätstest untersucht. Der Enzymaktivitätstest für die β -Galaktosidase basiert auf o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG), das als Substrat der β -Galaktosidase zu o-Nitrophenol umgesetzt wird. O-Nitrophenol verursacht eine Gelbfärbung, die photometrisch bei 440 nm messbar ist (2.19).

Das Transposon Tn5 integriert unspezifisch in die chromosomale DNA eines Bakteriums (Reznikoff, 2008). Da die durch die IVAC-Kassetten vermittelte Transposition auf dem Tn5-Transposon basiert, unterscheidet sich jeder Stamm nach der Transposition durch den Integrationsort des rekombinanten IVAC-Transposons. Um Einflüsse des Integrationsortes auf die Expression des *lac*-Operons zu untersuchen, wurden im Folgenden je drei verschiedene Expressionsstämme, die sich nur in dem Ort der Integration des IVAC-Transposons unterscheiden, analysiert. So wurden für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität jeweils drei Expressionsstämme *P. putida*::R>lac<L, *P. putida*::L>lac<R, *R. capsulatus*::R>lac<L und *R. capsulatus*::L>lac<R, die sich nur in dem Integrationsort des IVAC-Transposons unterschieden, angezogen. Um die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression zu erreichen, wurde in die Expressionsstämme das entsprechende T7 RNA-Polymerase-Gen tragende Plasmid (pML5-T7 bzw. pML5-Pfru-T7) durch Konjugation übertragen. Als Kontrollen wurden die Expressionsstämme mit dem Leervektor pML5, der kein T7 RNA-Polymerase-Gen enthält, verwendet. Die unterschiedlichen Stämme wurden in den entsprechenden Medien kultiviert (2.5) und die Expression der Gene des *lac*-Operons wurde durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG (*P. putida*) bzw. 8 mM Fruktose (*R. capsulatus*) induziert. Als weitere Negativkontrolle wurden die Expressionsstämme ohne Zugabe des Induktors kultiviert.

Abbildung 3.20 stellt die Ergebnisse des ONPG-Tests mit dem heterologen Wirtsstamm *P. putida* dar. Die drei *P. putida*-Expressionsstämme, die sich nur durch den Ort der Integration des rekombinanten IVAC-Transposons unterscheiden, sind durch die Ziffern I, II und III gekennzeichnet. Es wurde bereits in den Expressionsstämmen, in denen das *lac*-Operon und

die IVAC-Kassetten jedoch keine T7 RNA-Polymerase vorlagen, eine geringe Enzymaktivität nachgewiesen (Abb. 3.20). In dem Expressionsstamm *P. putida*::L>lac<R wurde eine β -Galaktosidase-Aktivität von maximal 23 Miller-Units, in dem Stamm wurde *P. putida*::R>lac<L eine Aktivität von maximal 43 Miller-Units detektiert. Dieses Ergebnis kann darauf zurückgeführt werden, dass *P. putida* den spezifischen Promotor des *lac*-Operons erkennt.

Nach der Übertragung des Plasmids pML5-T7, in dem das T7 RNA-Polymerase-Gen vorliegt, in die verschiedenen *P. putida*-Expressionsstämme durch Konjugation wurde eine Zunahme der β -Galaktosidase-Aktivität beobachtet. Im Gegensatz zu dem Stamm *P. putida*::R>lac<L, in dem die Aktivität nur maximal um den Faktor 3 gesteigert wurde (Abb. 3.20a), stieg die Aktivität in dem Stamm *P. putida*::L>lac<R dramatisch an. Es wurde eine bis zu 68-fache Zunahme der β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen (Abb. 3.20b).

Wie erwartet führte die Induktion der Expression des *lac*-Operons in dem Stamm *P. putida*::R>lac<L zu einer weiteren Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität. Die Steigerung betrug 52 % (I), 11 % (II) bzw. 16 % (III) (Abb. 3.20a).

Entsprechend den Ergebnissen der RT-PCR (3.4.2) wurde nach der Induktion der Expression der Gene des *lac*-Operons in dem heterologen Bakterienstamm *P. putida*::L>lac<R eine geringere β -Galaktosidase-Aktivität festgestellt als unter uninduzierten Bedingungen. Im Vergleich zu den Kulturen, die unter uninduzierten Bedingungen kultiviert worden waren, wurde die Aktivität um 38 % (I), 29 % (II) und 51 % (III) reduziert (Abb. 3.20b). Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wird in dem Abschnitt 4.4.1 diskutiert.

Abhängig von dem Integrationsort des IVAC-Transposons wurden in beiden *P. putida*-Expressionsstämmen unterschiedliche Enzymaktivitäten gemessen. Sie lagen zwischen 128 Miller-Units und 224 Miller-Units unter induzierenden Bedingungen in *P. putida*::R>lac<L bzw. zwischen 705 Miller-Units und 1581 Miller-Units unter uninduzierten Bedingungen in *P. putida*::L>lac<R. Wie bereits in Kapitel 3.3.2 beschrieben, führte auch die Orientierung der IVAC-Kassetten zu den zu exprimierenden Genen zu abweichenden Ergebnissen. In der Orientierung, in der die T7 RNA-Polymerase von dem T7-Promotor der L-IVAC-Kassette die *lac*-Gene transkribiert, wurden höhere β -Galaktosidase-Aktivitäten erzielt. Mit dem heterologen Bakterienstamm *P. putida*::L>lac<R wurde eine maximale β -Galaktosidase-Aktivität von 1581 Miller-Units erzielt, während die maximale Aktivität der β -Galaktosidase in dem Stamm *P. putida*::R>lac<L bei 224 Miller-Units lag.

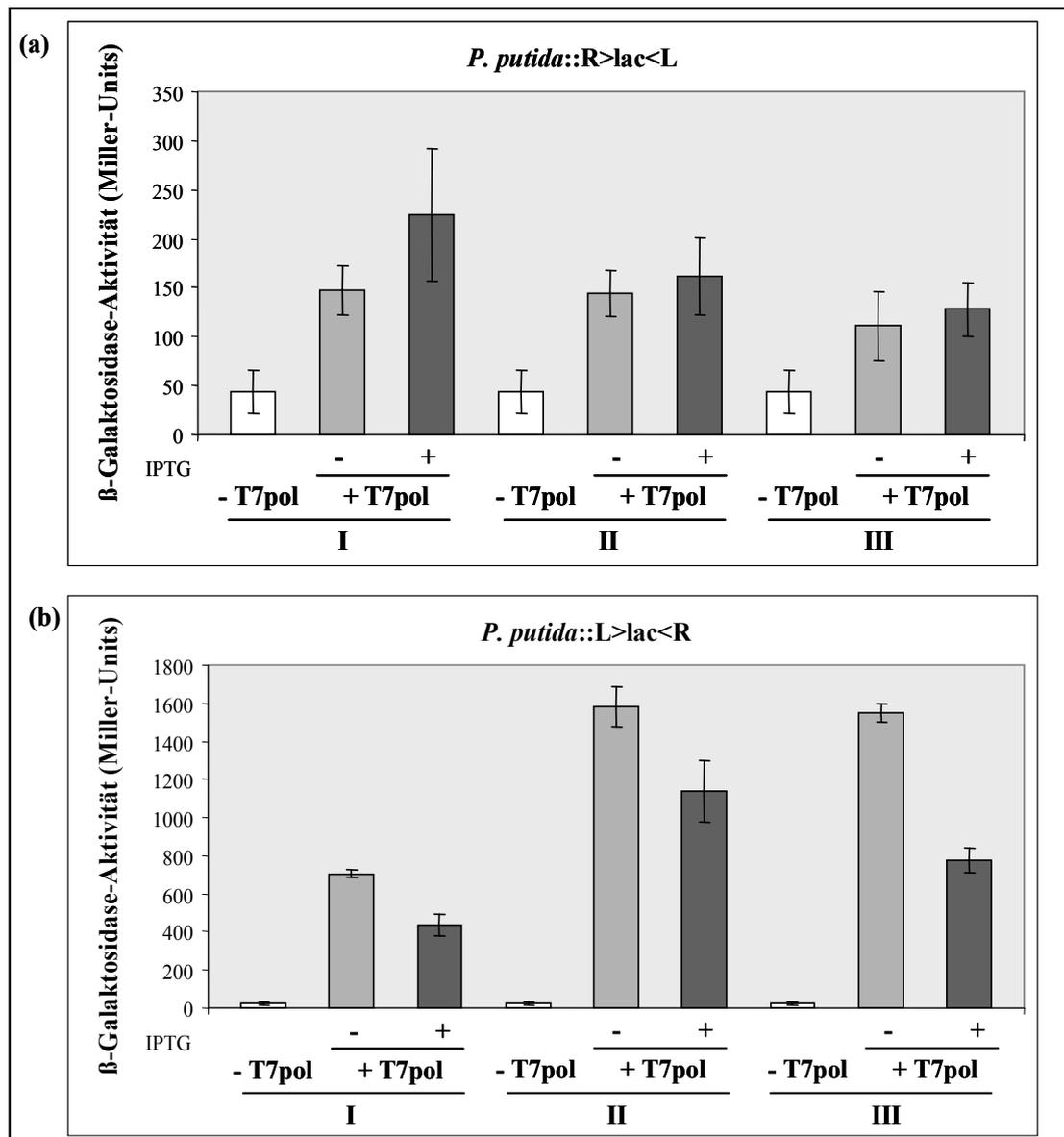


Abb. 3.20: Nachweis der IVAC-vermittelten Synthese der β -Galaktosidase in verschiedenen heterologen *P. putida*-Expressionsstämmen. Durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression aller Gene des *lac*-Operons in den Expressionsstämmen (a) *P. putida::R>lac<L* und (b) *P. putida::L>lac<R* induziert (+ IPTG). Als Negativkontrollen dienten *P. putida*-Expressionsstämme, die unter uninduzierten Bedingungen angezogen wurden (- IPTG) sowie *P. putida*-Stämme, die mit dem Leervektor pML5 transformiert worden waren (-T7pol). Die Expressionsstämme I, II und III unterscheiden sich nur durch den Integrationsort des rekombinanten IVAC-Transposons. Die funktionelle Expression der Gene wurde mit einem ONPG-Test (2.19) analysiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Messungen.

Auch in dem heterologen Wirtstamm *R. capsulatus* wurde die funktionelle Expression der β -Galaktosidase mit einem ONPG-Test (2.19) analysiert. Die Ergebnisse des ONPG-Tests sind in der Abbildung 3.21 dargestellt. Im Gegensatz zu dem heterologen Bakterienstamm *P. putida* wurde ohne T7 RNA-Polymerase in dem heterologen Wirt *R. capsulatus* keine β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen, da *R. capsulatus* den natürlichen Promotor des *lac*-Operons nicht erkennt (Abb. 3.21). Erst nach dem konjugativen Transfer des Plasmids pML5-

Pfru-T7 war in einigen *R. capsulatus*-Stämmen eine Aktivität der β -Galaktosidase nachzuweisen. Die Enzymaktivitäten lagen zwischen 70 und 336 Miller-Units (Abb. 3.21). Durch die Zugabe von Fruktose als Induktor für die Expression der T7 RNA-Polymerase wurde die Expression der β -Galaktosidase in allen Stämmen erwartungsgemäß erhöht. Die Aktivität wurde um den Faktor 7 (*R. capsulatus*::R>lac<L, I), 3 (*R. capsulatus*::R>lac<L, II) bzw. 2 (*R. capsulatus*::L>lac<R, I) gesteigert (Abb. 3.21). In einigen *R. capsulatus*-Stämmen konnte, abhängig von dem Ort der Integration des IVAC-Transposons, jedoch keine aktive β -Galaktosidase detektiert werden. Wie in dem heterologen Bakterienstamm *P. putida* führten die unterschiedlichen Orientierungen der IVAC-Kassetten zu einer unterschiedlichen funktionellen Expression des *lac*-Operons. Mit dem Stamm *R. capsulatus*::R>lac<L konnte eine maximale β -Galaktosidase-Aktivität von 1072 Miller-Units erzielt werden, während mit dem Stamm *R. capsulatus*::L>lac<R nur eine Aktivität von 254 Miller-Units erreicht wurde. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass diese Unterschiede auch durch den Integrationsort des IVAC-Transposons hervorgerufen wurden.

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass das IVAC-Expressionssystem grundsätzlich erfolgreich funktioniert. Das *lac*-Operon konnte zunächst durch Konjugation und Transposition stabil in die chromosomale DNA von verschiedenen heterologen Bakterienstämmen integriert werden. Im Anschluss an die Integration des Klusters wurden alle Gene des *lac*-Operons erfolgreich transkribiert. Die Orientierung der Gene hatte dabei keinen Einfluss auf ihre Expression. Die Ergebnisse belegen jedoch, dass in beiden heterologen Bakterienstämmen sowohl (a) der Integrationsort des rekombinanten IVAC-Transposons als auch (b) die Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem zu exprimierenden Gencluster einen Einfluss auf die funktionelle Expression der Zielgene haben. Dabei hatte der Ort der Integration des rekombinanten IVAC-Transposons in dem heterologen Bakterienstamm *R. capsulatus* einen größeren Einfluss auf die Expression der *lac*-Gene als in dem heterologen Wirt *P. putida*. Mit beiden heterologen Bakterienstämmen wurden vergleichbare β -Galaktosidase-Aktivitäten erzielt. In dem heterologen Wirt betrug die maximale β -Galaktosidase-Aktivität 1581 Miller-Units, während die maximale Aktivität der β -Galaktosidase in *R. capsulatus* bei 1072 Miller-Units lag.

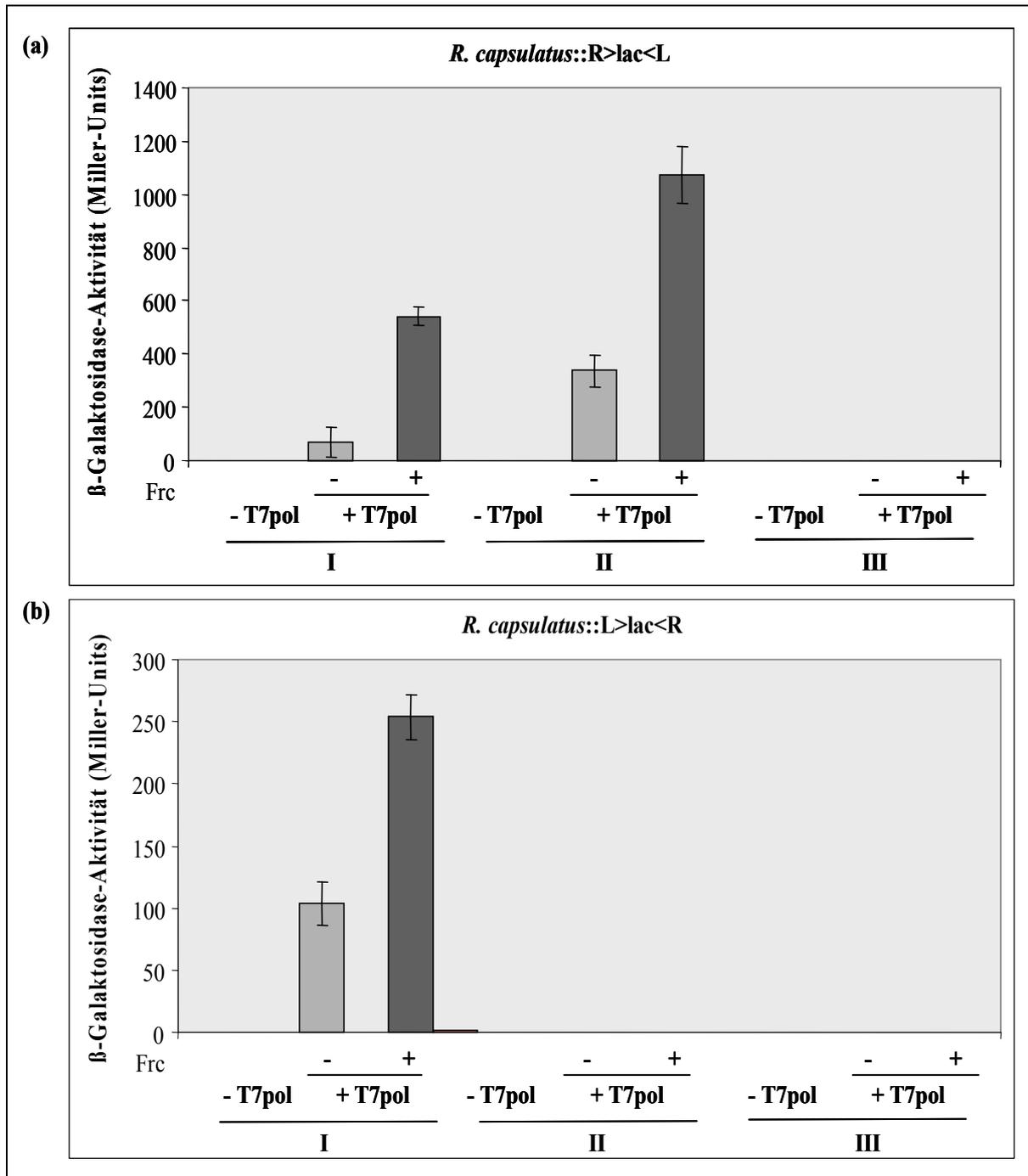


Abb. 3.21: Nachweis der IVAC-vermittelten Synthese der β -Galaktosidase in verschiedenen heterologen *R. capsulatus*-Expressionsstämmen. Durch die Zugabe von 8 mM Fruktose (Frc) wurde die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression aller Gene des *lac*-Operons in den Expressionsstämmen (a) *R. capsulatus*::R>lac<L und (b) *R. capsulatus*::L>lac<R induziert (+ Frc). Als Negativkontrollen dienen *R. capsulatus*-Expressionsstämmen, die unter uninduzierten Bedingungen angezogen wurden (- Frc) sowie *R. capsulatus*-Stämme, die mit dem Leervektor pML5 transformiert worden waren (-T7pol). Die Expressionsstämmen I, II und III unterscheiden sich nur durch den Integrationsort des rekombinanten IVAC-Transposons. Die funktionelle Expression der Gene wurde mit einem ONPG-Test analysiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Die T7 RNA-Polymerase-abhängige funktionelle Überexpression der Gene des *lac*-Operons konnte mit dem IVAC-Expressionssystem in den heterologen Wirtsstämmen *P. putida* und *R. capsulatus* erfolgreich durchgeführt werden. In beiden heterologen Wirtsstämmen wurde die Synthese der β -Galaktosidase sowohl durch die Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem *lac*-Operon als auch durch den Integrationsort des IVAC-Transposons beeinflusst.

3.5 Die IVAC-abhängige Synthese von Prodigiosin in den heterologen Wirtsstämmen *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus*

Anhand der Expression der Gene des *lac*-Operons in den heterologen Wirtsstämmen *P. putida* und *R. capsulatus* konnte gezeigt werden, dass das IVAC-Expressionssystem grundsätzlich erfolgreich funktioniert. Mit der neuen IVAC-Technologie war es somit möglich, das *lac*-Operon in das Genom eines heterologen Wirtes durch Konjugation und Transposition stabil zu integrieren und die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression aller Gene des *lac*-Operons zu ermöglichen.

Im Folgenden wurde versucht, die *pig*-Gene aus *Serratia marcescens* heterolog in den Wirten *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* IVAC-abhängig zu exprimieren. Dabei wurde den Fragen nachgegangen, ob es mit dem neuen IVAC-Expressionssystem möglich wird (a) auch alle Gene eines großen Genklusters heterolog zu exprimieren und (b) neue Prodigiosin-Produktionsstämme zu erzeugen. Zusätzlich wurde überprüft, ob mit den verschiedenen heterologen Bakterienstämmen unterschiedliche Prodigiosin-Ausbeuten erzielt werden können. Aufgrund der bakteriziden, fungiziden und immunsuppressiven Wirkung ist das rote Pigment Prodigiosin für die Biotechnologie von großer Bedeutung. Mit herkömmlichen Expressionssystemen konnte jedoch bisher eine heterologe Synthese von Prodigiosin nur in einigen verwandten Stämmen von *S. marcescens* mit einer geringen Ausbeute erzielt werden (Dauenhauer *et al.*, 1984; Thomson *et al.*, 2000). Der *pig*-Kluster aus *S. marcescens* besteht aus 14 *pig*-Genen (*pigA-pigN*), besitzt eine Größe von 21,4 kb und wird ausgehend von einem Promotor vor *pigA* transkribiert (Abb. 1.5). Alle *pig*-Gene liegen in einer Orientierung vor. Die Gene *cueR* und *copA*, die die *pig*-Gene flankieren, besitzen eigene Promotoren und sind nicht direkt für die erfolgreiche Biosynthese von Prodigiosin notwendig. Sie spielen jedoch eine Rolle bei der komplexen Regulation der Expression von Prodigiosin (Harris *et al.*, 2004). Da bereits gezeigt wurde, dass eine Deletion von *copA* zu einem Anstieg der Prodigiosin-Produktion in *S. marcescens* führt (Williamson *et al.*, 2006a), wurden für die IVAC-vermittelte Prodigiosin-Synthese nur die Gene *pigA-pigN* und das Gen *cueR*, das zu den *pig*-Genen in einer entgegengesetzten Orientierung vorliegt, in die heterologen Wirte transferiert.

3.5.1 Die Isolierung des *pig*-Klusters aus *S. marcescens* und die Konstruktion der Vektoren pL>PIG<R und pR>PIG<L

Um Prodigiosin heterolog synthetisieren zu können, musste zunächst die *pig*-Gene aus dem Genom von *S. marcescens* isoliert werden. Dafür wurde die chromosomale DNA aus *S. marcescens* isoliert (2.7.2). Aufgrund der Länge des *pig*-Klusters (21,4 kb) konnte die gesamte Genregion nicht mittels PCR zusammenhängend amplifiziert werden. Es wurde eine spezielle Klonierungsstrategie entwickelt, die in Abbildung 3.22 dargestellt ist. Der Cluster wurde in drei Abschnitte unterteilt (*cueR-pigC*, *pigD-pigF*, *pigG-pigN*), die jeweils per PCR amplifiziert (2.10) und in den Vektor pUC19 kloniert wurden. Durch die Wahl geeigneter kompatibler Schnittstellen, die mittels PCR an die einzelnen Fragmente angefügt worden waren, war es in den folgenden Klonierungsschritten möglich, die einzelnen Abschnitte sukzessive in einem Vektor zusammenzufügen. Der konstruierte Vektor, der den vollständigen *pig*-Cluster trug, wurde als pPIG bezeichnet (Abb. 3.22).

Für die IVAC-abhängige Expression von Prodigiosin wurden die IVAC-Kassetten zunächst durch Hydrolyse mit dem Restriktionsenzym *Xba*I zusammenhängend aus dem Vektor pIC20HRL isoliert und in zwei unterschiedlichen Orientierungen in den Vektor pPIG kloniert. So wurden zwei Plasmide konstruiert, die sowohl die *pig*-Gene als auch die IVAC-Kassetten enthalten. Die konstruierten Plasmide werden im Weiteren, abhängig von der Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem *pig*-Cluster, als pL>PIG<R bzw. pR>PIG<L bezeichnet (Abb. 3.23; s. Anhang, Abb. 8.7). In dem Plasmid pL>PIG<R wird der *pig*-Cluster ausgehend vom T7 RNA-Polymerase-abhängigen Promotor der L-IVAC-Kassette transkribiert. In dem Plasmid pR>PIG<L sind die IVAC-Kassetten gegensätzlich angeordnet und die Transkription des *pig*-Klusters erfolgt vom T7-Promotor der R-IVAC-Kassette aus.

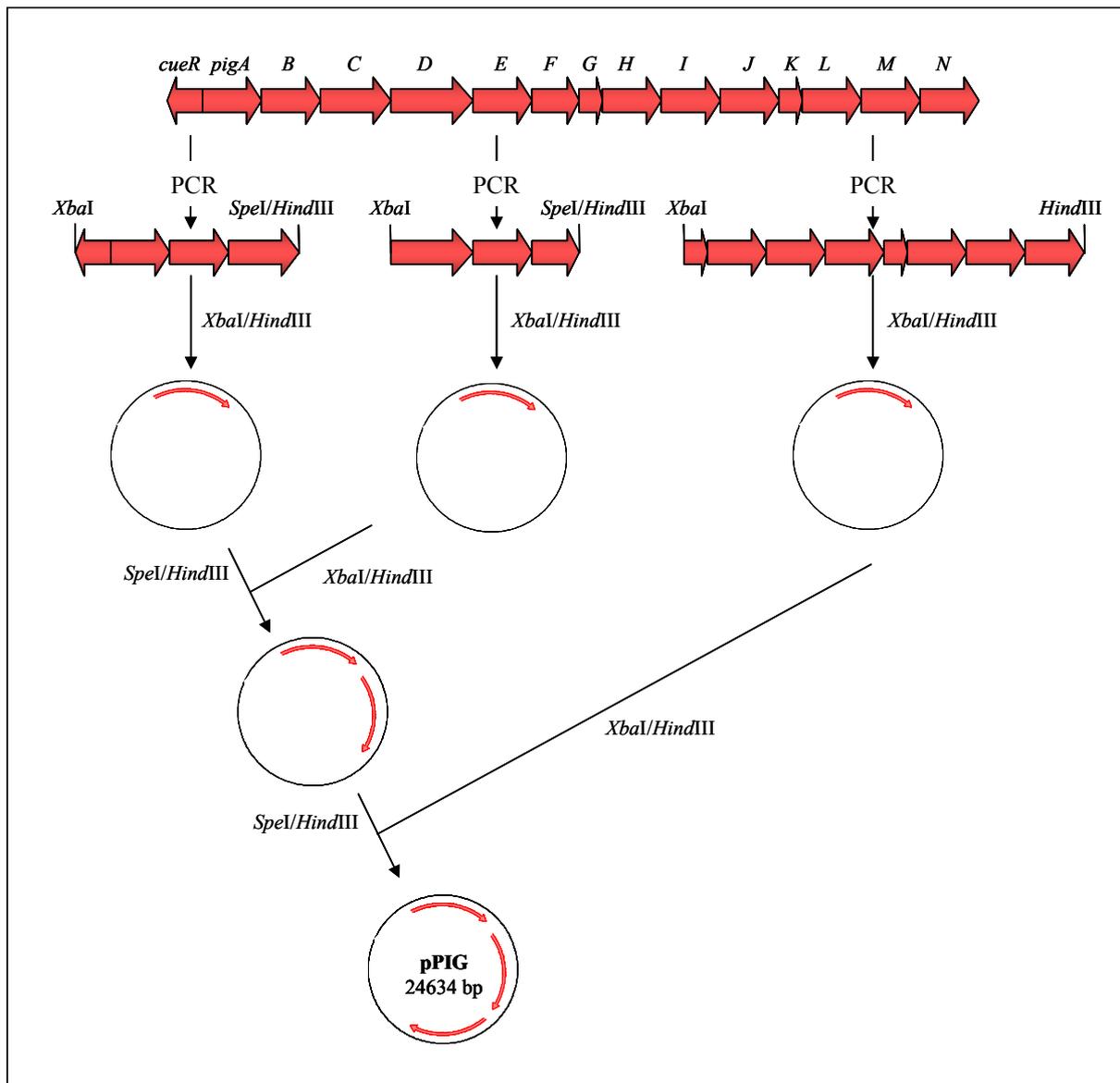


Abb. 3.22: Schematische Darstellung der Konstruktion des Vektors pPIG. Der *pig*-Kluster wurde in drei Teile unterteilt, die jeweils per PCR amplifiziert und in den Vektor pUC18 kloniert wurden. Durch die Wahl geeigneter Schnittstellen war es möglich, die drei einzelnen Teile des Klusters nacheinander in einem Vektor (pUC19) zu integrieren. Der Vektor, in dem der vollständige *pig*-Gencluster lokalisiert war, wurde als pPIG bezeichnet.

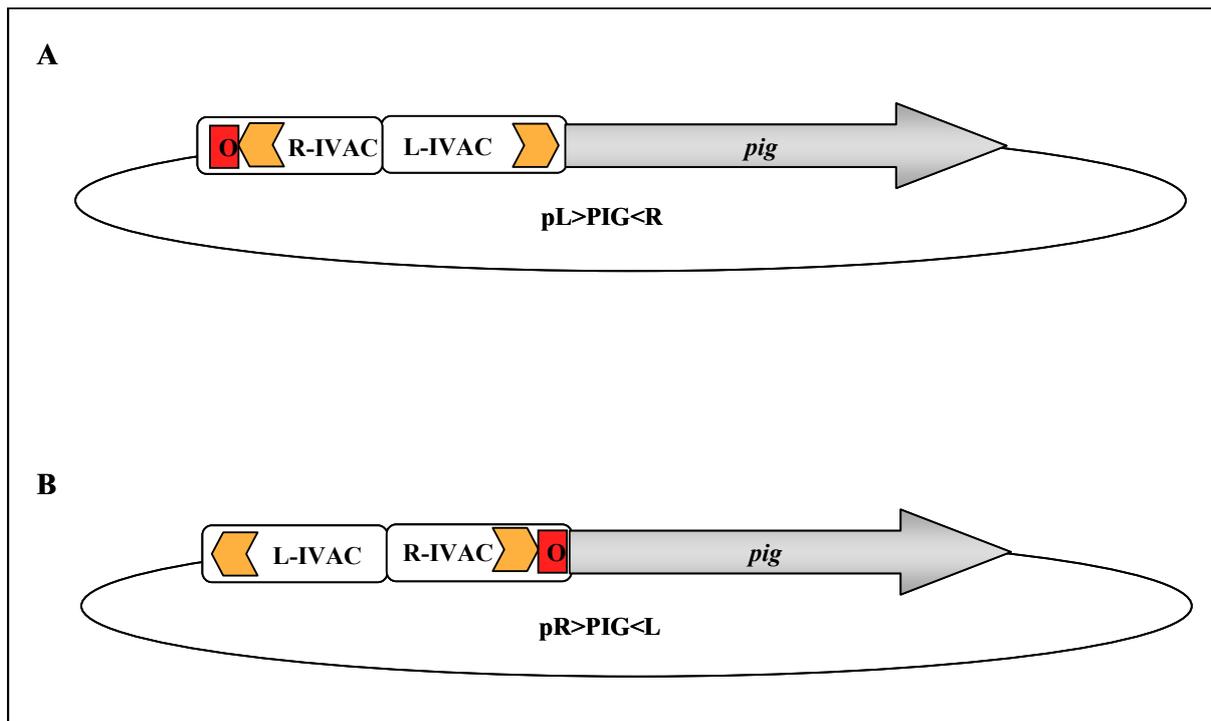


Abb. 3.23: Schematische Darstellung der Vektoren $pL>PIG<R$ und $pR>PIG<L$. Die IVAC-Kassetten wurden durch Restriktion mit *Xba*I aus dem Vektor pIC20HRL isoliert und in den Vektor pPIG, in dem die *pig*-Gene lokalisiert sind, kloniert. Abhängig von der Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem Gen *gfp* wurden die Vektoren als (a) $pL>PIG<R$ bzw. (b) $pR>PIG<L$ bezeichnet. Sowohl der *pig*-Kluster als auch die IVAC-Kassetten sind schematisch dargestellt. Die orangefarbenen Pfeile stellen die T7-Promotoren dar. Der T7-Promotor der R-IVAC-Kassette wird zusätzlich durch einen *lac*-Operator (rotes Viereck) kontrolliert.

Die gesamte *pig*-Genregion, die für die Biosynthese von Prodigiosin benötigt wird, konnte erfolgreich aus der chromosomalen DNA von *S. marcescens* isoliert und in den Vektor pUC19 kloniert werden. Für die IVAC-abhängige Expression von Prodigiosin wurden die IVAC-Kassetten in zwei unterschiedlichen Orientierungen neben dem *pig*-Kluster integriert. Die erzeugten rekombinanten Plasmide, in denen als Insert der vollständige *pig*-Kluster sowie die IVAC-Kassetten lokalisiert waren, wurden je nach der Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem *pig*-Kluster als $pR>PIG<L$ bzw. $pL>PIG<R$ bezeichnet.

3.5.2 Die IVAC-abhängige Synthese von Prodigiosin in dem heterologen Bakterienstamm *E. coli*

Für die heterologe Expression der *pig*-Gene in *E. coli* wurde der T7-Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pL>PIG<R bzw. pR>PIG<L transformiert (2.13) und in LB-Medium über Nacht bei 30°C inkubiert. Da die rekombinanten Plasmide pL>PIG<R und pR>PIG<L auf dem Plasmid pUC19 basieren, wird der *origin of replication* der Plasmide in *E. coli* erkannt. Dadurch war es nicht möglich, auf eine erfolgreiche Transposition der Plasmide pL>PIG<R und pR>PIG<L in die chromosomale DNA von *E. coli* zu selektionieren. Somit lag das jeweilige Plasmid in *E. coli* replikativ vor. Beim Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase ($O.D._{580} = 0,5$) wurde in den Kulturen die Expression der *pig*-Gene durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Zur Kontrolle der IVAC-vermittelten Expression wurde auch das Plasmid pPIG, in dem der *pig*-Kluster, aber nicht die IVAC-Kassetten vorlagen, durch Transformation in *E. coli* BL21(DE3) übertragen. Als weitere Kontrollstämme dienten der *E. coli* BL21(DE3) Wildtyp und *E. coli*-Expressionsstämme, die unter uninduzierten Bedingungen angezogen wurden.

Nach der Inkubation der Kulturen konnte eine Rotfärbung bei dem *E. coli*-Stamm beobachtet werden, der mit dem Plasmid pR>PIG<L transformiert und unter induzierten Bedingungen kultiviert worden war (Abb. 3.24). Im Gegensatz dazu wiesen die *E. coli*-Stämme mit dem Plasmid pL>PIG<R bzw. mit dem Kontrollplasmid pPIG sowohl nach der Zugabe von IPTG als auch ohne Induktion der T7 RNA-Polymerase keinen Farbunterschied zum Wildtyp auf.

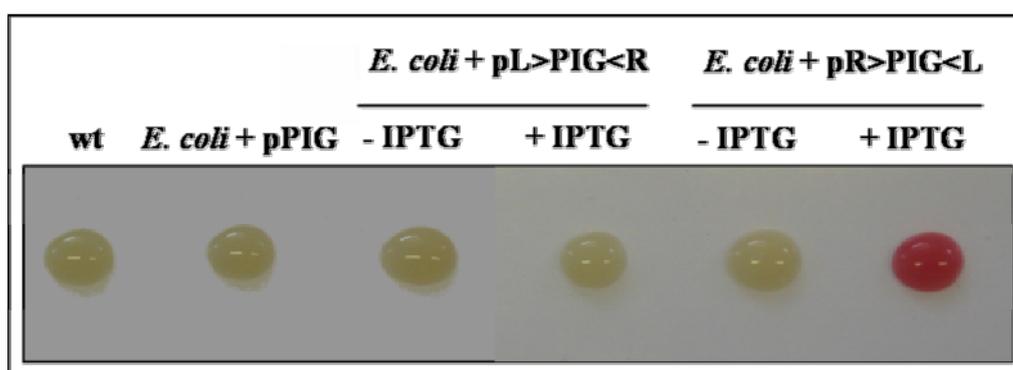


Abb. 3.24: Die heterologe Synthese von Prodigiosin in *E. coli*. *E. coli* BL21(DE3) wurde mit den Plasmiden pPIG, pL>PIG<R bzw. pR>PIG<L transformiert, die Expression der T7 RNA-Polymerase durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und die Kulturen bei 30°C üN inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine rote Farbe bei dem *E. coli*-Expressionsstämmen, der mit dem Plasmid pR>PIG<L transformiert worden war, beobachtet. Der *E. coli* BL21(DE3) Wildtyp und die übrigen Expressionsstämme zeigten keine rote Färbung.

Um zu überprüfen, ob abhängig von der T7 RNA-Polymerase der gesamte *pig*-Kluster in dem *E. coli*-Expressionsstamm transkribiert worden war oder ob die in Abschnitt 3.3.2 beschriebene wechselseitige Behinderung der T7 RNA-Polymerasen dazu führt, dass die Transkription der *pig*-Gene vorzeitig abbricht, wurde eine RT-PCR (2.11) durchgeführt. Für die RT-PCR wurden zunächst in der reversen Transkription (2.11.2) die spezifischen Primer der einzelnen *pig*-Gene und des Gens *cueR* eingesetzt. Die Transkription der Gene *pigG* und *pigL* konnte dabei nicht analysiert werden, da für diese Gene keine geeigneten Primer synthetisiert werden konnten. Die während der reversen Transkription synthetisierte cDNA wurde dann als *template* in der RT-PCR (2.11.3) verwendet. Als Kontrolle dienten der *E. coli*-Expressionsstamm, der unter uninduzierten Bedingungen kultiviert worden war, und der *E. coli* BL21(DE3) Wildtyp. Zusätzlich wurde mit der RT-PCR die Transkription der Gene des *pig*-Klusters in dem natürlichen Produzenten *S. marcescens* bestimmt.

In den Kontrollstämmen, dem *E. coli* BL21(DE3) Wildtyp sowie dem uninduzierten Expressionsstamm war kein spezifisches Transkript der Gene des *pig*-Klusters nachzuweisen. Spezifisches Transkript aller Gene des *pig*-Klusters konnte jedoch in dem *E. coli*-Expressionsstamm mit dem Plasmid pR>PIG<L, der unter induzierten Bedingungen angezogen worden war, mittels RT-PCR detektiert werden (Abb. 3.25). Es wurden Transkriptkonzentrationen zwischen 24 ng (*pigI*) und 269 ng (*pigF*) nachgewiesen. Von dem Gen *cueR*, das in einer anderen Transkriptionsrichtung als die übrigen Gene des *pig*-Klusters vorliegt, konnte ebenso eine Konzentration von 67 ng nachgewiesen werden. Überraschenderweise wurde in dem natürlichen Produzenten *S. marcescens*, trotz roter Färbung der Kolonien, kein Transkript der *pig*-Gene detektiert. Prodigiosin wird als typisches Sekundärmetabolit in *S. marcescens* synthetisiert (Williamson *et al.*, 2006a). Wahrscheinlich ist die natürlich gebildete Konzentration von Prodigiosin in *S. marcescens* sehr gering und liegt damit unter der Nachweisgrenze der RT-PCR.

Die Ergebnisse der RT-PCR belegen, dass mit dem IVAC-Expressionssystem alle Gene des *pig*-Klusters, unabhängig von der Orientierung der Gene und ihrer Entfernung zum T7-Promotor, heterolog in *E. coli* exprimiert werden konnten.

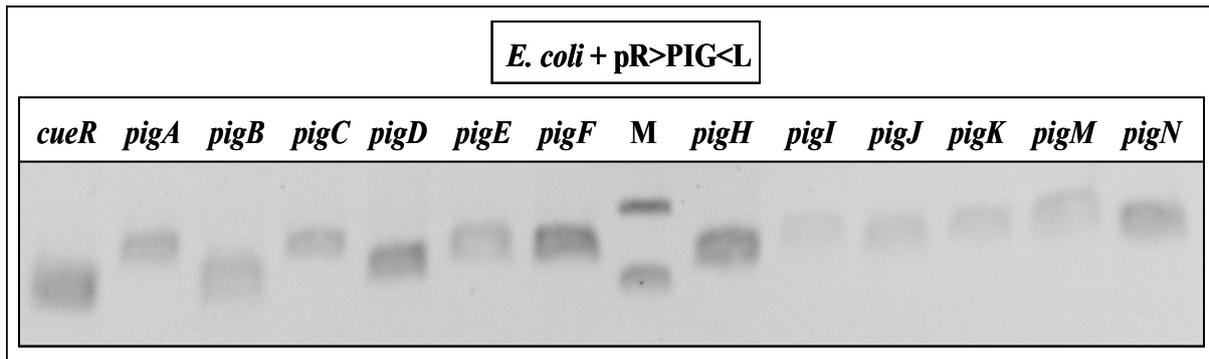


Abb. 3.25: Nachweis der Transkription der *pig*-Gene in dem heterologen Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3). Durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression aller Gene des *pig*-Klusters in dem heterologen Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3), der mit dem Plasmid pR>PIG<L transformiert worden war, induziert. Die Proben für die RT-PCR wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Kulturen (O.D.₅₈₀ = 1) entnommen und die mRNA der verschiedenen Stämme wurde isoliert. Jeweils 150 ng der isolierten RNA wurden in der darauffolgenden reversen Transkription als *template* eingesetzt. Durch den Einsatz der spezifischen Primer in der reversen Transkription konnte die Transkription der *pig*-Gene nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der RT-PCR wurden von jedem PCR-Ansatz 5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen. M: Marker

Die Synthese von Prodigiosin erfolgt über zwei Biosynthesewege, deren Endprodukte, 2-Methyl-3-n-amylopyrrol (MAP) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd (MBC), in einem letzten Schritt zu Prodigiosin kondensiert werden (Abb. 1.4; Williamson *et al.*, 2005; Chawrai *et al.*, 2008). Mittels der RT-PCR konnte dargestellt werden, dass alle Gene, deren Genprodukte für die erfolgreiche Synthese von Prodigiosin benötigt werden, mit Hilfe des IVAC-Systems transkribiert wurden. Die erfolgreiche Transkription der *pig*-Gene bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass alle *pig*-Enzyme auch funktionell in der Zelle vorliegen. Wenn z. B. für die Faltung der Enzyme spezifische Chaperone benötigt werden, die von *E. coli* nicht exprimiert werden, liegen die Enzyme nicht funktionell in der Zelle vor. Wenn nicht alle benötigten *Pig*-Enzyme funktionell vorliegen, bricht der Syntheseweg von Prodigiosin vorzeitig ab und es entstehen Vorstufen von Prodigiosin.

Zur Identifizierung des gebildeten Pigments in dem *E. coli*-Expressionsstamm mit dem Plasmid pR>PIG<L wurde ein Absorptionsspektrum (2.21) aufgenommen. Dazu wurde der *E. coli*-Expressionsstamm mit dem Plasmid pR>PIG<L transformiert und in LB-Medium bei 30°C kultiviert. Beim Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase wurde die Expression der Zielgene durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Als Negativkontrollen dienten wiederum der *E. coli* BL21(DE3) Wildtyp sowie der Stamm *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pR>PIG<L, der ohne Zugabe von IPTG zur Induktion der Zielgene kultiviert worden war.

In Abbildung 3.26 sind die Ergebnisse der Messungen dargestellt. Prodigiosin absorbiert spezifisch bei 534 nm. Bei dem *E. coli* BL21(DE3)-Stamm mit dem Expressionsplasmid

pR>PIG<L, der unter induzierten Bedingungen kultiviert worden war, wurde der spezifische Peak bei 534 nm und damit die erfolgreiche Synthese von Prodigiosin nachgewiesen (Abb. 3.26). Wie erwartet zeigten der Wildtyp (ohne Abb.) und die uninduzierten Kulturen (Abb. 3.26) keinen Peak bei 534 nm und somit auch keine Prodigiosin-Produktion.

Die Ergebnisse der Absorptionsmessungen belegen somit eindeutig, dass mit Hilfe des IVAC-Expressionssystems *E. coli* als neuer Prodigiosin-Produktionsstamm erzeugt werden konnte. Es wurde mit dem IVAC-Expressionssystem nicht nur die vollständige Transkription aller Gene des *pig*-Klusters, sondern auch die funktionelle Synthese aller Enzyme erreicht. Das IVAC-Expressionssystem eignet sich somit für die funktionelle Expression großer Genregionen. Im Folgenden wurde die Prodigiosin-Produktion in dem heterologen Wirt *E. coli* mit der Produktion des Pigments in dem natürlichen Produzenten *S. marcescens* verglichen.

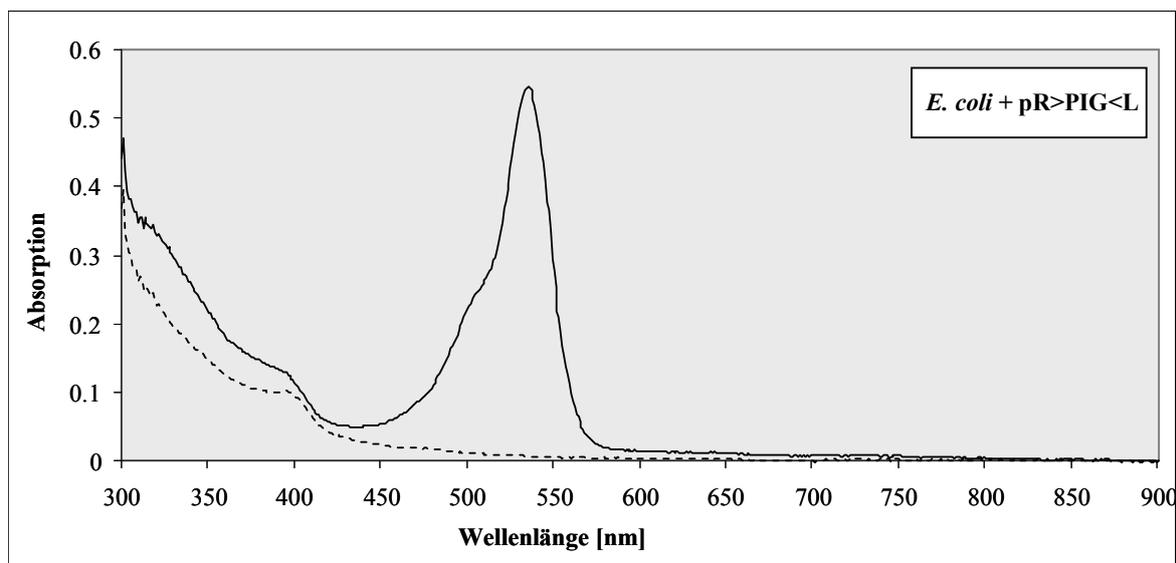


Abb. 3.26: Identifizierung des synthetisierten Pigments in dem heterologen Bakterienstamm *E. coli*. Die Identifizierung des synthetisierten Pigments in dem heterologen Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3), der mit dem Plasmid pR>PIG<L transformiert worden war, erfolgte mit der Messung von Absorptionsspektren. Dazu wurde der Expressionsstamm unter induzierten Bedingungen (durchgezogene Linie) bzw. uninduzierten Bedingungen (gestrichelte Linie) angezogen. Die Induktion der Gene des *pig*-Klusters erfolgte durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG. Die Kulturen wurden μ N bei 30°C inkubiert. Für die Messung der Absorptionsspektren wurden die Testkulturen auf eine identische O.D.₅₈₀ = 1 eingestellt und das Pigment mit acidifiziertem Ethanol (4 % 1M HCl) aus den Zellen extrahiert. Nach der Zentrifugation wurde die Absorption des Überstandes in dem Wellenlängenbereich von 300 nm bis 900 nm gemessen. Die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen lag unter 10 %.

Um die Produktion von Prodigiosin in dem heterologen Bakterienstamm *E. coli* mit der Prodigiosin-Synthese in dem natürlichen Produktionsstamm *S. marcescens* vergleichen zu können, wurde die relative Prodigiosin-Konzentration pro Zelle mit folgender Formel bestimmt: $[A_{534}/O.D._{580}] \times 50$ (2.22). *S. marcescens* wies eine Prodigiosin-Konzentration von 1,7 pro Zelle auf (Abb. 3.27). In *E. coli* BL21(DE3) und dem *E. coli*-Expressionsstamm, der

ohne Zugabe von IPTG kultiviert worden war, konnte erwartungsgemäß keine Biosynthese von Prodigiosin nachgewiesen werden (Abb. 3.27). Die Induktion der Expression der *pig*-Gene führte in dem *E. coli* BL21(DE3)-Expressionsstamm zu einem starken Anstieg der Prodigiosin-Synthese. Abhängig von der T7 RNA-Polymerase wurde eine relative Prodigiosin-Konzentration von 16 pro Zelle erreicht (Abb. 3.27). Damit konnte mit dem IVAC-System in dem heterologen Wirt *E. coli* die Prodigiosin-Produktion im Gegensatz zu dem homologen Wirt *S. marcescens* um den Faktor 9,4 gesteigert werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es mit dem IVAC-Expressionssystem zum ersten Mal möglich wurde, Prodigiosin heterolog in dem Bakterienstamm *E. coli* zu synthetisieren. Abhängig von der T7 RNA-Polymerase wurden alle Gene des *pig*-Klusters in *E. coli* transkribiert und die Prodigiosin-Produktion im Vergleich zu dem natürlichen Produzentenstamm *S. marcescens* deutlich gesteigert.

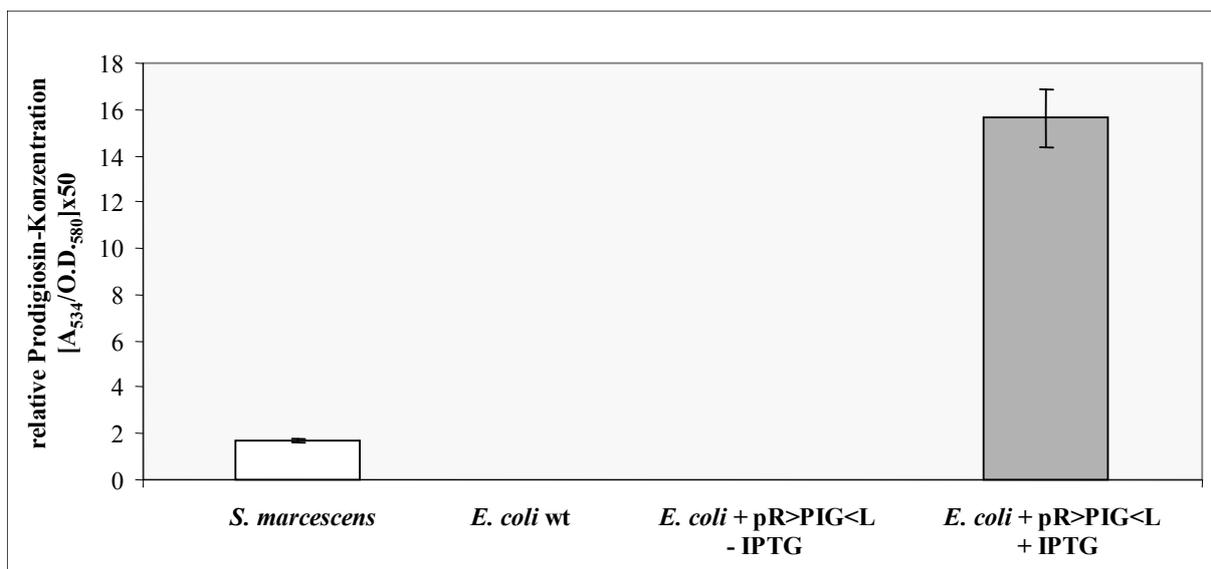


Abb. 3.27: Vergleich der relativen Prodigiosin-Produktion in *S. marcescens* mit der relativen Prodigiosin-Produktion in dem heterologen Wirtsstamm *E. coli*. Für die Bestimmung der relativen Prodigiosin-Produktion wurden der natürliche Produzent *S. marcescens* und der heterologe Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3), der mit dem Plasmid pR>PIG<L transformiert worden war, bei 30°C angezogen. Die Expression der *pig*-Gene wurde induziert. Als Negativkontrollen dienten der *E. coli* BL21(DE3) Wildtypstamm (wt) sowie der *E. coli*-Expressionsstamm, der ohne Induktion der Expression der Zielgene angezogen wurde. Mit acidifiziertem Ethanol (4 % 1M HCl) wurde Prodigiosin aus den Zellen extrahiert. Die Absorption des Überstandes wurde bei 534 nm gemessen und die Prodigiosin-Konzentration mit folgender Formel bestimmt: $[A_{534}/O.D._{580}] \times 50$. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Abhängig von dem IVAC-Expressionssystem konnte Prodigiosin erfolgreich in dem T7-Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) synthetisiert werden. Im Vergleich zu dem natürlichen Produktionsstamm *S. marcescens* wurde die Prodigiosin-Produktion in dem heterologen Wirtsstamm *E. coli* BL21(DE3) um den Faktor 9,4 erhöht.

3.5.3 Die IVAC-abhängige Synthese von Prodigiosin in dem heterologen Bakterienstamm *R. capsulatus*

Um zu überprüfen, ob (a) mit Hilfe des IVAC-Expressionssystems die heterologe Synthese von Prodigiosin in verschiedenen Gram-negativen Bakterienstämmen prinzipiell möglich wird und (b) unterschiedliche heterologe Bakterienstämme zu abweichenden Prodigiosin-Produktionen führen, wurde der *pig*-Kluster zusätzlich in dem heterologen Bakterienstamm *R. capsulatus* exprimiert.

Für den konjugativen Transfer des *pig*-Klusters in den neuen Wirtstamm *R. capsulatus* wurde zunächst der Donorstamm *E. coli* S17-1 mit den Plasmiden pL>PIG<R und pR>PIG<L transformiert (2.13). Der Transfer der Plasmide durch Konjugation in den Rezipienten *R. capsulatus* sowie die stabile Integration in das Genom durch Transposition wurden wie in Abschnitt 2.14.2 beschrieben durchgeführt. Konjugation und Transposition wurden durch Selektion auf das Antibiotikum Gentamycin verifiziert. Die gemessenen Transpositionsraten von $1,2 \times 10^{-6}$ ($\pm 0,7 \times 10^{-6}$) wichen sowohl nicht entscheidend von der Transpositionsrate des natürlichen Transposons Tn5 ($6,5 \times 10^{-5}$; Naumann & Reznikoff, 2002) ab, als auch nicht von den gemessenen Transpositionsraten, die zu der Übertragung des *lac*-Operons geführt hatten ($1,6 \times 10^{-6} \pm 0,4 \times 10^{-6}$). Die Größe des *pig*-Klusters hatte demnach keine entscheidende Auswirkung auf die Transpositionseffizienz des rekombinanten IVAC-Transposons. Die konstruierten *R. capsulatus*-Expressionsstämme werden im Folgenden, abhängig von der Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem *pig*-Kluster, als *R. capsulatus*::L>PIG<R bzw. *R. capsulatus*::R>PIG<L bezeichnet. Da in vorhergegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass der Integrationsort des rekombinanten IVAC-Transposons einen Einfluss auf die Synthese der Zielproteine hat (3.4.3), wurden in den folgenden Untersuchungen zur heterologen Produktion von Prodigiosin in *R. capsulatus* je drei Stämme angezogen und analysiert, die sich nur in dem Integrationsort des IVAC-Transposons unterschieden.

In die neuen Expressionsstämme wurde zusätzlich das T7 RNA-Polymerase-Gen tragende Plasmid pML5-Pfru-T7 transferiert, da *R. capsulatus* kein T7 RNA-Polymerase-Gen besitzt. Als Kontrollstämme dienten *R. capsulatus*-Expressionsstämme, die ohne Induktion der T7 RNA-Polymerase kultiviert wurden, *R. capsulatus*-Stämme mit IVAC-Transposon, aber ohne das Plasmid pML5-Pfru-T7 und der *R. capsulatus* Wildtyp. *R. capsulatus*::L>PIG<R, *R. capsulatus*::R>PIG<L und die entsprechenden Kontrollstämme wurden über Nacht bei 30°C unter aeroben (2.6.3) Bedingungen kultiviert. Durch die Zugabe von 8 mM Fruktose wurde die Expression der T7 RNA-Polymerase in den entsprechenden Stämmen induziert.

Das phototrophe Bakterium *R. capsulatus* synthetisiert eine Vielzahl von Carotinoiden, die eine rote Färbung der Zellen hervorrufen (Bauer, 2004). Aufgrund der natürlichen Rotfärbung von *R. capsulatus* war nach Beendigung der Inkubationszeit die Verifizierung der Expression des roten Pigments Prodigiosin anhand einer roten Färbung der Zellen somit nicht möglich. Um die heterologe Expression der *pig*-Gene zu überprüfen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die Proben für die RT-PCR wurden am Ende der exponentiellen Phase entnommen, die RNA isoliert und in der darauffolgenden reversen Transkription eingesetzt. Mittels RT-PCR (2.11) wurde die IVAC-abhängige Transkription der Gene des *pig*-Klusters überprüft. Transkript der einzelnen *pig*-Gene war nur in den induzierten *R. capsulatus*-Expressionsstämmen *R. capsulatus*::L>PIG<R (Abb. 3.23) und *R. capsulatus*::R>PIG<L (ohne Abb.) mit dem Plasmid pML5-Pfru-T7, die unter induzierten Bedingungen kultiviert worden waren, nachzuweisen. Es wurden RNA-Konzentrationen von 0,01 ng (*pigJ*) bis 0,2 ng (*pigF*) gemessen. Wie in dem heterologen Bakterienstamm *E. coli* waren die Transkriptkonzentrationen der einzelnen Gene sowohl unabhängig von der Entfernung der Gene zum T7-Promotor als auch unabhängig von ihrer Orientierung. Das Gen *cueR* ist in einer zu den *pig*-Genen gegensätzlichen Leserichtung angeordnet. Dennoch wurde auch von dem Gen *cueR* eine entsprechende Menge Transkript detektiert (0,08 ng). Die Stämme ohne T7 RNA-Polymerase sowie die Negativkontrolle, der *R. capsulatus* Wildtyp, zeigten keine Transkription des *pig*-Klusters.

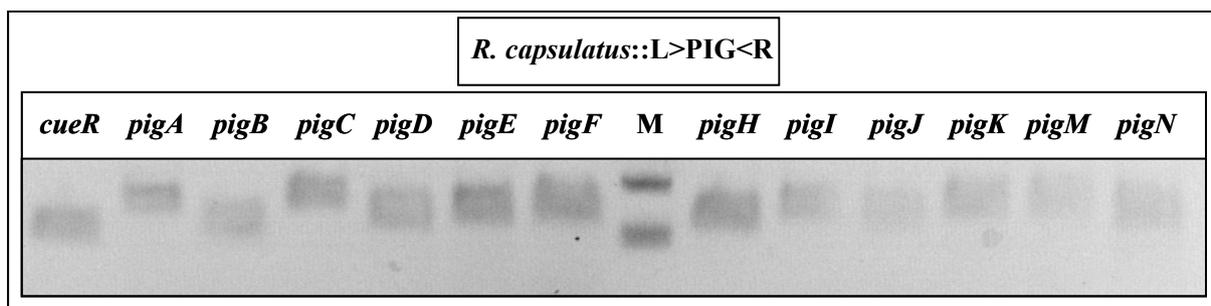


Abb. 3.28: Nachweis der Transkription der *pig*-Gene in dem heterologen Bakterienstamm *R. capsulatus*::L>PIG<R. Durch die Zugabe von 8 mM Fruktose wurde die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression aller Gene des *pig*-Klusters in dem heterologen Expressionsstamm induziert. Die Proben für die RT-PCR wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Kulturen ($O.D._{660} = 1$) entnommen und die mRNA der verschiedenen Stämme wurde isoliert. Jeweils 150 ng der isolierten RNA wurden in der darauffolgenden reversen Transkription als *template* eingesetzt. Durch den Einsatz der spezifischen Primer in der reversen Transkription konnte die Transkription der *pig*-Gene nachgewiesen werden. Von jedem RT-PCR-Ansatz wurden 5 μ l auf ein Agarosegel aufgetragen. M: Marker.

Um neben der Transkription des *pig*-Klusters auch die erfolgreiche Synthese von Prodigiosin in dem heterologen Wirt *R. capsulatus* bestätigen zu können, wurden Absorptionsspektren (2.21) der entsprechenden Stämme gemessen. Dafür wurden die Expressionsstämme unter

aeroben (2.6.3) Bedingungen kultiviert und die Expression der Gene des *pig*-Klusters wurde durch die Zugabe von 8 mM Fruktose induziert. Als Negativkontrolle diente der *R. capsulatus* Wildtyp. Die Ergebnisse der Absorptionsmessungen sind in Abbildung 3.29 dargestellt. Überraschenderweise wiesen die Spektren der *R. capsulatus*-Expressionsstämme keine Unterschiede zu den Spektren des *R. capsulatus* Wildtyp auf. Mit den heterologen Wirtsstämmen *R. capsulatus*::L>PIG<R und *R. capsulatus*::R>PIG<L war kein für Prodigiosin charakteristischer Peak bei 534 nm nachzuweisen (Abb. 3.29). Somit konnte in *R. capsulatus* keine Prodigiosin-Synthese festgestellt werden.

Bei der IVAC-abhängigen Expression der β -Galaktosidase in dem heterologen Bakterienstamm *R. capsulatus* wurde beobachtet, dass der Integrationsort des IVAC-Transposons einen großen Einfluss auf die Synthese des Zielproteins hat (3.5.3). In einigen *R. capsulatus*-Expressionsstämmen konnte keine funktionelle β -Galaktosidase nachgewiesen werden, während mit anderen *R. capsulatus*-Stämmen hohe Aktivitäten der β -Galaktosidase erzielt werden konnten. Um auszuschließen, dass die ausbleibende Prodigiosin-Produktion in *R. capsulatus* auf den Integrationsort des IVAC-Transposons zurückzuführen ist, wurden im Folgenden verschiedene weitere *R. capsulatus*-Expressionsstämme, die sich durch den Integrationsort des IVAC-Transposons unterschieden, auf die Produktion von Prodigiosin getestet. Dieser Versuch führte jedoch auch zu keinem positiven Ergebnis. In dem heterologen Wirtsstamm *R. capsulatus* konnte die IVAC-vermittelte Synthese von Prodigiosin nicht nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis kann verschiedene Ursachen haben. Entweder war die Synthese von Prodigiosin in dem heterologen Bakterienstamm *R. capsulatus* so gering, dass der Prodigiosin-spezifische Peak von den Carotinoid-Peaks überlagert wurde oder es wurde kein Prodigiosin in *R. capsulatus* produziert. Mit einer massenspektrometrischen Analyse könnte Prodigiosin spezifisch nachgewiesen werden. Eine ausbleibende Synthese könnte darauf zurückgeführt werden, dass *R. capsulatus* bestimmte Vorstufen oder Bedingungen für die erfolgreiche Synthese von Prodigiosin nicht zur Verfügung stellt.

Die IVAC-vermittelte Produktion von Prodigiosin in dem heterologen Wirt *R. capsulatus* war nicht erfolgreich. Die *pig*-Gene konnte zwar durch Konjugation und Transposition stabil in das Genom von *R. capsulatus* integriert und die T7 RNA-Polymerase abhängige Transkription aller Gene des Klusters mittels RT-PCR bestätigt werden, die Synthese von Prodigiosin konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

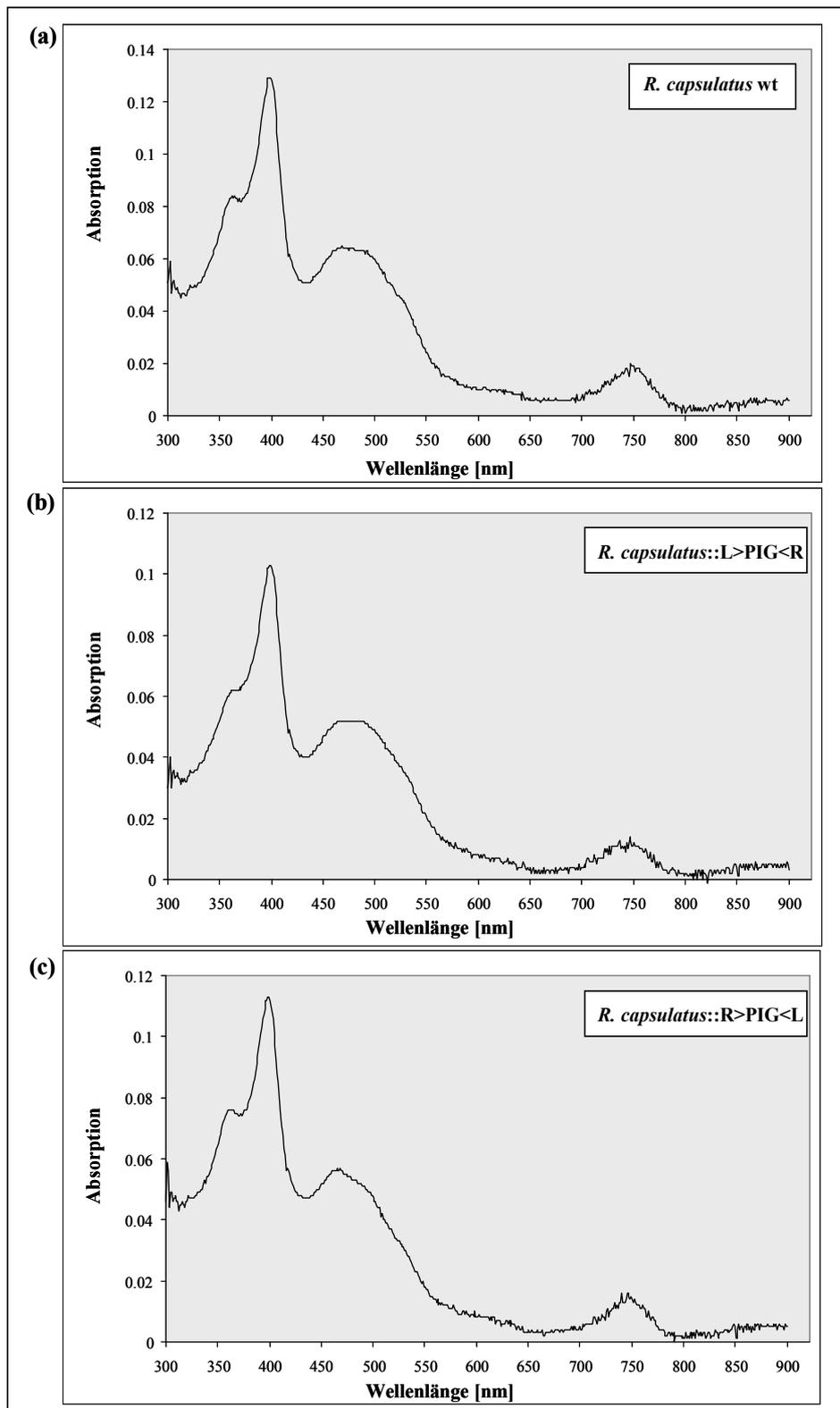


Abb. 3.29: Überprüfung der Prodigiosin-Produktion in dem heterologen Bakterienstamm *R. capsulatus*. Zur Überprüfung der Synthese von Prodigiosin in dem heterologen Wirt *R. capsulatus* wurden Absorptionsspektren des (a) *R. capsulatus* Wildtypstamms B10S und der Expressionsstämme (b) *R. capsulatus::L>PIG<R* und (c) *R. capsulatus::R>PIG<L* gemessen. Die verschiedenen Stämme wurden unter aeroben Bedingungen kultiviert. Die Induktion der Gene des *pig*-Klusters erfolgte durch die Zugabe von 8 mM Fruktose. Die Kulturen wurden μ N bei 30°C inkubiert. Für die Messung der Absorptionsspektren wurden die Testkulturen auf eine identische O.D.₆₆₀ = 1 eingestellt und das Pigment mit acidifiziertem Ethanol (4 % 1M HCl) aus den Zellen extrahiert. Nach der Zentrifugation wurde die Absorption des Überstandes in dem Wellenlängenbereich von 300 nm bis 900 nm gemessen.

3.5.4 Die IVAC-abhängige Synthese von Prodigiosin in dem heterologen Bakterienstamm *P. putida*

Die IVAC-abhängige Expression des Prodigiosin-Genklusters führte in den heterologen Wirten *E. coli* und *R. capsulatus* zu stark abweichenden Ergebnissen. Um die Produktion von Prodigiosin mit Hilfe des IVAC-Expressionssystems in einem weiteren heterologen Bakterienstamm zu testen, wurde das Gram-negative Bakterium *P. putida* ausgewählt. Aufgrund eines komplexen Stoffwechsels und der molekulargenetisch einfachen Handhabung ist *P. putida* ein etablierter Expressionsstamm.

Für die IVAC-abhängige Produktion von Prodigiosin in dem heterologen Wirtsstamm *P. putida* wurde zunächst der für die Konjugation optimierte Donorstamm *E. coli* S17-1 mit den Plasmiden pL>PIG<R und pR>PIG<L, in denen sowohl die IVAC-Kassetten als auch der *pig*-Kluster vorlagen, transformiert (2.13). Durch Konjugation und anschließende Transposition (2.14.1) wurden die *pig*-Gene zusammen mit den IVAC-Kassetten stabil in das Genom des neuen heterologen Wirtes *P. putida* integriert. Die erfolgreiche Transposition wurde durch Selektion auf das Antibiotikum Gentamycin bestätigt und die Transpositionsraten des rekombinanten IVAC-Transposons wurden bestimmt. Die gemessenen Transpositionsraten lagen bei $6,4 \times 10^{-5}$ ($\pm 3,0 \times 10^{-5}$). Im Vergleich zu der Transpositionsrate des natürlichen Transposons Tn5 ($6,5 \times 10^{-5}$; Naumann & Reznikoff, 2002) und der IVAC-vermittelten Transposition des *lac*-Operons ($6,5 \times 10^{-5} \pm 2,6 \times 10^{-5}$) war die Transposition des rekombinanten IVAC-Transposons sehr erfolgreich. Im Folgenden werden die konstruierten Expressionsstämme als *P. putida*::L>PIG<R bzw. *P. putida*::R>PIG<L bezeichnet. Da anhand der heterologen Expression des *lac*-Operons bereits gezeigt werden konnte, dass der Integrationsort des rekombinanten IVAC-Transposons einen Einfluss auf die Synthese des Zielproteins hat, wurden verschiedene *P. putida*-Expressionsstämme auf die Produktion von Prodigiosin getestet. Entsprechend den früheren Versuchen wurden nur geringe Schwankungen in der Expression der Zielgene beobachtet. Darum werden im Folgenden nur die Ergebnisse von einem Expressionsstamm dargestellt.

Da *P. putida* kein T7 RNA-Polymerase-Gen besitzt, wurde für die T7 RNA-Polymerase abhängige Expression des *pig*-Klusters zusätzlich das Plasmid pML5-T7 durch Konjugation (2.14.1) in die entsprechenden *P. putida*-Expressionsstämme übertragen. In dem Plasmid pML5-T7 liegt das T7 RNA-Polymerase-Gen unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors vor und die Expression des T7 RNA-Polymerase-Gens kann durch die Zugabe von IPTG induziert werden. Die *P. putida*-Expressionsstämme wurden über Nacht bei 30°C in LB-

Medium (2.5.1) angezogen. Beim Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase ($O.D._{580} = 0,5$) wurde in den Kulturen die Expression der T7 RNA-Polymerase durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Als Kontrollen dienten der *P. putida* Wildtyp, die *P. putida*-Expressionsstämme, die unter uninduzierten Bedingungen kultiviert wurden, sowie die *P. putida*-Stämme mit integriertem IVAC-Transposon, aber ohne das Plasmid pML5-T7.

Nach der Inkubation waren bereits Unterschiede in der Färbung der einzelnen *P. putida*-Stämme sichtbar, die auf eine Synthese von Prodigiosin hindeuten. Erwartungsgemäß zeigten der *P. putida* Wildtyp sowie die *P. putida* Expressionsstämme *P. putida*::L>PIG<R und *P. putida*::R>PIG<L ohne das T7 RNA-Polymerase-Gen tragende Plasmid pML5-T7 keine veränderte Pigmentierung, die auf eine Expression des roten Pigments Prodigiosin hinweisen könnte (Abb. 3.30a, b). Der *P. putida*-Stamm *P. putida*::R>PIG<L, dem durch Konjugation das Plasmid pML5-T7 mit dem T7 RNA-Polymerase-Gen übertragen worden war, wies jedoch unter induzierten Bedingungen eine deutliche rote Pigmentierung auf (Abb. 3.30a). Unter uninduzierten Bedingungen war kein Farbunterschied der Kulturen zu dem *P. putida* Wildtyp erkennbar (Abb. 3.30a).

Die *P. putida*::L>PIG<R-Stämme zeigten dagegen sowohl unter induzierten als auch unter uninduzierten Bedingungen eine Farbveränderung gegenüber dem Wildtyp. Die fehlende IPTG-Zugabe zur Induktion der T7 RNA-Polymerase führte sogar zu einer verstärkten Rotfärbung der Kolonien (Abb. 3.30b).

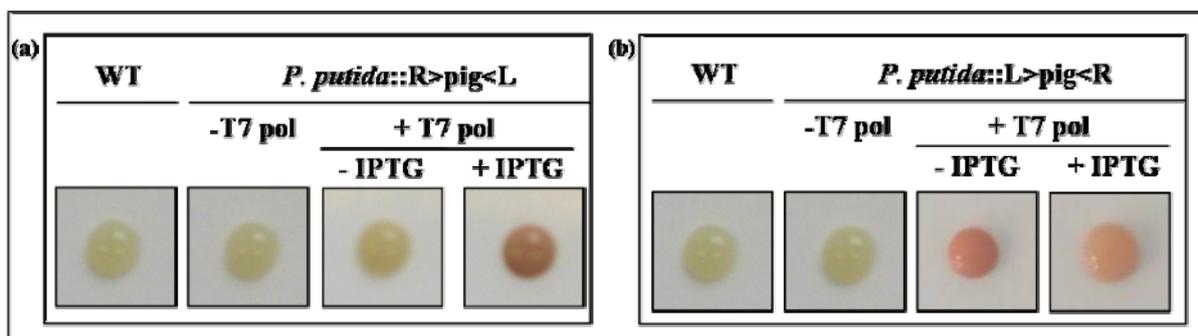


Abb. 3.30: Die heterologe Synthese von Prodigiosin in *P. putida*. Die *P. putida*-Stämme *P. putida*::R>PIG<L und *P. putida*::L>PIG<R, in denen das Plasmid pML5-T7 (+T7pol) bzw. das Plasmid pML5 (-T7pol) vorlagen, und der *P. putida* Wildtypstamm KT2440 (WT) wurden μ N bei 30°C inkubiert. Die Expression der Zielgene wurde durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert (+ IPTG). Als Kontrollen dienten Kulturen, die nicht induziert wurden (- IPTG). Nach der Inkubation der verschiedenen Kulturen wurden unterschiedliche Färbungen der Zellen beobachtet.

Um zu überprüfen, ob alle Gene des *pig*-Genklusters in dem heterologen Wirt *P. putida* abhängig von der T7 RNA-Polymerase, jedoch unabhängig von ihrer Orientierung und Entfernung vom T7-Promotor transkribiert worden waren, wurde eine RT-PCR (2.11) durchgeführt. Dazu wurden die *P. putida*-Expressionsstämme *P. putida*::R>PIG<L und *P.*

putida::L>PIG<R, die unter induzierten Bedingungen kultiviert worden waren, sowie die entsprechenden Expressionsstämme ohne das Plasmid pML5-T7 und der *P. putida* Wildtyp wie beschrieben angezogen. Die Proben für die RT-PCR wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase entnommen und die mRNA der einzelnen Proben wurde isoliert (2.11.1). In der nachfolgenden reversen Transkription (2.11.2) wurde die RNA als *template* für die cDNA-Synthese eingesetzt. Für die cDNA-Synthese wurden Primer, die an die einzelnen *pig*-Gene und *cueR* binden können, verwendet und die synthetisierte cDNA wurde als *template* in der RT-PCR (2.11.3) eingesetzt. Die Transkription der Gene *pigG* und *pigL* konnte nicht analysiert werden, da für diese Gene keine geeigneten Primer synthetisiert werden konnten.

Die Transkription aller *pig*-Gene und des Gens *cueR*, das zu den *pig*-Genen in einer gegensätzlichen Transkriptionsrichtung vorliegt, konnte nur in den Expressionsstämmen *P. putida*::R>PIG<L (Abb. 3.27) und *P. putida*::L>PIG<R (ohne Abb.) mit dem T7 RNA-Polymerase-Gen tragenden Plasmid pML5-T7 nachgewiesen werden. Die Transkriptkonzentrationen der einzelnen Gene lagen zwischen 0,03 ng (*pigC*) und 0,4 ng (*pigF*) Dabei hatte weder die Orientierung der Gene noch die Entfernung der Gene vom T7-Promotor einen Einfluss auf ihre Transkription. Wie erwartet wurde in den Expressionsstämmen ohne die T7 RNA-Polymerase und in dem *P. putida* Wildtyp kein Transkript der *pig*-Gene detektiert. Die Ergebnisse der RT-PCR verdeutlichen, dass in dem heterologen Wirtstamm *P. putida* mit dem IVAC-Expressionssystem alle Gene des *pig*-Klusters abhängig von der T7 RNA-Polymerase transkribiert werden konnten. Die Orientierung der Gene in dem Cluster hatte dabei keinen Einfluss auf die Transkription.

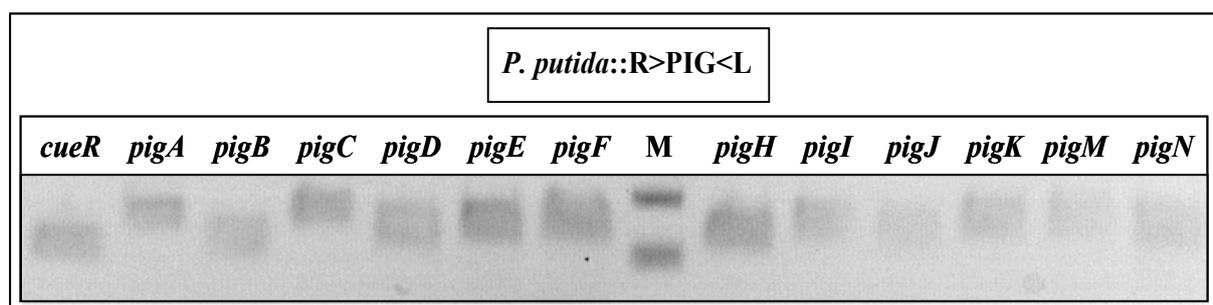


Abb. 3.31: Nachweis der Transkription des *pig*-Klusters in dem heterologen Wirt *P. putida*::R>PIG<L. Durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression aller Gene des *pig*-Klusters in dem heterologen Expressionsstamm induziert. Die Proben für die RT-PCR wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Kulturen ($O.D._{580} = 1$) entnommen und die mRNA der verschiedenen Stämme wurde isoliert. Jeweils 150 ng der isolierten RNA wurden in der darauffolgenden reversen Transkription als *template* eingesetzt. Durch den Einsatz der spezifischen Primer in der reversen Transkription konnte die Transkription der *pig*-Gene nachgewiesen werden. Von jedem RT-PCR-Ansatz wurden 5 μ l auf ein Agarosegel aufgetragen. M: Marker.

Die vollständige Transkription des Prodigiosin-Genklusters führt jedoch nicht zwangsläufig zu der erfolgreichen Synthese von Prodigiosin. In dem heterologen Bakterienstamm *R. capsulatus* konnte zwar erfolgreich die Transkription der *pig*-Gene nachgewiesen werden, die Produktion von Prodigiosin konnte jedoch nicht bestätigt werden (3.5.3). Die Biosynthese von Prodigiosin verläuft über zahlreiche Schritte, an denen jeweils ein Pig-Enzym beteiligt ist. Für die erfolgreiche Synthese von Prodigiosin müssen diese Enzyme funktionell in der Zelle vorliegen und die Vorstufen der Prodigiosin-Biosynthese müssen bereitgestellt werden. Wird auch nur ein Enzym nicht funktionell synthetisiert, bricht der Prodigiosin-Biosyntheseweg vorzeitig ab und Prodigiosin wird nicht gebildet. Zur Identifizierung des synthetisierten Pigments in den *P. putida*-Expressionsstämmen wurden Absorptionsspektren (2.21) der Kulturen gemessen. Dazu wurden die Stämme *P. putida*::R>PIG<L und *P. putida*::L>PIG<R, in denen das Plasmid pML5-T7 mit dem T7 RNA-Polymerase-Gen vorlag, sowohl unter induzierten als auch uninduzierten Bedingungen angezogen. Für die Induktion der Expression der Zielgene wurde 0,5 mM IPTG verwendet. Als Negativkontrollen dienten der *P. putida* Wildtypstamm und die *P. putida*-Stämme, die das IVAC-Transposon enthielten und mit dem Leervektor pML5 transformiert worden waren. Wie erwartet wiesen sowohl das Absorptionsspektrum des *P. putida* Wildtyp als auch die Spektren der Expressionsstämme *P. putida*::R>PIG<L und *P. putida*::L>PIG<R ohne das T7 RNA-Polymerase tragende Plasmid pML5-T7 keinen Peak bei 534 nm auf (ohne Abb.).

In Abbildung 3.32 a sind die Absorptionsspektren des Expressionsstammes *P. putida*::R>PIG<L unter induzierten und uninduzierten Bedingungen dargestellt. Wie bereits die Pigmentierung der Zellen angedeutet hat, wird Prodigiosin in dem Stamm *P. putida*::R>PIG<L erst nach der Induktion der T7 RNA-Polymerase erfolgreich synthetisiert. Im Gegensatz zu den uninduzierten Kulturen konnte der spezifische Peak bei 534 nm detektiert werden (Abb. 3.32a). Zusätzlich zu dem für Prodigiosin spezifische Peak bei 534 nm wurde in den Kulturen, die induziert worden waren, ein Peak bei 363 nm nachgewiesen (Abb. 3.32a). Dieser Peak wird durch die Absorption der Bipyrrrol-Vorstufe 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd (MBC) von Prodigiosin hervorgerufen. Die Prodigiosin-Vorstufe MBC besitzt ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 363 nm (Wasserman *et al.*, 1966). Die Vorstufe 2-Methyl-3-n-amylyl-pyrrol (MAP), die im letzten Biosynthese-Schritt von Prodigiosin mit MBC zu Prodigiosin kondensiert wird, konnte aufgrund ihrer Flüchtigkeit (Kim *et al.*, 2007) nicht detektiert werden. Die Kulturen, die nicht induziert worden waren, wiesen einen Peak bei 400 nm auf. Dieser Peak ist auf das von *P. putida* produzierte Siderophor Pyoverdin mit einem Absorptionsmaximum bei 400 nm (Koh *et al.*, 1995)

zurückzuführen. Der Absorptionspeak von Pyoverdin wird in den induzierten *P. putida*-Expressionsstämmen wahrscheinlich durch die Absorption der Bipyrrrol-Vorstufe überlagert. Abbildung 3.32b zeigt die Absorptionsspektren des heterologen Wirtsstamms *P. putida*::L>PIG<R unter induzierten und nicht-induzierten Bedingungen. Im Gegensatz zu dem Expressionsstamm *P. putida*::R>PIG<L ist Prodigiosin auch ohne Zugabe von IPTG zur Induktion der T7 RNA-Polymerase nachweisbar (Abb. 3.32b). Die Zugabe von IPTG zur Induktion der T7 RNA-Polymerase führt ebenso zu einer erfolgreichen, jedoch reduzierten, Synthese von Prodigiosin (Abb. 3.32b). Unter induzierten Bedingungen nahm die Absorption um 63 % ab. Entsprechend den Ergebnissen der heterologen Expression des *lac*-Operons in *P. putida* ist die L-IVAC-vermittelte Expression des Zielproteins unter uninduzierten Bedingungen verstärkt. Dieses Ergebnis wird in Abschnitt 4.4.1 diskutiert.

Die Absorptionsspektren des Stammes *P. putida*::L>PIG<R wiesen sowohl unter induzierten als auch unter uninduzierten Bedingungen einen Peak bei 363 nm auf, der auf die Absorption der Prodigiosin-Vorstufe MAP zurückzuführen ist.

In beiden Expressionsstämmen konnte somit die erfolgreiche Synthese von Prodigiosin detektiert werden. Im Gegensatz zu dem heterologen Wirt *E. coli* war die Prodigiosin-Synthese nicht vollständig abgelaufen und es konnte zusätzlich zu Prodigiosin eine Vorstufe von Prodigiosin nachgewiesen werden. Eine verlängerte Inkubation der *P. putida*-Expressionsstämme führte jedoch auch zu keiner vollständigen Umsetzung der Prodigiosin-Vorstufen.

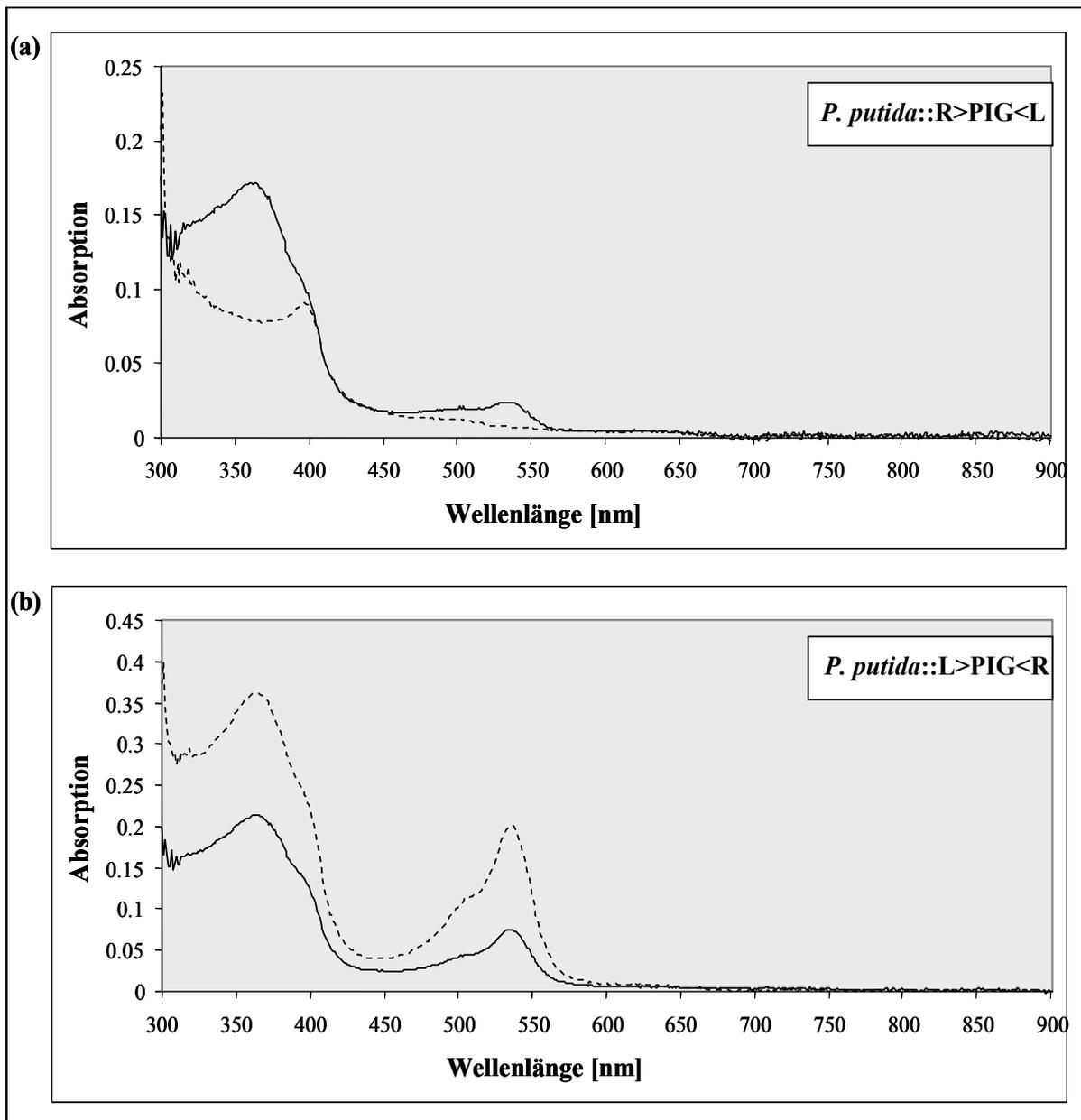
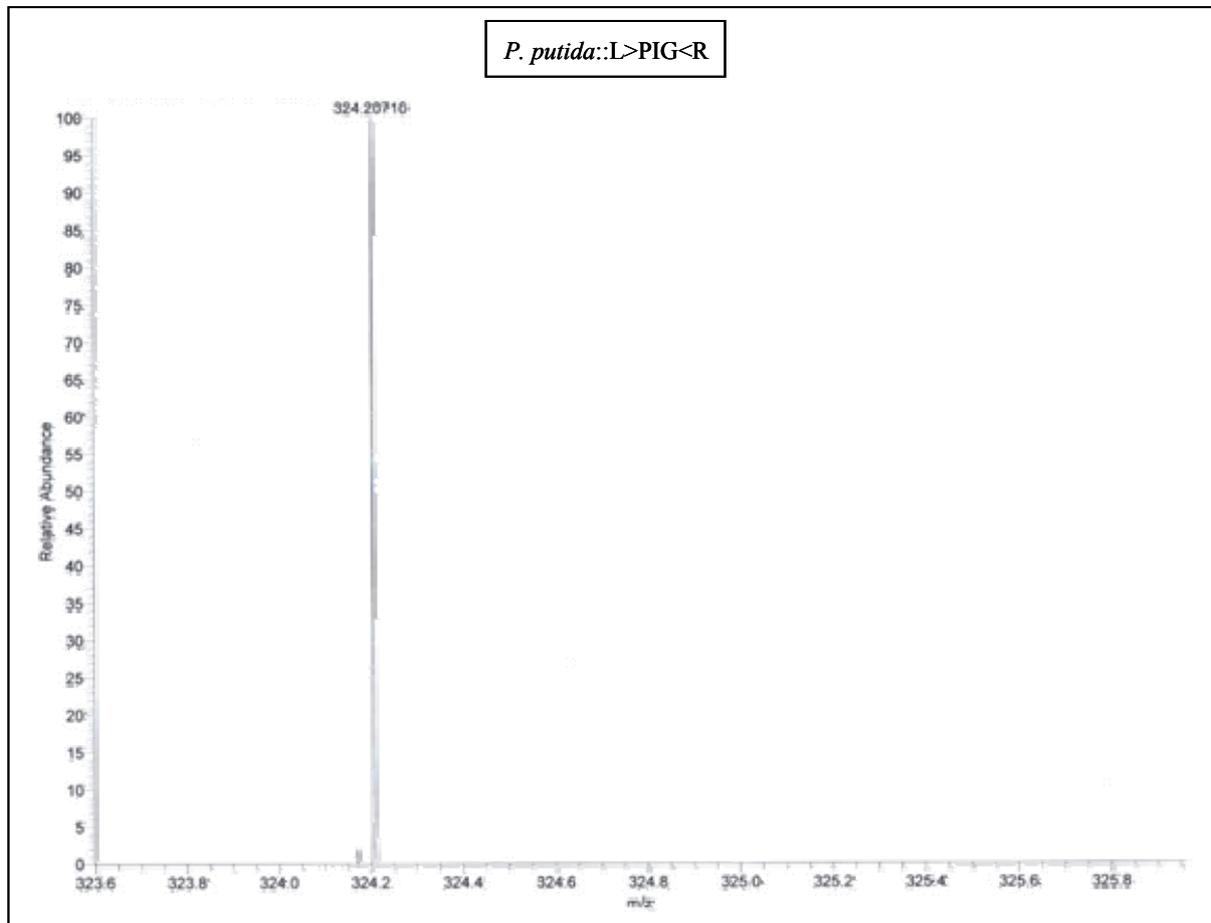


Abb. 3.32: Nachweis der Prodigiosin-Synthese in dem heterologen Bakterienstamm *P. putida*. Der Nachweis der Synthese von Prodigiosin in dem heterologen Wirtstamm *P. putida* erfolgte mit der Messung von Absorptionsspektren. Dazu wurden die Expressionsstämme (a) *P. putida*::R>PIG<L und (b) *P. putida*::L>PIG<R unter induzierten Bedingungen (durchgezogene Linie) bzw. uninduzierten Bedingungen (gestrichelte Linie) angezogen. Die Induktion der Gene des *pig*-Klusters erfolgte durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG. Die Kulturen wurden $\bar{u}N$ bei 30°C inkubiert. Für die Messung der Absorptionsspektren wurden die Testkulturen auf eine identische $O.D._{580} = 1$ eingestellt und das Pigment mit acidifiziertem Ethanol (4 % 1M HCl) aus den Zellen extrahiert. Nach der Zentrifugation wurde die Absorption des Überstandes in dem Wellenlängenbereich von 300 nm bis 900 nm gemessen. Es wurden Messungen mit drei unabhängigen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichung der Messungen lag unter 10 %.

Die Prodigiosin-Produktion in *P. putida* wurde zusätzlich mit ESI-Massenspektrometrie analysiert. Dafür wurde der Stamm *P. putida*::L>PIG<R, der unter induzierten Bedingungen kultiviert worden war, verwendet. Die theoretische exakte Masse von Prodigiosin ($C_{20}H_{25}N_3O$) beträgt 324,20704 (Montaner & Pérez-Thomás, 2001; Song *et al.*, 2005). In Abbildung 3.33 ist das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse dargestellt. Mittels

ESI-MS wurde Prodigiosin mit einem Molekulargewicht von 324,20710 Da nachgewiesen. Die Genauigkeit der Messung betrug $1\text{ppm} \pm 0,32\text{ kDa}$.



3.33: Ergebnis der ESI-Massenspektrometrie zum Nachweis der Prodigiosin-Synthese in dem heterologen Bakterienstamm *P. putida*. Für die massenspektrometrische Analyse wurde der Stamm *P. putida::L>PIG<R* in 30°C inkubiert. Durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die Expression aller Gene des *pig*-Klusters induziert. Prodigiosin wurde aus der Kultur mit acidifiziertem Ethanol (4% 1M Essigsäure) extrahiert. Die massenspektrometrische Analyse des Extraktes wurde mit einem Massenspektrometer LTQ FS Ultra (Thermo Fisher) durchgeführt

Um die Prodigiosin-Synthese in den verschiedenen *P. putida*-Expressionsstämmen mit der Prodigiosin-Produktion in dem natürlichen Produzenten *S. marcescens* vergleichen zu können, wurde die relative Prodigiosin-Konzentration pro Zelle mit folgender Formel bestimmt: $([A_{534} / \text{O.D.}_{580}] \times 50)$ (2.22). Die *P. putida*-Expressionsstämme wurden wie beschrieben angezogen. Als Kontrollen dienten der *P. putida* Wildtyp, die Expressionsstämme mit dem Leervektor pML5 und uninduzierte Kulturen. In *S. marcescens* wurde eine relative Prodigiosin-Konzentration von 1,7 pro Zelle nachgewiesen, während der *P. putida* Wildtyp wie erwartet keine Prodigiosin-Produktion aufwies (Abb. 3.34). Im Gegensatz zu vorhergegangenen Analysen, u. a. der RT-PCR und der Messung von Absorptionsspektren, wurde in den *P. putida*-Expressionsstämmen *P. putida::R>PIG<L* und

P. putida::L>PIG<R ohne das Plasmid pML5-T7 eine geringe Expression von Prodigiosin festgestellt. Es wurde eine relative Prodigiosin-Konzentration von maximal 0,8 pro Zelle nachgewiesen (Abb. 3.34). Aufgrund der nur sehr geringen Prodigiosin-Produktion in diesen Stämmen waren sowohl die Transkription der *pig*-Gene als auch die Synthese von Prodigiosin mittels RT-PCR und Absorptionsspektren nicht nachweisbar.

Der heterologe Wirt *P. putida*::R>PIG<L, der mit Plasmid pML5-T7 transformiert worden war, zeigte nach der Induktion der T7 RNA-Polymerase einen deutlichen Anstieg der relativen Prodigiosin-Konzentration. Im Vergleich zu den uninduzierten Kulturen wurde die Prodigiosin-Produktion 3,5-fach erhöht. Mit Hilfe des IVAC-Expressionssystem konnte, mit einer relativen Prodigiosin-Konzentration von 2,2 pro Zelle, die Synthese von Prodigiosin im Vergleich zum natürlichen Produktionsstamm *S. marcescens* um den Faktor 1,3 gesteigert werden (Abb. 3.34).

Die entgegengesetzte Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem *pig*-Kluster führte zu abweichenden Ergebnissen. Ohne die Zugabe des Induktors IPTG wurde bereits eine Prodigiosin-Konzentration von 5,0 erreicht. Das entspricht einer 2,9-fachen Steigerung der Prodigiosin-Produktion im Vergleich zu dem natürlichen Produzenten *S. marcescens*. Entsprechend früheren Untersuchungen führte die Zugabe von IPTG zu einer verminderten Produktion des Zielproteins. Es wurde nur eine Prodigiosin-Konzentration von 4,2 nachgewiesen. Somit wurde durch die Induktion die Synthese von Prodigiosin im Vergleich zu den uninduzierten Kulturen um 16% reduziert. Im Vergleich zu *S. marcescens* konnte jedoch auch unter induzierten Bedingungen eine Zunahme der Produktion erreicht werden. Die Prodigiosin-Produktion wurde im Vergleich zu dem natürlichen Produzenten um den Faktor 2,4 erhöht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit dem IVAC-Expressionssystem Prodigiosin erfolgreich in verschiedenen Gram-negativen Bakterienstämmen synthetisiert werden konnte. Abhängig von dem heterologen Bakterienstamm wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt: (a) in dem heterologen Wirt *R. capsulatus* konnte nur die Transkription aller Gene des *pig*-Klusters nachgewiesen werden, die Synthese von Prodigiosin jedoch nicht, (b) mit *E. coli* als heterologem Bakterienstamm konnte Prodigiosin, abhängig von der Orientierung der IVAC-Kassetten, erfolgreich hergestellt werden und (c) in *P. putida* führten beide Orientierungen der IVAC-Kassetten zu dem *pig*-Kluster zu einer erfolgreichen Prodigiosin-Synthese. Die höchste Prodigiosin-Konzentration wurde mit *E. coli* erzielt. Im Vergleich zu der maximalen Prodigiosin-Ausbeute in *P. putida* wurde eine dreifache Erhöhung der Prodigiosin-Konzentration in *E. coli* beobachtet.

Diese Ergebnisse belegen, dass sich verschiedene Bakterienstämme unterschiedlich gut für die heterologe Synthese eines bestimmten Zielproteins eignen. Um eine möglichst hohe Ausbeute des gewünschten Produktes zu erhalten, ist es somit sinnvoll, die Expression von Genen in verschiedenen Wirtstämmen durchzuführen. Das neue IVAC-Expressionssystem gewährleistet die unkomplizierte Integration und funktionelle Expression zahlreicher Gene in verschiedenen Bakterienstämmen.

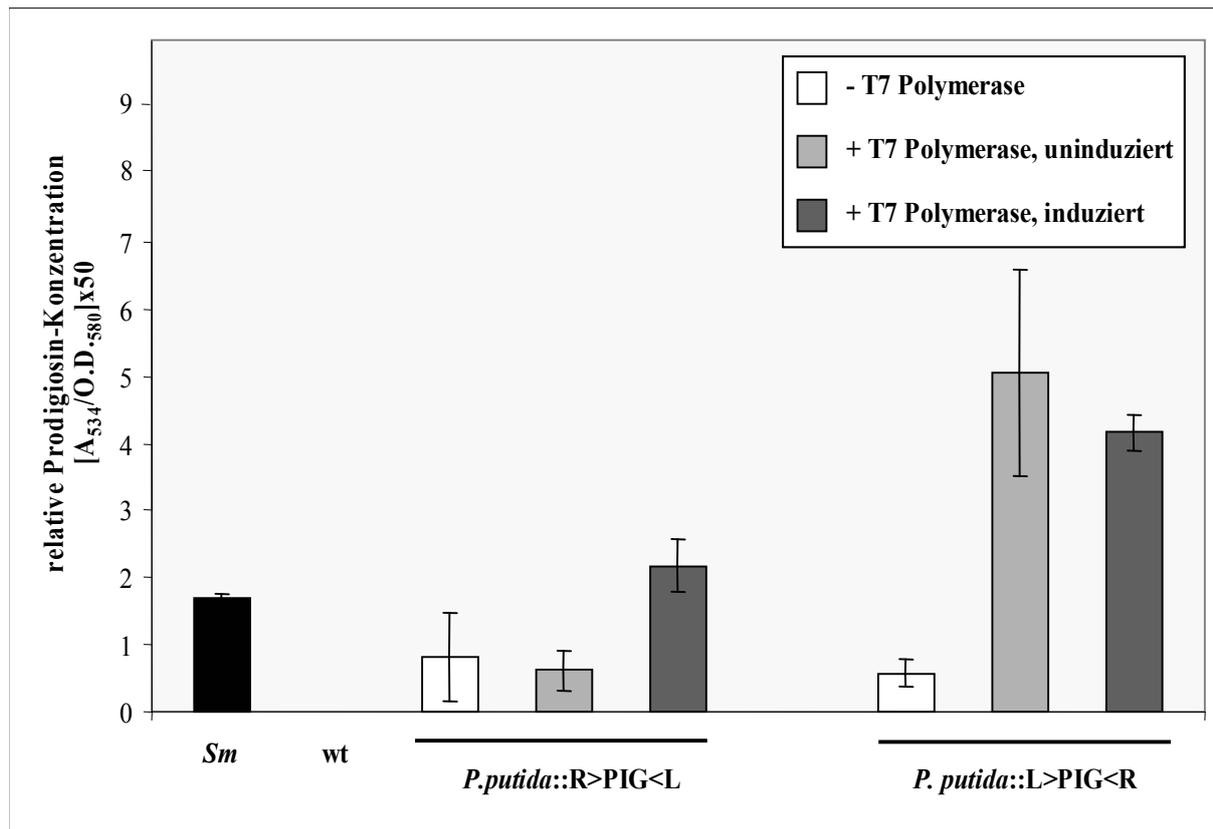


Abb. 3.34: Vergleich der relativen Prodigiosin-Produktion in *S. marcescens* (*Sm*) mit der Produktion von Prodigiosin in dem heterologen Wirt *P. putida*. Für die Bestimmung der relativen Prodigiosin-Produktion wurde *S. marcescens* (*Sm*) und die heterologen Bakterienstämme *P. putida*::R>PIG<L und *P. putida*::L>PIG<R in bei 30°C angezogen. Durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die Expression der *pig*-Gene induziert (+ T7 Polymerase, induziert). Als Kontrollen dienten der *P. putida* Wildtypstamm KT2440 (wt) sowie die *P. putida*-Expressionsstämme, die ohne Induktion der Expression der Zielgene angezogen wurden (+ T7 Polymerase, uninduziert) bzw. ohne das Plasmid pML5-T7 vorlagen (- T7 Polymerase). Mit acidifiziertem Ethanol (4 % 1M HCl) wurde Prodigiosin aus den Zellen extrahiert. Die Absorption des Überstandes wurde bei 534 nm gemessen und die Prodigiosin-Konzentration mit folgender Formel bestimmt: $[A_{534}/OD_{580}] \times 50$. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Mit dem IVAC-Expressionssystem konnte Prodigiosin erfolgreich in dem heterologen Wirtstamm *P. putida* synthetisiert werden. Die Biosynthese von Prodigiosin wurde mittels RT-PCR, Absorptionsmessungen und Massenspektrometrie bestätigt und übertraf die Produktion von Prodigiosin in dem natürlichen Produktionsstamm *S. marcescens*.

4. Diskussion

4.1 Das IVAC-Expressionssystem

Das Ziel des IVAC-Expressionssystems ist, eine unkomplizierte Methode im Umgang mit komplexen Genklustern zu etablieren und so die heterologe Expression aller Gene eines Klusters in einem beliebigen Gram-negativen Bakterienstamm zu erreichen. Basierend auf den Erfahrungen, die mit anderen Expressionssystemen gesammelt wurden, wurde das IVAC-Expressionssystem konstruiert.

4.1.1 Die Integration der IVAC-Kassetten neben einem Gencluster

Aufgrund des komplexen Aufbaus großer Gencluster und der sich häufig wiederholenden Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen in langen Genabschnitten ist die molekulargenetische Handhabung von Genclustern erschwert (Fu *et al.*, 2008). So ist auch die Integration der IVAC-Kassetten neben einem zu exprimierenden Gencluster durch gezielte Restriktion und Ligation häufig nicht möglich. Stattdessen können die IVAC-Kassetten durch homologe Rekombination neben dem Gencluster inseriert werden. Die Methode der homologen Rekombination ist der alternative Weg zu Restriktion mit anschließender Ligation. Mittels PCR werden die für die homologe Rekombination benötigten homologen Sequenzen an die IVAC-Kassetten angefügt und die IVAC-Kassetten daraufhin neben dem zu exprimierenden Gencluster sequenzspezifisch integriert. Mit der homologen Rekombination wird die Integration der IVAC-Kassetten unabhängig von Restriktionsschnittstellen und damit auch unabhängig von der Länge des zu flankierenden Genclusters.

Ein anderes Expressionssystem, das auch die homologe Rekombination nutzt, um rekombinante DNA zu generieren, ist das Univektor-Plasmid-Fusion-System (UPS). Das UPS bedient sich der homologen Rekombination, um die Fusion zweier Plasmide zu katalysieren. Bei den Plasmiden handelt es sich um einen Univektor, der Gene von Interesse enthält, und einen Wirtsvektor, der regulatorische Elemente trägt. Durch die Fusion der beiden Plasmide mittels homologer Rekombination können die Gene aus dem Univektor unter die Kontrolle neuer regulatorischer Elemente gestellt werden (Abb. 4.1; Liu *et al.*, 1998; Shigaki *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu dem IVAC-Expressionssystem ist die Übertragung der Gene in einen heterologen Bakterienstamm bei dem UPS aber nicht gewährleistet.

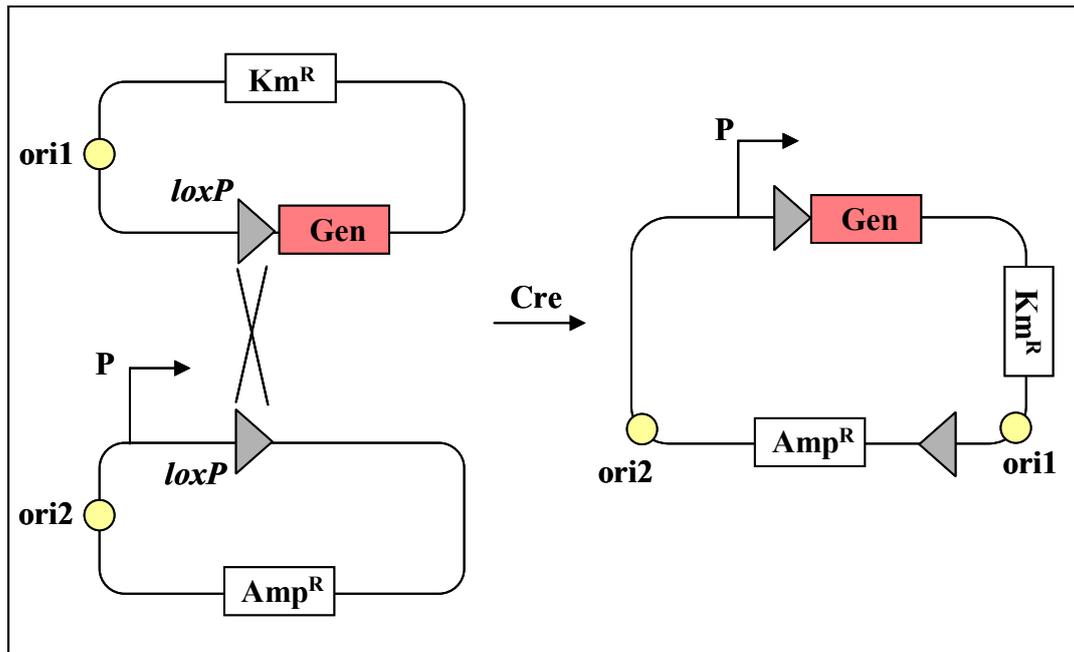


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Univektor-Plasmid-Fusion-Systems (UPS). Die Rekombinase Cre katalysiert die sequenzspezifische Rekombination zwischen den *loxP*-Sequenzen der beiden Vektoren. Die Rekombination führt zu einer Fusion der beiden Plasmide. Das zu exprimierende Gen (rot) kann so unter die Kontrolle neuer regulatorischer Elemente gestellt werden. Km^R = Kanamycinresistenz; Amp^R = Ampicillinresistenz; ori = *origin of replication*; P = Promotor.

4.1.2 Mobilisierung des von den IVAC-Kassetten flankierten Genclusters bei einer Konjugation

Nach der Markierung der zu exprimierenden Gene durch die IVAC-Kassetten wird der neue Expressionsvektor, in dem der Gencluster und die IVAC-Kassetten gemeinsam vorliegen, in einen beliebigen Gram-negativen Bakterienstamm durch Konjugation übertragen. Ein Bestandteil der L-IVAC-Kassette ist der *origin of transfer* (oriT), der den Transfer des zu exprimierenden Genclusters zusammen mit den IVAC-Kassetten in den neuen Expressionsstamm durch Konjugation ermöglicht. Die *tra*-Gene, die für die weiteren Komponenten der Konjugation kodieren, liegen in der chromosomalen DNA des Donorstammes. Für die Übertragung des Vektors wurde die Methode der Konjugation gewählt, da im Gegensatz zur Transformation eine höhere Ausbeute erzielt werden kann.

Ein Beispiel für ein Expressionssystem, das auch mittels Konjugation Gene in einen neuen Wirtsstamm überträgt, ist ein auf Minitransposons basierendes Expressionssystem. Zur heterologen Produktion der Hydrogenase aus *Rhizobium leguminosarum* in alternativen Rhizobien-Stämmen wurde dieses Expressionssystem entwickelt (Báscones *et al.*, 2000). Dafür wurde zunächst der vollständige Hydrogenase-Gencluster aus *R. leguminosarum*, das

aus insgesamt 18 Genen besteht, in einen Vektor kloniert (Hidalgo *et al.*, 1990). Für den Transfer des Genclusters in einen anderen *Rhizobium*-Stamm wurde in dem Vektor eine oriT-Region integriert, welche die Übertragung des Klusters in den Rezipienten durch Konjugation gewährleistet. Die *tra*-Gene sind dagegen in der chromosomalen DNA des Donorstammes lokalisiert. Zusätzlich enthielt der Vektor Transposon-Elemente und wurde deshalb als Minitransposon bezeichnet. Die Aufteilung der für die Konjugation notwendigen Elemente auf die chromosomale DNA des Donorstammes und das zu transferierende Plasmid ermöglichten eine erfolgreiche Übertragung des Hydrogenase-Klusters in den Rezipientenstamm durch Konjugation. Für das IVAC-Expressionssystem wurde der gleiche Aufbau gewählt: die *tra*-Gene befinden sich in der chromosomalen DNA des Donorstammes, der oriT in dem zu transferierenden Plasmid. Im Gegensatz zu dem Minitransposon ist das IVAC-Expressionssystem jedoch für beliebige Gram-negative Bakterienstämme und nicht nur für *Rhizobium* geeignet.

4.1.3 Transfer des Genclusters in die chromosomale DNA des Rezipientenstammes durch Transposition

Um den von den IVAC-Kassetten flankierte Gencluster stabil in dem neuen heterologen Expressionsstamm zu etablieren, wird der Cluster durch Transposition in die chromosomale DNA des Wirtsstammes integriert. Für den Prozess der Transposition werden nur die Transposase, die den Prozess der Transposition katalysiert, und die spezifischen Erkennungssequenzen der Transposase, die das zu transferierende Gen flankieren und als Bindestellen für die Transposase dienen, benötigt (De Lorenzo *et al.*, 1990; Báscones *et al.*, 2000; Reznikoff, 2008). Sowohl das Gen *tnp*, das für die Transposase kodiert, als auch die spezifischen Erkennungssequenzen der Transposase sind Bestandteile der IVAC-Kassetten.

Der Transfer eines Genclusters aus dem Klonierungsvektor in die chromosomale DNA des heterologen Bakterienstammes durch Transposition beinhaltet zwei Vorteile: (a) Die Stabilität, mit der die Gene in der Zelle vorliegen, wird erhöht. Besonders große Vektoren nur liegen instabil in der Zelle vor und können ohne Selektionsdruck schnell verloren gehen (Herrero *et al.*, 1990; Kent *et al.*, 1998). (b) Durch die Übertragung des Genclusters in die chromosomale DNA des neuen Wirtsstammes wird zusätzlich das Problem überwunden, dass sich Expressionsvektoren in der Regel nur in einer begrenzten Gruppe nahe verwandter Bakterienstämme replizieren lassen (*narrow-range* Vektoren). Der Transfer des Genclusters in das Genom gewährleistet die Replikation der Gene in jedem beliebigen Expressionsstamm.

Für die Integration der Gene in die chromosomale DNA des heterologen Wirtes wurde der Mechanismus der Transposition gewählt, da andere Methoden, z. B. die homologe Rekombination oder *random recombination*, weniger effizient als Transposition sind (Fu *et al.*, 2008). Zusätzlich ist der Prozess der Transposition unabhängig von der Größe des zu transferierenden Genklusters. Mit artifiziellen Transposons war es bereits möglich, Genkluster mit einer Größe von 86 kb erfolgreich zu übertragen (Basu *et al.*, 2005).

Auch andere Expressionssysteme nutzen Transposition, um wirtsfremde Gene stabil im Genom eines heterologen Bakterienstammes zu integrieren. So wurde z. B. der Epothilon-Gencluster (*epo*) aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* durch Transposition in die chromosomale DNA des neuen heterologen Wirtsstammes *Myxococcus xanthus* integriert (Fu *et al.*, 2008). Der *epo*-Gencluster besitzt eine Größe von 58 kb (Molnar *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000). Mittels Red/ET-Rekombination wurde zunächst der vollständige Cluster in einem Plasmid integriert. Durch weitere Red/ET-Rekombinations-Schritte wurden zusätzlich ein wirtsspezifischer Promotor, ein *origin of transfer*, Transpositions-Elemente und ein Selektionsmarker eingefügt. Das konstruierte Plasmid wurde in den heterologen Bakterienstamm *M. xanthus* durch Konjugation übertragen, mittels Transposition in die chromosomale DNA inseriert und schließlich erfolgreich exprimiert. Im Gegensatz zu dem IVAC-Expressionssystem sind hier jedoch zahlreiche Rekombinations-Schritte notwendig, um den vollständigen Vektor zu erhalten. Die IVAC-Kassetten können dagegen in nur einem Schritt durch homologe Rekombination in dem Vektor, in dem der zu exprimierende Gencluster lokalisiert ist, integriert werden. Zusätzlich können die Gene eines Genclusters mit Hilfe des IVAC-Expressionssystems in einem breiten Wirtsspektrum exprimiert werden. Durch die Integration eines wirtsspezifischen Promotors konnten die Gene des Epothilon-Genclusters nur in *M. xanthus* exprimiert werden. Um die Expression der *epo*-Gene auch in dem heterologen Bakterienstamm *P. putida* zu erreichen, musste der Promotor durch weitere Rekombinationsschritte wieder ausgetauscht werden (Fu *et al.*, 2008).

4.1.4 Die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression des Genklusters

Um schließlich die Expression aller Gene in jedem beliebigen Expressionsstamm zu erreichen, wurde in beiden IVAC-Kassetten je ein T7 RNA-Polymerase-abhängiger Promotor integriert. Die IVAC-Kassetten werden so zu den zu exprimierenden Genen angeordnet, dass die T7-Promotoren gegensätzlich orientiert sind und die Expression aller Gene, unabhängig von ihrer Transkriptionsrichtung, erlauben. Da die T7 RNA-Polymerase aus nur einer Untereinheit besteht, keine zusätzlichen Kofaktoren benötigt und eine hohe Prozessivität aufweist, wird die T7 RNA-Polymerase in Expressionssystemen häufig eingesetzt (Studier & Moffatt, 1986; Terpe, 2006).

So wurde z. B. ein T7-Expressionssystem für das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* entwickelt (Brunschwig & Darzins, 1992). Durch Transposition wurde zunächst das T7 RNA-Polymerase-Gen, unter Kontrolle des *lacUV*-Promotors, stabil in das Genom von *P. aeruginosa* integriert. Das ebenfalls in dem Chromosom integrierte Gen für den lacI^{q} -Repressor verhindert im nicht-induzierten Zustand die Bildung der T7 RNA-Polymerase. Durch die Zugabe von IPTG wird die Synthese der T7 RNA-Polymerase induziert. Um die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression von Genen in *P. aeruginosa* zu ermöglichen, wurden zusätzlich *broad-host-range* Vektoren, bestehend aus einer *multiple-cloning-site* (MCS), einem T7 RNA-Polymerase-abhängigen Promotor und T7-Transkriptionsterminatoren, konstruiert. Es konnte u. a. am Beispiel der Lipase gezeigt werden, dass mit diesem T7-Expressionssystem hohe Proteinausbeuten erzielt werden können (Schneidinger, 1997).

Die in den Abschnitten 4.1.1 bis 4.1.4 beschriebenen Expressionssysteme werden in der Abbildung 4.2 schematisch dargestellt. Durch das Univektor-Plasmid-Fusion-System wurde eine Methode entwickelt, mit der die schnelle Konstruktion von Plasmiden möglich wird (4.2a). Die Übertragung der rekombinanten Plasmide in heterologe Bakterienstämme ist jedoch nicht gewährleistet. Die Expressionssysteme, die für die heterologe Produktion der Hydrogenase (4.2b) und von Epothilon (4.2c) entwickelt wurden, und das T7-Expressionssystem in *P. aeruginosa* (4.2d) eignen sich jeweils nur für einen spezifischen heterologen Wirtstamm. Im Gegensatz zu den genannten Expressionssystemen wurde das IVAC-Expressionssystem konstruiert, um die koordinierte Expression zahlreicher Gene eines Klusters, unabhängig von ihrer Transkriptionsrichtung und natürlichen Promotoren, in einem breiten Wirtsspektrum zu ermöglichen (4.2e). Im Folgenden werden die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Doktorarbeit mit dem IVAC-Expressionssystem erzielt wurden, diskutiert.

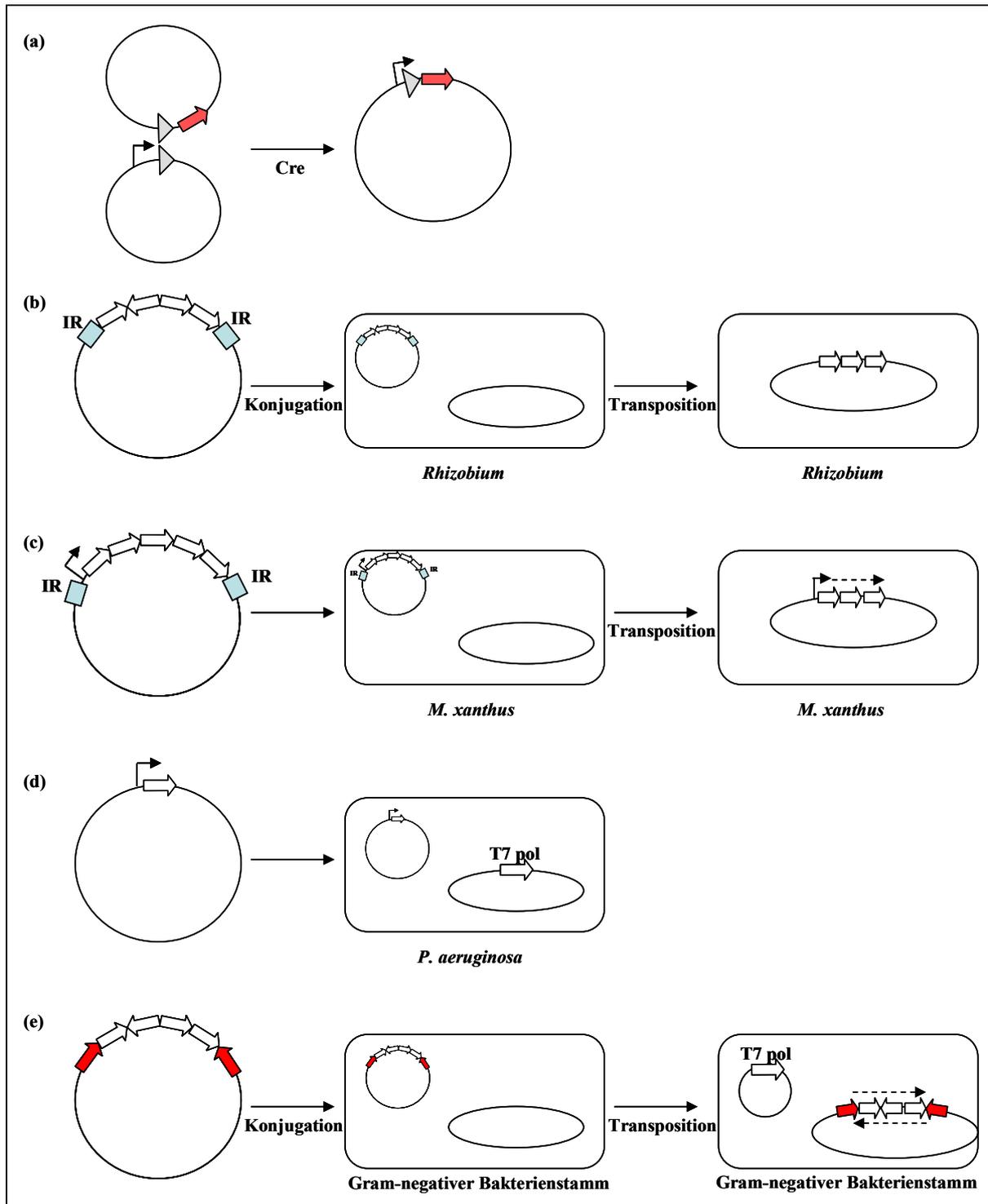


Abb. 4.2: Schematische Übersicht über fünf Expressionssysteme. (a) Das UPS bedient sich der homologen Rekombination, um die Fusion zweier Plasmide zu katalysieren. Dadurch wird eine schnelle Konstruktion neuer Plasmide erreicht, die Übertragung der Plasmide in den neuen Wirt ist jedoch nicht gewährleistet. (b) Bei dem auf Minitransponsons basierenden Expressionssystem liegt der Hydrogenase-Gencluster auf einem Plasmid vor. Der Transfer in andere *Rhizobien*-Stämme erfolgt durch Konjugation, die Integration in die chromosomale DNA durch Transposition. (c) Durch die Integration eines Promotors und von Transposon-Elementen in den Vektor, in dem der vollständige Epothilon-Kluster vorlag, konnten die *epo*-Gene durch Konjugation und Transposition in das Genom von *M. xanthus* übertragen werden. (d) Durch die Konstruktion eines T7-Expressionssystems in *P. aeruginosa* können Gene abhängig von der T7 RNA-Polymerase exprimiert werden. (e) Mit Hilfe des neuen IVAC-Systems wird es erstmals möglich (1.) große Gencluster durch die Integration der IVAC-Kassetten zu markieren, (2.) den markierten Abschnitt mittels Konjugation in einen beliebigen Gram-negativen Bakterienstamm zu übertragen, (3.) durch Transposition stabil in das Genom des neuen Wirtes zu integrieren und (4.) alle Gene des Klusters, unabhängig von ihrer Anzahl und Orientierung, zu exprimieren.

4.2 Die T7 RNA-Polymerase-abhängige Transkription von Genen eines komplexen Genklusters

Die virale T7 RNA-Polymerase wurde u. a. aufgrund ihrer hohen Prozessivität als RNA-Polymerase für das IVAC-Expressionssystem ausgewählt (Studier & Moffatt, 1986; Terpe, 2006). Ein weiterer Grund war, dass sich die Strukturen der viralen und bakteriellen Transkriptionsterminatoren voneinander unterscheiden (Lyakhov *et al.*, 1998), so dass vermutet wurde, dass die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht erkennt und auch komplexe Genregionen, die in Operons unterteilt sind, vollständig transkribieren kann.

Am Beispiel des Hydrogenase-Genklusters aus *R. capsulatus* wurde überprüft, ob die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren ignoriert und sich somit für die funktionelle Expression komplexer Genkluster eignet. Der Hydrogenase-Gencluster besteht aus insgesamt 19 *hup*- und *hyp*-Genen, ist in fünf Operons unterteilt und enthält drei Transkriptionsterminatoren (Abb. 1.8). Da alle Gene des Klusters in einer Leserichtung vorliegen, der Cluster komplett sequenziert ist (Leclerc *et al.*, 1988) und die Hydrogenase-Aktivität mit einem etablierten Test nachgewiesen werden kann, ist der Hydrogenase-Gencluster das ideale Beispiel, um die Eigenschaften der T7 RNA-Polymerase zu überprüfen. Die Hydrogenase katalysiert die reversible Reaktion $\text{H}_2 \leftrightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$. Wasserstoff gilt als umweltfreundliche Energiequelle der Zukunft und somit ist die Expression der Hydrogenase auch für die Biotechnologie von Interesse (Mealli & Rauchfuss, 2007; Aceves-Lara *et al.*, 2008).

Um die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression der Hydrogenase-Gene zu erreichen, wurde eine Kasette erzeugt, die einen T7-Promotor und als Selektionsmarker eine Spectinomycin-Resistenz enthält. Vor dem T7-Promotor wurde zusätzlich eine bakterielle Transkriptionstermination integriert, um die Transkription der Gene des Hydrogenase-Genklusters durch zusätzliche Promotoren, die in der genomischen DNA von *R. capsulatus* vor dem *hup*-Kluster lokalisiert sind, zu verhindern. Die Kasette wurde durch homologe Rekombination in das Gen *hupV*, dessen Genprodukt Bestandteil der Sensor-Hydrogenase HupUV ist, integriert (Drepper *et al.*, 2005). Als Kontrolle wurde zusätzlich ein *R. capsulatus*-Stamm erzeugt, der anstatt des T7-Promotors den bakteriellen Promotor *PaphIII* enthält.

Mittels RT-PCR und Hydrogenase-Aktivitätstest wurde die Expression der Hydrogenase-Gene in den verschiedenen *R. capsulatus*-Stämmen untersucht. Die Inaktivierung der Sensor-

Hydrogenase HupUV durch die Integration der zusätzlichen Promotoren in das Gen *hupV* führte zu einer verminderten Transkription und funktionellen Expression der *hup*-Gene. Die Sensor-Hydrogenase HupUV besitzt die Fähigkeit H₂ zu binden und ist durch die Interaktion mit dem Zwei-Komponenten-System HupT/HupR direkt an der Regulation der Transkription der *uptake*-Hydrogenase beteiligt, aber nicht für ihre funktionelle Synthese notwendig (Dischert *et al.*, 1999). Durch die Deletion des Gens *hupV* wurde diese Regulation ausgeschaltet, was zu einer verminderten Expression der Gene des Hydrogenase-Genklusters führte.

Abhängig von der T7 RNA-Polymerase konnten jedoch sowohl ein starker Anstieg der Transkription aller Gene des Hydrogenase-Klusters als auch eine gesteigerte Hydrogenase-Aktivität erzielt werden. Diese Ergebnisse belegen, dass die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht erkennt und alle Gene eines Klusters, unabhängig von ihrer Anzahl und von Transkriptionsterminatoren, transkribieren kann. Die Vermutung, dass die T7 RNA-Polymerase ein langes Transkript aller Gene synthetisiert, das zu einer gleichmäßigen Überexpression aller Gene des Klusters führt, wurde nicht bestätigt. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen, dass die Transkript-Konzentrationen der einzelnen Gene des Hydrogenase-Klusters deutlich voneinander abweichen. Die von der T7 RNA-Polymerase gebildete mRNA wird wahrscheinlich wie das Wildtyp-Transkript durch Endonukleasen prozessiert (Kennell, 2002).

4.3 Die IVAC-vermittelte Transkription von Genen mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase

Nachdem erfolgreich bestätigt werden konnte, dass die T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren nicht erkennt und sich somit für die Überexpression zahlreicher Gene eines Genklusters eignet, wurde das IVAC-Expressionssystem konstruiert.

Um die Expression aller Gene eines Genklusters mit dem IVAC-Expressionssystem zu gewährleisten, wurde in beiden IVAC-Kassetten je ein T7 RNA-Polymerase-abhängiger Promotor integriert. Der T7-Promotor der R-IVAC-Kassette wird zusätzlich durch einen *lac*-Operator kontrolliert. Es wurde zunächst untersucht, ob (a) die T7-Promotoren der IVAC-Kassetten funktionell sind und (b) der zusätzliche *lac*-Operator in der R-IVAC-Kassette einen Einfluss auf die Promotorstärke des T7-Promotors hat. Diese Fragestellungen wurden mit Hilfe des Reportergens *gfp* untersucht (3.3.1). Dafür wurden die L- und R-IVAC-Kassetten jeweils in den Vektor pSWGFP, der das promotorlose Gen *gfp* enthält, kloniert und *E. coli* BL21(DE3) mit den konstruierten Plasmiden transformiert. Mittels RT-PCR und Fluoreszenzmessungen konnte dargestellt werden, dass (a) nach der Zugabe von IPTG zur Induktion der T7-RNA-Polymerase sowohl mehr Transkript von *gfp* als auch mehr funktionelles Protein GFP vorhanden ist und (b) durch beide T7-Promotoren verhältnismäßig gleich viel Transkript bzw. funktionelles Protein GFP gebildet wurde. Diese Ergebnisse belegen, dass die T7 RNA-Polymerase Promotoren beider IVAC-Kassetten funktionell und induzierbar sind und der *lac*-Operator keinen entscheidenden Einfluss auf die Promotorstärke des T7-Promotors in der R-IVAC-Kassette hat.

Um die Expression aller Gene unabhängig von der Leserichtung zu gewährleisten, werden die T7-Promotoren der IVAC-Kassetten zueinander gegensätzlich angeordnet. Aufgrund der entgegengesetzt transkribierenden T7 RNA-Polymerasen bestanden die Möglichkeiten, dass (a) die Polymerasen sich bei der Transkription gegenseitig behindern und die Transkription der Zielgene so reduziert wird und/oder (b) die gebildete Antisense-RNA mit dem komplementären Transkript hybridisiert, so dass die Translation des Zielproteins verhindert wird. Der Mechanismus, dass komplementäre RNA-Moleküle miteinander hybridisieren und dadurch die Translation des Transkripts verhindern, wird als RNA-Silencing bezeichnet (Fire *et al.*, 1998; Hamilton & Baulcombe, 1999; Elbashir *et al.*, 2001; Groenenboom *et al.*, 2005). Die Synthese von Antisense-RNA stellt eine natürliche Methode zur Genregulation dar und ist eine etablierte Methode in der Gentechnik, um Gene gezielt auszuschalten (Sanders & Hiatt, 2005; Patzel *et al.*, 2006). Neben dem Einsatz in der Biotechnologie wird die Synthese von Antisense-RNA auch in der Medizin und Pharmakologie verwendet. Ein Medikament,

das auf der Antisense-Technik beruht, ist das Virostatikum Formivirsen. Formivirsen wird zur Behandlung gegen das Cytomegalievirus bei Immundefizienz eingesetzt (Anderson *et al.*, 1996).

Um zu überprüfen, ob mit den entgegengesetzt transkribierenden T7 RNA-Polymerasen die Expression eines Zielgens möglich wird, wurde das Gen *gfp* zwischen beide IVAC-Kassetten kloniert. Mit einer RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass im Vergleich zu einer Überexpression mit nur einer T7 RNA-Polymerase durch die entgegengesetzt transkribierenden Polymerasen die Transkription des Gens *gfp* vermindert wird. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Polymerasen sich gegenseitig bei der Transkription behindern und dadurch die Transkriptionseffizienz herabsetzen. Im Vergleich zu der Expression mit nur einer T7 RNA-Polymerase wurde eine Abnahme der *gfp*-Transkriptkonzentration von 21 % (pR>GFP<L) bzw. 92,5 % (pL>GFP<R) beobachtet.

Mit der Messung von Absorptionsspektren wurde die funktionelle Expression von GFP untersucht, um zu überprüfen, ob durch die Hybridisierung der komplementären RNA-Moleküle zusätzlich die Translation behindert wird. Überraschenderweise wurde jedoch auch nur eine Abnahme der funktionellen Expression von *gfp* von 23 % (pR>GFP<L) und 91,4 % (pL>GFP<R) beobachtet.

Diese Ergebnisse lassen die Aussage zu, dass durch die wechselseitige Behinderung der T7 RNA-Polymerasen die Transkription des Zielgens zwar vermindert, doch nicht verhindert wird. Die IVAC-vermittelte T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression des Gens *gfp* war erfolgreich. Eine Hybridisierung von Antisense- und Sense-RNA, die zu einer zusätzlichen Behinderung der Translation führen würde, findet nicht statt. Im Vergleich zu der Expression mit nur einer T7 RNA-Polymerase wurde die funktionelle Expression nach der Transkription nicht zusätzlich vermindert.

4.4 Die IVAC-vermittelte Integration und heterologe Expression von Genen eines Genklusters

Nachdem die Fähigkeit der T7 RNA-Polymerase zur Transkription von langen Genklustern und die einzelnen Funktionen der Komponenten der IVAC-Kassetten erfolgreich nachgewiesen werden konnten, wurde das IVAC-Expressionssystem anhand verschiedener Genkluster getestet. Für die Analyse des IVAC-Expressionssystem wurden das *lac*-Operon aus *E. coli*, der Prodigiosin-Gencluster aus *S. marcescens* und der Zeaxanthin-Gencluster aus *Pantoea ananatis* IVAC-abhängig exprimiert.

4.4.1 Die heterologe Expression der Gene des *lac*-Operons in den heterologen Bakterienstämmen *P. putida* und *R. capsulatus*

Das *lac*-Operon aus *E. coli* besteht aus den drei Genen *lacZ*, *lacY* und *lacA*. Das Gen *lacZ* kodiert für die β -Galaktosidase, die Laktose in die Monosaccharide Galaktose und Glukose spaltet. Um den Fragen nachzugehen, ob (a) das IVAC-Expressionssystem grundsätzlich funktioniert, (b) alle Gene, unabhängig von ihrer Orientierung, transkribiert werden können, (c) der Integrationsort des rekombinanten IVAC-Transposons einen Einfluss auf die Expression der Zielgene hat und (d) die Orientierung der IVAC-Kassetten zu den zu exprimierenden Genen eine Auswirkung auf die Synthese des Zielproteins hat, wurde das *lac*-Operons in den heterologen Bakterienstämmen *P. putida* und *R. capsulatus* mit dem IVAC-Expressionssystem exprimiert. Es wurde das *lac*-Operon ausgesucht, da die Sequenzen aller Gene des *lac*-Operons bekannt sind, der Cluster aus nur drei Genen besteht und somit molekulargenetisch gut hanhabbar ist und ein Aktivitätstest für die β -Galaktosidase etabliert ist (Madigan *et al.*, 2001).

Das *lac*-Operon aus *E. coli* wurde durch eine gezielte Klonierung mit den IVAC-Kassetten flankiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die IVAC-Kassetten das *lac*-Operon sowohl durch Konjugation in die neuen heterologen Bakterienstämme *P. putida* und *R. capsulatus* übertragen als auch durch Transposition in die chromosomale DNA der Wirte erfolgreich integrieren können. Durch Selektion auf das Antibiotikum Gentamycin wurde die Transposition bestätigt. Im Vergleich zu dem natürlichen Transposon Tn5 (Naumann & Reznikoff, 2002) war die IVAC-vermittelte Transposition sehr erfolgreich.

Die T7 RNA-Polymerase-abhängige Transkription der Gene des *lac*-Operons wurde in beiden heterologen Bakterienstämmen mit einer RT-PCR überprüft. Durch den Einsatz von

spezifischen Primern in der reversen Transkription, die an das Transkript bzw. an die Antisense-RNA der Gene des *lac*-Operons binden, konnte nachgewiesen werden, dass mit der IVAC-vermittelten Transkription sowohl vermehrt Transkript als auch Antisense-RNA der Gene entsteht. Mit den IVAC-Kassetten können somit alle Gene eines Klusters, unabhängig von ihrer Orientierung, transkribiert werden.

Das IVAC-Transposon basiert auf dem Tn5-Transposon, das über den „cut and paste“-Mechanismus in die chromosomale DNA integriert (Reznikoff *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu dem Tn7-Transposon inseriert das Tn5-Transposon in beliebige Stellen in der chromosomalen DNA und benötigt keine spezifischen Sequenzen für eine erfolgreiche Transposition (Kuduvalli *et al.*, 2005; Parks & Peters, 2007). Dadurch führt die Transposition mit dem Tn5-Transposon häufiger zum Erfolg als mit dem Tn7-Transposon. Durch die Transposition des von den IVAC-Kassetten flankierten Genklusters in die chromosomale DNA des Rezipienten entstehen verschiedene Expressionsstämme, die sich voneinander durch den Integrationsort des IVAC-Transposons unterscheiden. Um zu untersuchen, ob der Ort der Integration einen Einfluss auf die Synthese des Zielproteins hat, wurden verschiedene *P. putida*- und *R. capsulatus*-Expressionsstämme in Bezug auf die Synthese der β -Galaktosidase untersucht.

Die unterschiedlichen Integrationsorte des IVAC-Transposons führten in beiden heterologen Bakterienstämmen zu abweichenden β -Galaktosidase-Produktionen. Abhängig von dem Integrationsort des IVAC-Transposons wurden in dem heterologen Bakterienstamm *P. putida* β -Galaktosidase-Aktivitäten zwischen 128 und 224 Miller-Units (*P. putida*::R>lac<L) und zwischen 705 und 1581 Miller-Units (*P. putida*::L>lac<R) erreicht. In dem heterologen Wirtstamm *R. capsulatus* hatte der Ort der Integration des IVAC-Transposons einen noch größeren Einfluss. Es wurden teilweise keine β -Galaktosidase-Aktivitäten gemessen, in anderen Stämmen lag die Aktivität bei 1072 Miller-Units. Der Einfluss des Integrationsortes auf die Expression der Gene des *lac*-Operons kann auf zwei Gründe zurückgeführt werden: (a) je nach Integrationsort des Transposons können Promotoren, die in der chromosomalen DNA des heterologen Wirtes lokalisiert sind, zu einer zusätzlichen Transkription der Gene und somit einer Steigerung der Expression führen und (b) durch die Integration des Transposons in das Genom des Wirtes wird ein Gen deletiert. Je nach Funktion des Genproduktes kann durch die Deletion des Gens eine Steigerung oder Reduktion der Expression der Zielgene hervorgerufen werden.

Unerwartet wurde außerdem beobachtet, dass in dem heterologen Bakterienstamm *P. putida*::L>lac<R unter uninduzierten Bedingungen sowohl mehr Transkript der *lac*-Gene als auch mehr β -Galaktosidase gebildet wurde als unter induzierten Bedingungen. Eine mögliche

Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass auch unter uninduzierten Bedingungen der *lac*-Promotor auf dem Plasmid pML5-T7, der die Transkription des T7 RNA-Polymerase-Gens kontrolliert, nicht vollständig geschlossen ist und eine geringe Menge der T7 RNA-Polymerase synthetisiert wird. Es ist bekannt, dass der *lac*-Promotor auch ohne Induktion eine basale Expression zulässt (Terpe, 2006). Gleichzeitig wird die T7 RNA-Polymerase-abhängige Expression der *lac*-Gene von der R-IVAC-Kassette aus durch einen zusätzlichen *lac*-Operator behindert (Abb. 4.3a). Unter uninduzierten Bedingungen liegt somit zwar wenig T7 RNA-Polymerase vor, die Transkription der Gene wird jedoch, da der T7-Promotor durch den *lac*-Operator nahezu geschlossen ist, nicht durch eine gegenläufige Polymerase behindert. Nach der Zugabe von IPTG wird mehr T7 RNA-Polymerase gebildet und der *lac*-Operator in der R-IVAC-Kassette geöffnet. Wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, führen die jetzt gegenläufig transkribierenden T7 RNA-Polymerasen zu einer Abnahme der Transkription der Gene (Abb. 4.3b).

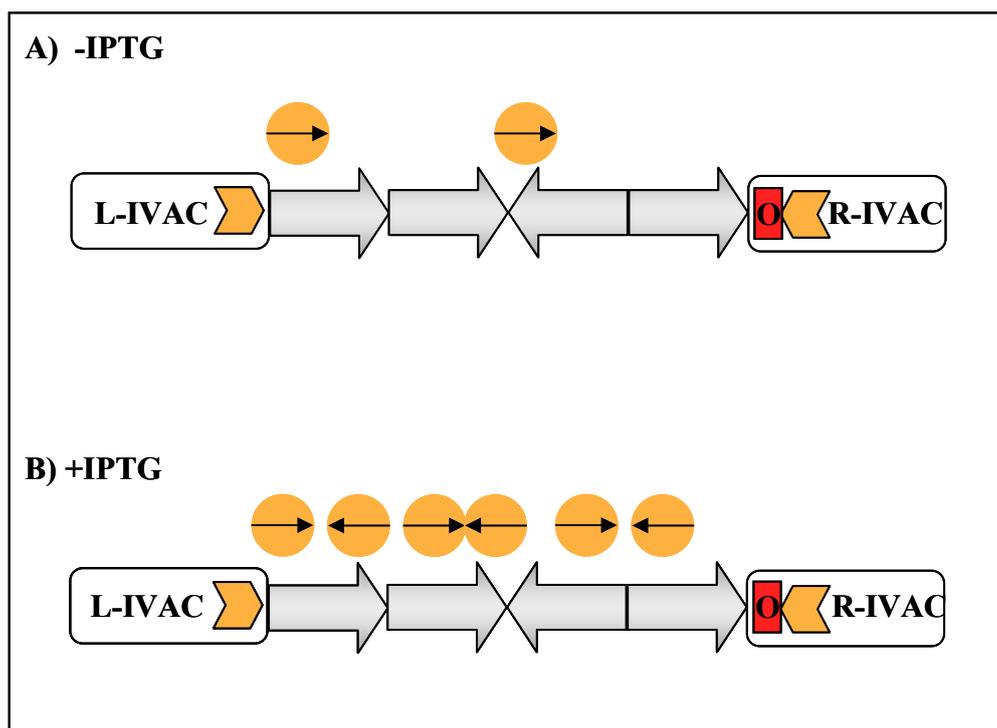


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Transkription der Gene des *lac*-Operons in dem heterologen Bakterienstamm *P. putida* unter (a) uninduzierten (- IPTG) und (b) induzierten Bedingungen (+ IPTG). Sowohl der zu exprimierende Gencluster als auch die IVAC-Kassetten sind schematisch dargestellt. Die T7 RNA-Polymerase wird durch einen orangefarbenen Kreis symbolisiert, die T7-Promotoren durch die orangefarbenen Blockpfeile.

Anhand der heterologen Expression der Gene des *lac*-Operons in *P. putida* und *R. capsulatus* konnten neue Erkenntnisse über das IVAC-Expressionssystem gewonnen werden: (a) Das IVAC-Expressionssystem funktioniert. Es ist sowohl möglich, alle Gene eines Klusters durch

Konjugation und Transposition in die chromosomale DNA eines neuen Wirtsstammes zu übertragen als auch die Gene anschließend mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase zu transkribieren. (b) Mit Hilfe des IVAC-Expressionssystems können alle Gene eines Klusters, unabhängig von ihrer Orientierung, transkribiert werden. (c) Der Integrationsort des IVAC-Transposons hat einen Einfluss auf die Synthese des Zielproteins. (d) Die Orientierung der IVAC-Kassetten zu den zu exprimierenden Genen beeinflusst zusätzlich die heterologe Expression der Gene.

4.4.2 Die heterologe Synthese von Prodigiosin

Nachdem am Beispiel des *lac*-Operons gezeigt werden konnte, dass das IVAC-Expressionssystem grundsätzlich funktionell ist, wurde der Prodigiosin-Gencluster (*pig*) aus *S. marcescens* unter Verwendung des IVAC-Expressionssystems heterolog in *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* exprimiert. Prodigiosin besitzt ein biotechnologisches Anwendungspotenzial, da Prodigiosin u. a. fungizide, bakteriozide und immunosuppressive Eigenschaften aufweist (Williamson *et al.*, 2006a).

Aufgrund der Bedeutung von Prodigiosin für die Biotechnologie gab es bereits zahlreiche Versuche, Prodigiosin heterolog in verschiedenen heterologen Bakterienstämmen, z. B. *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Erwinia carotovora* und *Enterobacter agglomerans*, zu exprimieren (Dauenhauer *et al.*, 1984; Thomson *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2004). Dafür wurde gezielt der komplette Prodigiosin-Gencluster oder partiell verdaute chromosomale DNA von *S. marcescens* in die entsprechenden Expressionsstämme übertragen. Die Versuche blieben jedoch meistens erfolglos. Nach der Transformation der Enterobakterien mit einem Plasmid, auf dem der vollständige *pig*-Kluster lokalisiert war, zeigten nur einige *E. carotovora*-Stämme Prodigiosin-Produktion. Von 36 getesteten *E. carotovora* ssp. *carotovora*-Stämmen wiesen 11 Stämme keine Synthese von Prodigiosin auf, die restlichen 15 Stämme bildeten unterschiedliche Phänotypen aus. So wurde u. a. sowohl die Bildung konzentrischer roter Ringe um einzelne Kolonien beobachtet als auch eine Prodigiosin-Produktion nur im Zentrum einer Kolonie. Mit *E. carotovora* ssp. *atroseptica* als heterologem Bakterienstamm wurden nahezu identische Ergebnisse wie in *E. carotovora* ssp. *carotovora* erzielt (Thomson *et al.*, 2000).

In den Enterobakterien *E. coli*, *P. mirabilis* und *E. agglomerans* konnte keine Prodigiosin-Produktion erzielt werden. Dieses Ergebnis kann darauf zurückgeführt werden, dass in diesen Stämmen ein oder mehrere Regulatoren für die erfolgreiche Prodigiosin-Synthese fehlen oder

die Promotoren des Klusters nicht erkannt werden (Wenzel & Müller, 2005). Erst nach der externen Zugabe der Prodigiosin-Vorstufen MAP und MBC zu *E. coli*-Stämmen, in denen ein Vektor mit dem Gen *pigC* vorlag, konnte eine Pigmentierung der Zellen nachgewiesen werden (Dauenhauer *et al.*, 1984; Williamson *et al.*, 2005). Das Genprodukt von *pigC* katalysiert im letzten Schritt der Prodigiosin-Biosynthese die Kondensation von MAP und MBC zu Prodigiosin.

Durch Konjugation und Transposition wurde der *pig*-Kluster zusammen mit den IVAC-Kassetten stabil in die chromosomale DNA der Rezipienten *R. capsulatus* und *P. putida* integriert. Die Transpositionsraten des IVAC-Transposons wichen dabei nicht entscheidend von den Transpositionsraten des natürlichen Transposons Tn5 ab. Da der *origin of replication* des Vektors, in dem der *pig*-Kluster und die IVAC-Kassetten lokalisiert waren, von *E. coli* erkannt wurde, konnte hier nicht auf ein erfolgreiches Transpositions-Ereignis selektioniert werden. In dem heterologen Stamm *E. coli* lag das Plasmid somit replikativ vor.

Mit dem IVAC-Expressionssystem konnte Prodigiosin sowohl in *E. coli* als auch in *P. putida* erfolgreich hergestellt werden (Abb. 4.4). Da in beiden IVAC-Kassetten je ein T7 RNA-Polymerase-abhängige Promotoren lokalisiert sind, wird die Expression der Zielproteine unabhängig (a) von den natürlichen Promotoren des Klusters, (b) von der natürlichen Regulation des Genclusters durch spezifische Transkriptionsaktivatoren, (c) von der Anzahl und Orientierung der Gene und (d) vom Aufbau des Genclusters. Die IVAC-vermittelte Synthese von Prodigiosin in *E. coli* und *P. putida* war so erfolgreich, dass eine höhere Prodigiosin-Produktion als in dem natürlichen Produktionsstamm *S. marcescens* nachgewiesen werden konnte. Wie bereits bei der heterologen Produktion der β -Galaktosidase in *P. putida* beobachtet worden war (4.4.1), führten die unterschiedlichen Integrationsorte des IVAC-Transposons zu abweichenden Prodigiosin-Produktionen. Zusätzlich wurde wieder beobachtet, dass in dem heterologen Bakterienstamm *P. putida* die Synthese von Prodigiosin, ausgehend von dem T7-Promotor der L-IVAC-Kassette, unter induzierten Bedingungen im Vergleich zu nicht-induzierten Bedingungen reduziert war. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wird in Abschnitt 4.4.1 diskutiert.

Mit dem heterologen Wirt *R. capsulatus* konnte keine erfolgreiche Prodigiosin-Produktion erzielt werden. Die T7 RNA-Polymerase abhängige Transkription des vollständigen Prodigiosin-Klusters wurde mit einer RT-PCR nachgewiesen, die Synthese von Prodigiosin konnte jedoch mittels Absorptionsmessungen nicht bestätigt werden. Zwei mögliche Gründe für dieses Ergebnis sind, dass *R. capsulatus* entweder die für die Prodigiosin-Synthese notwendigen Vorstufen nicht zur Verfügung stellt, oder dass in den getesteten Stämmen die

Synthese aufgrund des Integrationsortes des IVAC-Transposons nicht stattfinden konnte. Wie die heterologe Expression der β -Galaktosidase in *R. capsulatus* gezeigt hat, konnte in einigen *R. capsulatus*-Stämmen aufgrund des Integrationsortes des IVAC-Transposons ebenso keine β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden.

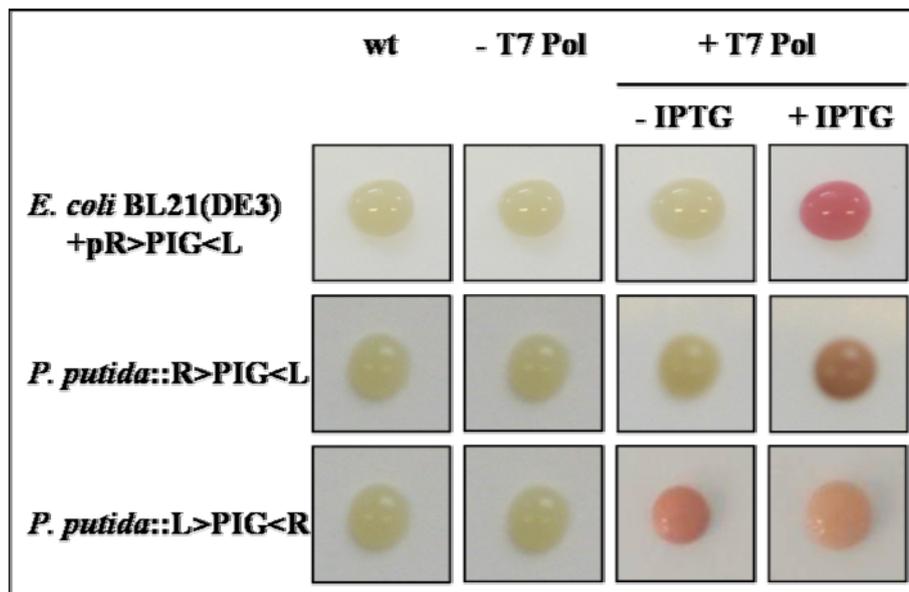


Abb. 4.4: Ergebnis der heterologen Produktion von Prodigiosin in *E. coli* und *P. putida*. *E. coli* BL21(DE3) wurde mit dem Plasmid pR>PIG<L transformiert. Der *E. coli*-Expressionsstamm und die Stämme *P. putida*::R>PIG<L und *P. putida*::L>PIG<R wurden in bei 30° inkubiert und die Expression der T7 RNA-Polymerase durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert.

Anhand der heterologen Expression der *pig*-Gene in den Bakterienstämmen *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus* konnte gezeigt werden, dass mit verschiedenen Expressionsstämmen unterschiedliche Prodigiosin-Ausbeuten erzielt werden konnten. Dieses Ergebnis bestätigt, dass es sinnvoll ist, die heterologe Synthese eines gewünschten Produktes in verschiedenen Expressionsstämmen durchzuführen, um eine möglichst hohe Ausbeute des Zielproteins zu erhalten.

4.4.3 Die heterologe Synthese von Zeaxanthin

In einer im Rahmen der Dissertation betreuten Diplomarbeit wurde zusätzlich der *crt*-Kluster aus *Pantoea ananatis*, das für das Carotinoid Zeaxanthin- β -D-diglycosid kodiert, in dem heterologen Bakterienstamm *P. putida* IVAC-abhängig exprimiert (Loeschcke, 2008). Als Carotinoide wird eine große Gruppe von natürlichen Farbpigmenten bezeichnet, die als Nahrungsergänzungsmittel oder Farbstoffe für Lebens- und Futtermittel eine große Bedeutung für die Industrie haben (Mijts *et al.*, 2005). Im menschlichen Körper haben

Carotinoide hauptsächlich eine Schutzfunktion gegenüber Photooxidation und sind Vorläufer für die Vitamin A-Synthese (Fraser *et al.*, 2001; Lu & Li, 2008). Pflanzen und Mikroorganismen können Carotinoide *de novo* synthetisieren, Tiere und Menschen dagegen nicht (Harding & Shropshire, 1980; Schmidt-Dannert, 2000). Carotinoide sind in der überwiegenden Zahl Tetraterpene und aus einzelnen Isopreneinheiten aufgebaut. Zwei Beispiele für Carotinoide sind Zeaxanthin und β -Carotin. Zeaxanthin kommt zusammen mit Lutein als Pigment in der Retina vor, besonders im sogenannten Gelben Fleck, und schützt die Netzhaut vor zu hoher Lichteinstrahlung (Krinsky *et al.*, 2003). Für die Medizin ist Zeaxanthin von großer Bedeutung, da es möglicherweise bei bestimmten Formen der retinalen Degeneration eine schützende Wirkung besitzt (Meyer, 2002). β -Carotin ist eines der häufigsten natürlich vorkommenden Carotinoide und eine Quelle für Vitamin A. Außerdem wirkt β -Carotin als Antioxidans, indem es in der Zelle Singlett Sauerstoff abfangen kann (Meyer, 2002).

Der *crt*-Kluster aus *P. ananatis* besteht aus den sechs Genen *crtE*, *crtX*, *crtY*, *crtI*, *crtB* und *crtZ* und besitzt eine Gesamtlänge von 6918 bp (Abb. 4.5; Nishizaki *et al.*, 2007). Die *crt*-Gene sind in zwei Operons angeordnet (Operon 1: *crtE*, *X*, *Y*, *I*, *B*; Operon 2: *crtZ*). Die Genprodukte der einzelnen Gene katalysieren, u. a. über die Vorstufen β -Carotin und Zeaxanthin, die Synthese von Zeaxanthin- β -D-diglucosid (Abb. 4.6a). Wird das Gen *crtX* deletiert, bricht der Syntheseweg vorzeitig ab und es entsteht Zeaxanthin (4.6b). Ohne das Enzym CrtZ entsteht β -Carotin (4.6c).

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden Zeaxanthin- β -D-diglucosid, Zeaxanthin und β -Carotin IVAC-abhängig exprimiert (Loeschcke, 2008). Dafür wurde der gesamte *crt*-Kluster aus *P. ananatis* isoliert und in den Vektor pUC18 kloniert. Um Zeaxanthin und β -Carotin synthetisieren zu können, wurden zwei zusätzliche Varianten des *crt*-Klusters hergestellt. Für die heterologe Produktion von Zeaxanthin wurde das Gen *crtX* deletiert, für die Synthese von β -Carotin wurde das Gen *crtZ* entfernt. Um die verschiedenen Kluster IVAC-abhängig exprimieren zu können, wurden die IVAC-Kassetten durch eine gezielte Klonierung in die verschiedenen Vektoren transferiert (Loeschcke, 2008).

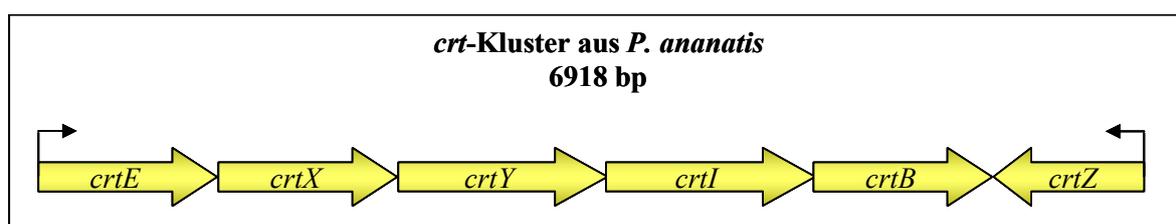


Abb. 4.5: Schematische Darstellung des *crt*-Klusters aus *P. ananatis*. Der Cluster besteht aus den sechs Genen *crtE*, *X*, *Y*, *I*, *B* und *Z* und hat eine Gesamtlänge von 6918 bp.

Die konstruierten Vektoren wurden mit Hilfe der IVAC-Kassetten durch Konjugation in den heterologen Wirt *P. putida* übertragen und durch Transposition stabil in die chromosomale DNA integriert. Die ermittelten Transpositionsraten des IVAC-Transposons unterschieden sich nicht deutlich von der Transpositionsrate des natürlichen Transposons Tn5. Die IVAC-abhängige Produktion von Zeaxantin- β -D-diglycosid, Zeaxanthin und β -Carotin in *P. putida* wurde mit einer RT-PCR, der Messung von Absorptionsspektren sowie Dünnschichtchromatographie untersucht. Mit der RT-PCR konnte gezeigt werden, dass alle Gene der unterschiedlichen Kluster abhängig von der T7 RNA-Polymerase vollständig transkribiert worden waren. Dabei war die Transkription des Klusters durch die T7 RNA-Polymerase unabhängig von der Orientierung der Gene in dem Cluster. Die erfolgreiche heterologe Synthese von Zeaxanthin- β -D-diglycosid, Zeaxanthin und β -Carotin in *P. putida* mit dem neuen IVAC-Expressionssystem konnte anhand von Absorptionsspektren und Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden (Abb. 4.7).

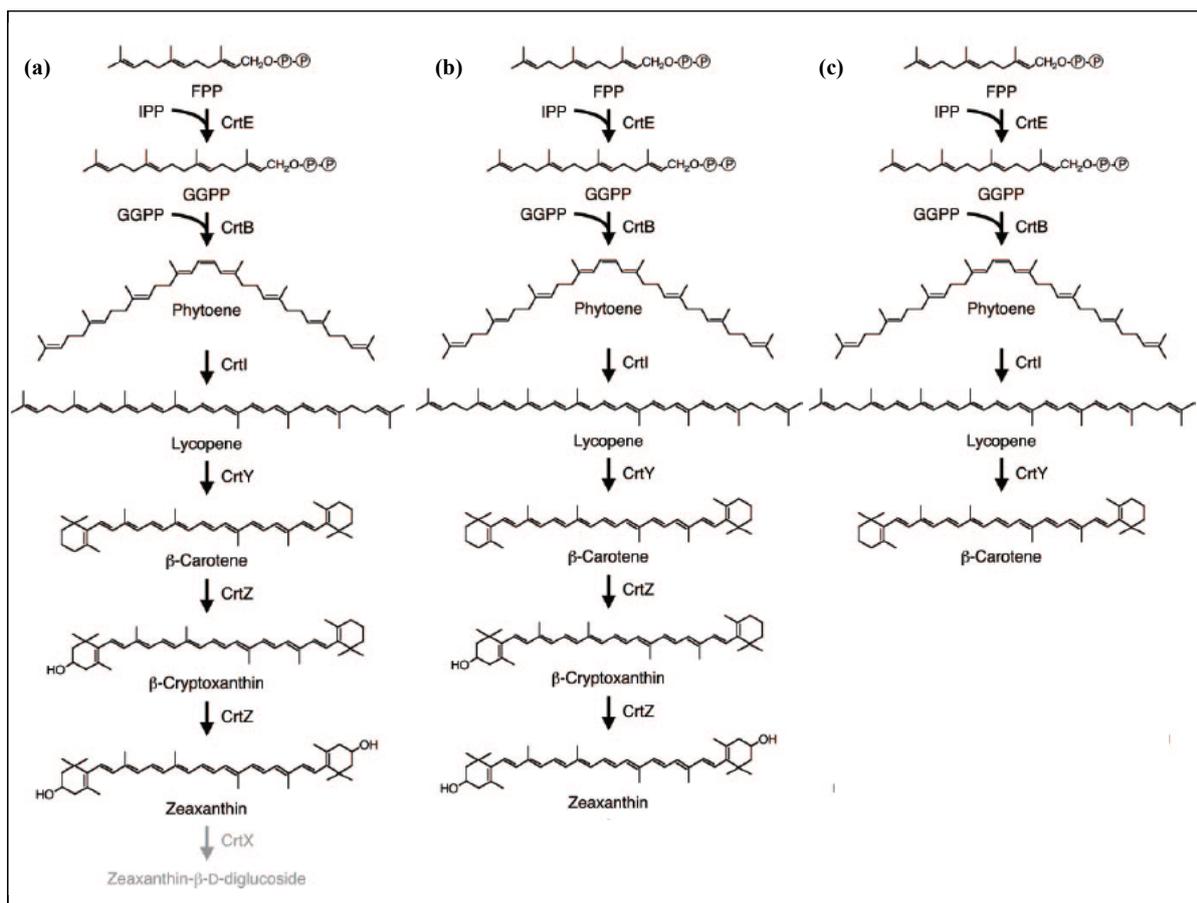


Abb. 4.6: Carotinoid-Biosyntheseweg aus *P. ananatis* (nach: Nishizaki *et al.*, 2007). (a) Sechs Enzyme katalysieren die Umsetzung von FPP (Farnesyl-Pyrophosphat) zu Zeaxanthin- β -D-diglycoside. IPP = Isopentenyl-diphosphat, GGPP = Gernylgeranyl-pyrophosphat. (b) Durch die Deletion von *crtX* bricht der Syntheseweg frühzeitig ab und es entsteht Zeaxanthin. (c) Die Deletion des Gens *crtZ* führt zu der Synthese von β -Carotin.

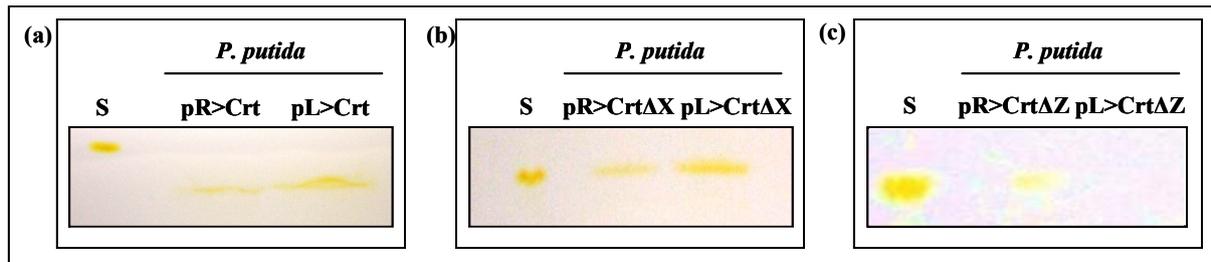


Abb. 4.7: Nachweis der IVAC-vermittelten Carotinoid-Synthese in *P. putida* mittels Dünnschichtchromatographie. (a) Unabhängig von der Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem vollständigen *crt*-Kluster, konnte die Synthese von Zeaxanthin-β-D-diglycosid nachgewiesen werden. S = Zeaxanthin. (b) In *P. putida* mit dem *crt*-Kluster, in dem das Gen *crtX* deletiert worden war, war die erfolgreiche Synthese von β-Carotin nachweisbar. S = β-Carotin. (c) Die Synthese von Zeaxanthin in *P. putida* mit dem *crt*-Kluster ohne das Gen *crtZ* wurde auch mittels Dünnschichtchromatographie detektiert. S = Zeaxanthin.

Mit dem neuen IVAC-Expressionssystem konnten somit erfolgreich unterschiedliche Genkluster in verschiedenen heterologen Bakterienstämmen exprimiert werden. Dabei war die IVAC-vermittelte Expression unabhängig von (a) der Anzahl der zu transkribierenden Gene, (b) der Orientierung der einzelnen Gene in dem Kluster, (c) bakteriellen Transkriptionsterminatoren und (d) von den natürlichen Promotorstrukturen und der Regulation des Klusters. Das Ziel, mit dem IVAC-Expressionssystem eine universelle und zudem unkomplizierte Methode im Umgang mit komplexen Genklustern zu etablieren und so die heterologe Expression von Klustern in beliebigen Gram-negativen Bakterienstämmen zu ermöglichen, konnte erfolgreich erreicht werden. Im Folgenden kann das IVAC-Expressionssystem für die heterologe Expression insbesondere von Genen großer Genregionen in verschiedenen Gram-negativen Bakterienstämmen eingesetzt werden.

5. Zusammenfassung

Mikroorganismen produzieren zahlreiche Naturstoffe, die für die Biotechnologie und Medizin von großer Bedeutung sind. Viele dieser Naturstoffe weisen eine komplexe Struktur auf und für ihre Synthese wird in der Regel eine große Anzahl von Enzymen benötigt, deren Gene häufig natürlicherweise in einer gemeinsamen Genregion vorliegen. Bislang stellt es ein beinahe unlösbares Problem dar, mehrere Gene eines solchen Klusters gemeinsam und koordiniert in einem heterologen Wirtsorganismus zu exprimieren. In den meisten Fällen setzt dabei bereits die Größe einer solchen Genregion technische Grenzen für ihre molekulargenetische Handhabung. Zusätzlich liegen die funktionell gekoppelten Gene eines Klusters meistens nicht in einer Transkriptionseinheit und Transkriptionsrichtung vor und weisen somit mehr als einen Transkriptionsterminator und mehr als einen Promotor auf. Wirtsfremde Promotoren werden jedoch in mikrobiellen Produktionsstämmen normalerweise nicht erkannt, wodurch die koordinierte Expression der Gene eines solchen Klusters nicht möglich ist.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung des „*in vivo auto cloning and expression*“-Systems (IVAC). Das IVAC-Expressionssystem basiert auf zwei Kassetten, der L-IVAC- und R-IVAC-Kassette, die aus verschiedenen funktionellen Elementen zusammengesetzt sind. Beide IVAC-Kassetten enthalten je ein Antibiotikaresistenzgen, mit dem eine spezifische Selektion nach der erfolgreichen Integration neben dem zu exprimierenden Gencluster möglich wird. Zusätzlich befinden sich in den IVAC-Kassetten genetische Elemente zur konjugativen Übertragung des markierten Genclusters und der anschließenden Integration in das Wirtschromosom mittels Transposition. Um die funktionelle Expression aller Gene des Klusters unabhängig von spezifischen Promotoren und Transkriptionsterminatoren zu erreichen, ist auf jeder IVAC-Kassette je ein T7 RNA-Polymerase-abhängiger Promotor lokalisiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand verschiedener Gencluster gezeigt werden, dass die virale T7 RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminatoren ignoriert und sich somit für die funktionelle Expression komplexer Gencluster eignet. Unter anderem wurde am Beispiel des Hydrogenase-Genclusters aus *Rhodobacter capsulatus* mittels RT-PCR und einem Hydrogenase-Aktivitätstest gezeigt, dass die T7 RNA-Polymerase ausgehend von einem entsprechenden T7-Promotor alle Gene des Klusters, unabhängig von wirtseigenen Promotoren und Transkriptionsterminatoren, exprimieren kann und somit die ideale Polymerase für die heterologe Expression komplexer Gencluster ist.

Die Funktionalität des IVAC-Expressionssystems wurde daraufhin anhand des Prodigiosin-Genklusters (*pig*) aus *Serratia marcescens* überprüft. Aufgrund der fungiziden, bakteriziden und immunsuppressiven Wirkung ist Prodigiosin von besonderer biotechnologischer Relevanz. Im Gegensatz zu bislang verwendeten Expressionssystemen, die eine effiziente heterologe Synthese von Prodigiosin nicht ermöglichen konnten, wurden mit Hilfe des IVAC-Expressionssystems sowohl *E. coli*- als auch *Pseudomonas putida*-Produktionsstämme erzeugt, die Prodigiosin synthetisieren konnten. Die vollständige Expression der Gene des Prodigiosin-Genklusters sowie die Prodigiosin-Synthese wurden in den verschiedenen Bakterienstämmen mittels RT-PCR, Absorptionsmessungen und Massenspektrometrie analysiert. Die IVAC-vermittelte Synthese von Prodigiosin in den neuen Produktionsstämmen übertraf dabei die Prodigiosin-Produktion des natürlichen Produzenten *S. marcescens*.

Mit Hilfe des neuen IVAC-Expressionssystems ist es somit erstmals möglich, (a) große Genkluster durch die Integration der IVAC-Kassetten zu markieren, (b) den markierten Abschnitt mittels Konjugation in verschiedene Gram-negative Bakterienstämme zu übertragen und (c) anschließend durch Transposition stabil in das Genom des neuen Wirtes zu integrieren. Mit der T7 RNA-Polymerase wird (d) die vollständige Expression aller Gene eines Klusters, unabhängig von ihrer Anzahl und Orientierung, gewährleistet.

6. Summary

Microorganisms produce an immense variety of natural products with useful biological properties. The heterologous expression of natural product biosynthetic pathways is of increasing interest in biotechnology and drug discovery. This technique allows the overproduction of structurally complex substances through transferring the biosynthetic genes from the original bacterial strains to more amenable heterologous hosts. Natural products are often structurally complex substances and are encoded by a large number of genes which are organized in large gene regions. Up to now, it is an irresolvable problem to express such gene clusters in heterologous hosts, because their size limits their molecular genetic manipulation. In addition, their original promoters are often not recognized in heterologous hosts.

The aim of this work was the creation of the “*in vivo* auto cloning and expression”-system (IVAC-system). The IVAC-system is based on two cassettes, called L-IVAC- and R-IVAC-cassette, which consist of several genetic components. Both cassettes comprise one antibiotic resistance gene as a selection marker for their integration next to the gene cluster of interest. Additionally, an origin of transfer and transposon elements are integrated in both IVAC-cassettes to enable the conjugal transfer of the gene cluster and the IVAC-cassettes into any Gram-negative host strain and their stable insertion into the host chromosome by transposition. For the expression of the target genes T7-promoters were inserted in both IVAC-cassettes. The T7 RNA-polymerase is proposed to ignore bacterial transcription terminations and to be particularly suitable for the transcription of clustered bacterial genes. To confirm this assumption the uptake hydrogenase gene cluster of *Rhodobacter capsulatus* was studied as an example. After site-specific integration of the T7-promoter upstream of the hydrogenase gene region, the T7 RNA-polymerase dependent overexpression of all hydrogenase genes has been proven successfully by RT-PCR and by specific enzyme activity measurements.

The feasibility of the IVAC-system was verified by the heterologous expression of the prodigiosin gene cluster (*pig*) of *S. marcescens*. Prodigiosins are of increasing interest for biotechnology, because they show antifungal, antibacterial, antiprotazoal and immunosuppressive activities. Up to now, it was not possible to produce prodigiosin heterologously in *E. coli*. The IVAC-system enabled the transfer of the *pig*-cluster to the new heterologous host strains *E. coli* and *P. putida* and the IVAC-dependent expression of prodigiosin was analysed in detail and successfully by RT-PCRs, measurements of absorption spectra and mass-spectrometry. With the new IVAC-technology the heterologous production

of prodigiosin in *E. coli* and *P. putida* even exceeded the prodigiosin-synthesis in the natural producer strain *S. marcescens*.

The new IVAC expression system enables for the first time (a) the labeling of any gene cluster of interest, (b) the conjugational transfer of the gene cluster to different expression hosts, (c) the integration into the host chromosome via transposition and finally (d) the concerted T7 RNA-polymerase dependent expression of all clustered genes, independent of the orientation of the single genes, natural promoters and transcription terminations.

7. Literatur

Aceves-Lara, C. A., Trably, E., Bastidas-Oyenadel, J.-R., Ramirez, I., Latrille, E. & Steyer, J.-P. (2008). [Bioenergy production from waste: Examples of biomethane and biohydrogen.]. *J Soc Biol* **202**, 177-189.

Akins, R. L. & Rybak, M. J. (2001). Bactericidal activities of two daptomycin regimens against clinical strains of glycopeptide intermediate-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in an *in vitro* pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 454-459.

Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143-169.

Anderson, K. P., Fox, M. C., Brown-Driver, V., Martin, M. J. & Azad, R. F. (1996). Inhibition of human cytomegalovirus immediate-early gene expression by an antisense oligonucleotide complementary to immediate-early RNA. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2004-2011.

Arnold, W. & Puehler, A. (1988). A family of high-copy-number plasmid vectors with single end-label sites for rapid nucleotide sequencing. *Gene* **70**, 171-179.

Baker, D. D., Chu, M., Oza, U. & Rajgarhia, V. (2007). The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat Prod Rep* **24**, 1225-1244.

Baltz, R. H., McHenney, M. A., Cantwell, C. A., Queener, S. W. & Solenberg, P. J. (1997). Applications of transposition mutagenesis in antibiotic producing streptomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**, 179-187.

Baneyx, F. & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **22**, 1399-1408.

Barnard, G. C., Henderson, G. E., Srinivasan, S. & Gerngross, T. U. (2004). High level recombinant protein expression in *Ralstonia eutropha* using T7 RNA-polymerase based amplification. *Protein Expr Purif* **38**, 264-271.

Báscones, E., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T. & Palacios, J. M. (2000). Generation of new hydrogen-recycling *Rhizobiaceae* strains by introduction of a novel hup minitransposon. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4292-4299.

Basu, J., Stromberg, G., Compitello, G., Willard, H. F. & Van Bokkelen, G. (2005). Rapid creation of BAC-based human artificial chromosome vectors by transposition with synthetic alpha-satellite arrays. *Nucleic Acids Res* **33**, 587-596.

Béjà, O., Suzuki, M. T., Koonin, E. V., Aravind, L., Hadd, A., Nguyen, L. P., Villacorta, R., Amjadi, M., Garrigues, C., Jovanovich, S. B., Feldman, R. A. & DeLong, E. F. (2000). Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environ Microbiol* **2**, 516-529.

Bennett, J. W. & Bentley, R. (2000). Seeing red: the story of prodigiosin. *Adv Appl Microbiol* **47**, 1-32.

Binz, T. M., Wenzel, S. C., Schnell, H.-J., Bechthold, A. & Mueller, R. (2008). Heterologous expression and genetic engineering of the phenalinolactone biosynthetic gene cluster by using Red/ET recombineering. *Chembiochem* **9**, 447-454.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.

Bode, H. B. & Mueller, R. (2005). The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 6828-6846.

Boivin, R., Bellemare, G. & Dion, P. (1994). Novel narrow-host-range vectors for direct cloning of foreign DNA in *Pseudomonas*. *Curr Microbiol* **28**, 41-47.

Braatsch, S., Helmark, S., Kranz, H., Koebmann, B. & Jensen, P. R. (2008). *Escherichia coli* strains with promoter libraries constructed by Red/ET recombination pave the way for transcriptional fine-tuning. *Biotechniques* **45**, 335-337.

Brosius, J., Erfle, M. & Storella, J. (1985). Spacing of the -10 and -35 regions in the *tac* promoter. Effect on its *in vivo* activity. *J Biol Chem* **260**, 3539-3541.

Brunschwig, E. & Darzins, A. (1992). A two-component T7 system for the overexpression of genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **111**, 35-41.

- Calderone, T. L., Stevens, R. D. & Oas, T. G. (1996). High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **262**, 407-412.
- Cane, D. E., Walsh, C. T. & Khosla, C. (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282**, 63-68.
- Cane, D. E. & Walsh, C. T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**, R319-325.
- Carbone, A., Zinovyev, A. & Képès, F. (2003). Codon adaptation index as a measure of dominating codon bias. *Bioinformatics* **19**, 2005-2015.
- Cauvin, B., Colbeau, A. & Vignais, P. M. (1991). The hydrogenase structural operon in *Rhodobacter capsulatus* contains a third gene, *hupM*, necessary for the formation of a physiologically competent hydrogenase. *Mol Microbiol* **5**, 2519-2527.
- Cereghino, J. L. & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 45-66.
- Cha, R., Grucz, R. G., Jr. & Rybak, M. J. (2003). Daptomycin dose-effect relationship against resistant Gram-positive organisms. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1598-1603.
- Chawrai, S. R., Williamson, N. R., Salmond, G. P. & Leeper, F. J. (2008). Chemoenzymatic synthesis of prodigiosin analogues-exploring the substrate specificity of PigC. *Chem Commun (Camb)*, 1862-1864.
- Chevallet, M., Dupuis, A., Issartel, J. P., Lunardi, J., van Belzen, R. & Albracht, S. P. (2003). Two EPR-detectable [4Fe-4S] clusters, N₂a and N₂b, are bound to the NuoI (TYKY) subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim Biophys Acta* **1557**, 51-66.
- Clardy, J. (2005). Using genomics to deliver natural products from symbiotic bacteria. *Genome Biol* **6**, 232.
- Clardy, J., Fischbach, M. A. & Walsh, C. T. (2006). New antibiotics from bacterial natural products. *Nat Biotechnol* **24**, 1541-1550.
- Colbeau, A., Richaud, P., Toussaint, B., Caballero, F. J., Elster, C., Delphin, C., Smith, R. L., Chabert, J. & Vignais, P. M. (1993). Organization of the genes necessary for hydrogenase expression in *Rhodobacter capsulatus*. Sequence analysis and identification of two *hup* regulatory mutants. *Mol Microbiol* **8**, 15-29.
- Colbeau, A., Elsen, S., Tomiyama, M., Zorin, N. A., Dimon, B. & Vignais, P. M. (1998). *Rhodobacter capsulatus* HypF is involved in regulation of hydrogenase synthesis through the HupUV proteins. *Eur J Biochem* **251**, 65-71.
- Coulthurst, S. J., Kurz, C. L. & Salmond, G. P. (2004). *luxS* mutants of *Serratia* defective in autoinducer-2-dependent 'quorum sensing' show strain-dependent impacts on virulence and production of carbapenem and prodigiosin. *Microbiology* **150**, 1901-1910.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. & Snader, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* **60**, 52-60.
- Cragg, G. M. & Newman, D. J. (2002). Chemical diversity: a function of biodiversity. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 404-405.
- Croteau, R., Kutchan, T. & Lewis, N. (2000). Biochemistry and molecular biology of plants. *American Society of Plant Biologist*, p. 1250.
- Daniel, R. (2004). The soil metagenome-a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 199-204.
- Dauenhauer, S. A., Hull, R. A. & Williams, R. P. (1984). Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Serratia marcescens* genes encoding prodigiosin biosynthesis. *J Bacteriol* **158**, 1128-1132.
- Davies, K. M., Skamnaki, V., Johnson, L. N. & Vénien-Bryan, C. (2006). Structural and functional studies of the response regulator HupR. *J Mol Biol* **359**, 276-288.
- De Boer, H. A., Comstock, L. J. & Vasser, M. (1983). The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 21-25.
- Debono, M., Abbott, B. J., Molloy, R. M. & other authors (1988). Enzymatic and chemical modifications of lipopeptide antibiotic A21978C: the synthesis and evaluation of daptomycin (LY146032). *J Antibiot (Tokyo)* **41**, 1093-1105.
- Demain, A. L. (1995). Fifty years of antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends. *Society for General Microbiology*, Cambridge, p. 205-228.

- Dewick, P. M. (2002). The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat Prod Rep* **19**, 181-222.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. & Timmis, K. N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**, 6568-6572.
- De Marco, A., Deuerling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T. & Bukau, B. (2007). Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnol* **7**, 32.
- De Smet, L., Pettigrew, G. W. & Van Beeumen, J. J. (2001a). Cloning, overproduction and characterization of cytochrome c peroxidase from the purple phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Eur J Biochem* **268**, 6559-6568.
- De Smet, L., Kostanjevecki, V., Guisez, Y. & Van Beeumen, J. (2001b). A novel system for heterologous expression of flavocytochrome c in phototrophic bacteria using the *Allochromatium vinosum* *rbcA* promoter. *Arch Microbiol* **176**, 19-28.
- Dischert, W., Vignais, P. M. & Colbeau, A. (1999). The synthesis of *Rhodobacter capsulatus* HupSL hydrogenase is regulated by the two-component HupT/HupR system. *Mol Microbiol* **34**, 995-1006.
- Drepper, T., Arvani, S., Rosenau, F., Wilhelm, S. & Jaeger, K.-E. (2005). High-level transcription of large gene regions: a novel T7 RNA-polymerase-based system for expression of functional hydrogenases in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem Soc Trans* **33**, 56-58.
- Drepper, T., Eggert, T., Hummel, W., Leggewie, C., Pohl, M., Rosenau, F., Wilhelm, S. & Jaeger, K.-E. (2006). Novel biocatalysts for white biotechnology. *Biotechnol J* **1**, 777-786.
- Duerr, C., Schnell, H.-J., Luzhetskyy, A., Murillo, R., Weber, M., Welzel, K., Vente, A. & Bechthold, A. (2006). Biosynthesis of the terpene phenalinolactone in *Streptomyces* sp. Tu6071: analysis of the gene cluster and generation of derivatives. *Chem Biol* **13**, 365-377.
- Dunn, S. D. (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **157**, 144-153.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Elsen, S., Richaud, P., Colbeau, A. & Vignais, P. M. (1993). Sequence analysis and interposon mutagenesis of the *hupT* gene, which encodes a sensor protein involved in repression of hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **175**, 7404-7412.
- Elsen, S., Colbeau, A., Chabert, J. & Vignais, P. M. (1996). The *hupTUV* operon is involved in negative control of hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **178**, 5174-5181.
- Elsen, S., Dischert, W., Colbeau, A. & Bauer, C. E. (2000). Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. *J Bacteriol* **182**, 2831-2837.
- Elsen, S., Duché, O. & Colbeau, A. (2003). Interaction between the H₂ sensor HupUV and the histidine kinase HupT controls HupSL hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **185**, 7111-7119.
- Elsen, S., Swem, L. R., Swem, D. L. & Bauer, C. E. (2004). RegB/RegA, a highly conserved redox-responder global two-component regulatory system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 263-279.
- Finking, R., Solsbacher, J., Konz, D., Schobert, M., Schafer, A., Jahn, D. & Marahiel, M. A. (2002). Characterization of a new type of phosphopantetheinyl transferase for fatty acid and siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **277**, 50293-50302.
- Fineran, P. C., Slater, H., Everson, L., Hughes, K. & Salmond, G. P. (2005a). Biosynthesis of tripyrrole and beta-lactam secondary metabolites in *Serratia*: integration of quorum sensing with multiple new regulatory components in the control of prodigiosin and carbapenem antibiotic production. *Mol Microbiol* **56**, 1495-1517.
- Fineran, P. C., Everson, L., Slater, H. & Salmond, G. P. (2005b). A GntR family transcriptional regulator (PigT) controls gluconate-mediated repression and defines a new, independent pathway for regulation of the tripyrrole antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*. *Microbiology* **151**, 3833-3845.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Forman, M. D., Stack, R. F., Masters, P. S., Hauer, C. R. & Baxter, S. M. (1998). High level, context dependent misincorporation of lysine for arginine in *Saccharomyces cerevisiae* at homeodomain expressed in *Escherichia coli*. *Protein Sci* **7**, 500-503.
- Fraser, N. J., Hashimoto, H. & Cogdell, R. J. (2001). Carotenoids and bacterial photosynthesis: The story so far. *Photosynth Res* **70**, 249-256.
- Fu, J., Wenzel, S. C., Perlova, O., Wang, J., Gross, F., Tang, Z., Yin, Y., Stewart, A. F., Mueller, R. & Zhang, Y. (2008). Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition. *Nucleic Acids Res* **36**, e113.
- Fuller, F. (1982). A family of cloning vectors containing the *lacUV5* promoter. *Gene* **19**, 43-54.
- Gerth, K., Bedorf, N., Irschik, H., Hofle, G. & Reichenbach, H. (1994). The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). I. Soraphen A1 alpha: fermentation, isolation, biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **47**, 23-31.
- Goff, S. A. & Goldberg, A. L. (1985). Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* **41**, 587-595.
- Goryshin, I. Y. & Reznikoff, W. S. (1998). Tn5 *in vitro* transposition. *J Biol Chem* **273**, 7367-7374.
- Gradman, R. J., Ptacin, J. L., Bhasin, A., Reznikoff, W. S. & Goryshin, I. Y. (2008). A bifunctional DNA binding region in Tn5 transposase. *Mol Microbiol* **67**, 528-540.
- Groenenboom, M. A., Marée, A. F. & Hogeweg, P. (2005). The RNA silencing pathway: the bits and pieces that matter. *PLoS Comput Biol* **1**, 155-165.
- Grohmann, E., Muth, G. & Espinosa, M. (2003). Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 277-301.
- Gronenborn, B. (1976). Overproduction of phage lambda repressor under control of the *lac* promoter of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **148**, 243-250.
- Gross, F., Gottschalk, D. & Mueller, R. (2005). Posttranslational modification of myxobacterial carrier protein domains in *Pseudomonas* sp. by an intrinsic phosphopantetheinyl transferase. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 66-74.
- Gueguen, E., Rousseau, P., Duval-Valentin, G. & Chandler, M. (2005). The transpososome: control of transposition at the level of catalysis. *Trends Microbiol* **13**, 543-549.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* **22**, 346-353.
- Guthrie, E. P., Flaxman, C. S., White, J., Hodgson, D. A., Bibb, M. J. & Chater, K. F. (1998). A response-regulator-like activator of antibiotic synthesis from *Streptomyces coelicolor* A3(2) with an amino-terminal domain that lacks a phosphorylation pocket. *Microbiology* **144** (Pt 3), 727-738.
- Gutman, G. A. & Hatfield, G. W. (1989). Nonrandom utilization of codon pairs in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3699-3703.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J Bacteriol* **177**, 4121-4130.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence-alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95-98.
- Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harding, R. W. & Shropshire, W. (1980). Photocontrol of carotenoid biosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol* **31**, 217-238.
- Harris, A. K., Williamson, N. R., Slater, H., Cox, A., Abbasi, S., Foulds, I., Simonsen, H. T., Leeper, F. J. & Salmond, G. P. (2004). The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. *Microbiology* **150**, 3547-3560.

- He, B., Kukarin, A., Temiakov, D., Chin-Bow, S. T., Lyakhov, D. L., Rong, M., Durbin, R. K. & McAllister, W. T. (1998). Characterization of an unusual, sequence-specific termination signal for T7 RNA-polymerase. *J Biol Chem* **273**, 18802-18811.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**, 6557-6567.
- Herrero, M., De Lorenzo, V., Ensley, B. & Timmis, K. N. (1993). A T7 RNA-polymerase-based system for the construction of *Pseudomonas* strains with phenotypes dependent on TOL-meta pathway effectors. *Gene* **134**, 103-106.
- Hidalgo, E., Leyva, A. & Ruiz-Argüeso, T. (1990). Nucleotide sequence of the hydrogenase structural genes from *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Mol Biol* **15**, 367-370.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. & Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21**, 526-531.
- Jacobi, A., Rossmann, R. & Bock, A. (1992). The *hyp* operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **158**, 444-451.
- Jana, S. & Deb, J. K. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 289-298.
- Jeong, H., Yim, J. H., Lee, C. & other authors (2005). Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. *Nucleic Acids Res* **33**, 7066-7073.
- Joshi, H. M. & Tabita, F. R. (1996). A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14515-14520.
- Julien, B., Shah, S., Ziermann, R., Goldman, R., Katz, L. & Khosla, C. (2000). Isolation and characterization of the epothilone biosynthetic gene cluster from *Sorangium cellulosum*. *Gene* **249**, 153-160.
- Kanhere, A. & Bansal, M. (2005). Structural properties of promoters: similarities and differences between prokaryotes and eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **33**, 3165-3175.
- Kent, A. D., Wojtasiak, M. L., Robleto, E. A. & Triplett, E. W. (1998). A transposable partitioning locus used to stabilize plasmid-borne hydrogen oxidation and trifolixotoxin production genes in a *Sinorhizobium* strain. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1657-1662.
- Kao, C. M., Katz, L. & Khosla, C. (1994). Engineered biosynthesis of a complete macrolactone in a heterologous host. *Science* **265**, 509-512.
- Kappler, U. & McEwan, A. G. (2002). A system for the heterologous expression of complex redox proteins in *Rhodobacter capsulatus*: characterisation of recombinant sulphite: cytochrome c oxidoreductase from *Starkeya novella*. *FEBS Lett* **529**, 208-214.
- Kawauchi, K., Shibutani, K., Yagisawa, H. & other authors (1997). A possible immunosuppressant, cycloprodiginin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 543-547.
- Kealey, J. T., Liu, L., Santi, D. V., Betlach, M. C. & Barr, P. J. (1998). Production of a polyketide natural product in nonpolyketide-producing prokaryotic and eukaryotic hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 505-509.
- Keller, M. & Zengler, K. (2004). Tapping into microbial diversity. *Nat Rev Microbiol* **2**, 141-150.
- Kennell, D. (2002). Processing endoribonucleases and mRNA degradation in bacteria. *J Bacteriol* **184**, 4645-4657; discussion 4665.
- Kent, A. D., Wojtasiak, M. L., Robleto, E. A. & Triplett, E. W. (1998). A transposable partitioning locus used to stabilize plasmid-borne hydrogen oxidation and trifolixotoxin production genes in a *Sinorhizobium* strain. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1657-1662.
- Khlebnikov, A., Datsenko, K. A., Skaug, T., Wanner, B. L. & Keasling, J. D. (2001). Homogeneous expression of the P(BAD) promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter. *Microbiology* **147**, 3241-3247.

- Kim, D., Lee, J. S., Park, Y. K., Jeong, H., Oh, T.-K., Kim, B. S. & Lee, C. H. (2007).** Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *J Appl Microbiol* **102**, 937-944.
- Klenchin, V. A., Czyz, A., Goryshin, I. Y., Gradman, R., Lovell, S., Rayment, I. & Reznikoff, W. S. (2008).** Phosphate coordination and movement of DNA in the Tn5 synaptic complex: role of the (R)YREK motif. *Nucleic Acids Res* **36**, 5855-5862.
- Klipp, W., Masepohl, B. & Puehler, A. (1988).** Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: Duplication of a *nifA-nifB* region. *J Bacteriol* **170**, 693-699.
- Knaggs, A. R. (2003).** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat Prod Rep* **20**, 119-136.
- Kochetkov, S. N., Rusakova, E. E. & Tunitskaya, V. L. (1998).** Recent studies of T7 RNA-polymerase mechanism. *FEBS Lett* **440**, 264-267.
- Koehler, W., Eggers, H. J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H. & Pulverer (2001).** Medizinische Mikrobiologie. *Urban & Fischer*, 8. Auflage, pp. 191-192.
- Koh, H.-C., Ha, S.-C., Na, J.-A., Kim, H.-S., Yeo, M.-G., Lee, J.-S., Kim, S.-J. & Park, Y. (1995).** Cloning and gene encoding for siderophore biosynthesis in fluorescent *Pseudomonas* sp.. *J Microbiol* **33**, 28-33.
- Krinsky, N. I., Landrum, J. T. & Bone, R. A. (2003).** Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu Rev Nutr* **23**, 171-201.
- Kuduvalli, P. N., Mitra, R. & Craig, N. L. (2005).** Site-specific Tn7 transposition into the human genome. *Nucleic Acids Res* **33**, 857-863.
- Kurland, C. & Gallant, J. (1996).** Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 489-493.
- Kuzminov, A. (1999).** Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 751-813.
- Labes, M., Puehler, A. & Simon, R. (1990).** A new family of RSF1010-derived expression and *lac*-fusion broad-host-range vectors for Gram-negative bacteria. *Gene* **89**, 37-46.
- Laemmlli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C. & Walsh, C. T. (1996).** A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **3**, 923-936.
- Lambert, G. R. & Smith, G. D. (1981).** Hydrogen uptake by the nitrogen-starved cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Arch Biochem Biophys* **211**, 360-367.
- Langer, M., Gabor, E. M., Liebeton, K., Meurer, G., Niehaus, F., Schulze, R., Eck, J. & Lorenz, P. (2006).** Metagenomics: an inexhaustible access to nature's diversity. *Biotechnol J* **1**, 815-821.
- LaPlante, K. L. & Rybak, M. J. (2004).** Daptomycin - a novel antibiotic against Gram-positive pathogens. *Expert Opin Pharmacother* **5**, 2321-2331.
- Leclerc, M., Colbeau, A., Cauvin, B. & Vignais, P. M. (1988).** Cloning and sequencing of the genes encoding the large and the small subunits of the H₂ uptake hydrogenase (*hup*) of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Gen Genet* **214**, 97-107.
- Lichtenstein, C. & Brenner, S. (1981).** Site-specific properties of Tn7 transposition into the *E. coli* chromosome. *Mol Gen Genet* **183**, 380-387.
- Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D., Kempf, H.-J. & van Pée, K.-H. (2000).** Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manag Sci* **56**, 688-695.
- Liu, Q., Li, M. Z., Leibham, D., Cortez, D. & Elledge, S. J. (1998).** The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Curr Biol* **8**, 1300-1309.
- Loeschcke, A. (2008).** Funktionelle Expression des *crt*-Genclusters aus *Pantoea ananatis*: Heterologe Synthese von Zeaxanthin unter Verwendung des „*in vivo auto cloning and expression*“-Systems (IVAC). Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998).** Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, p. 596.
- Lu, S. & Li, L. (2008).** Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *J Integr Plant Biol* **50**, 778-785.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A. & Mathur, E. J. (1991).** High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6.

- Lutz, S., Jacobi, A., Schlensog, V., Bohm, R., Sawers, G. & Bock, A. (1991). Molecular characterization of an operon (*hyp*) necessary for the activity of the three hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 123-135.
- Lyakhov, D. L., He, B., Zhang, X., Studier, F. W., Dunn, J. J. & McAllister, W. T. (1998). Pausing and termination by bacteriophage T7 RNA-polymerase. *J Mol Biol* **280**, 201-213.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (2001). Brock Mikrobiologie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin*, p. 964.
- Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**, 512-538.
- Markert, A. (2005). "In vivo" Klonierung großer Genregionen durch Kombination von homologer Rekombination mit Transposition. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Maróti, G., Fodor, B. D., Rákhely, G., Kovács, A. T., Arvani, S. & Kovács, K. L. (2003). Accessory proteins functioning selectively and pleiotropically in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina*. *Eur J Biochem* **270**, 2218-2227.
- Marques, S. & Ramos, J. L. (1993). Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways. *Mol Microbiol* **9**, 923-929.
- Marsh, J. L., Erfle, M. & Wykes, E. J. (1984). The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**, 481-485.
- Martinez, A., Kolvek, S. J., Yip, C. L., Hopke, J., Brown, K. A., MacNeil, I. A. & Osburne, M. S. (2004). Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2452-2463.
- Masepohl, B., Kutsche, M., Riedel, K. U., Schmehl, M., Klipp, W. & Puehler, A. (1992). Functional analysis of the cysteine motifs in the ferredoxin-like protein FdxN of *Rhizobium meliloti* involved in symbiotic nitrogen fixation. *Mol Gen Genet* **233**, 33-41.
- McKinney, J., Guerrier-Takada, C., Galan, J. & Altman, S. (2002). Tightly regulated gene expression system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**, 6056-6059.
- McKown, R. L., Orle, K. A., Chen, T. & Craig, N. L. (1988). Sequence requirements of *Escherichia coli* attTn7, a specific site of transposon Tn7 insertion. *J Bacteriol* **170**, 352-358.
- McNulty, D. E., Claffee, B. A., Huddleston, M. J., Porter, M. L., Cavnar, K. M. & Kane, J. F. (2003). Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **27**, 365-374.
- Mealli, C. & Rauchfuss, T. B. (2007). Models for the hydrogenases put the focus where it should be hydrogen. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**, 8942-8944.
- Merril, C. R. (1990). Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* **182**, 477-488.
- Meyer, J., Kelley, B. C. & Vignais, P. M. (1978). Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in photosynthetic bacteria. *Biochimie* **60**, 245-260.
- Meyer, K. (2002). Farbenfrohe Antioxidantien. Carotinoide – Bedeutung und technische Synthesen. *Chemie in unserer Zeit* **3**, 178-192.
- Miao, V., Coëffet-Legal, M.-F., Brian, P., Brost, R., Penn, J., Whiting, A., Martin, S., Ford, R., Parr, I., Bouchard, M., Silva, C. J., Wrigley, S. K. & Baltz, R. H. (2005). Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology* **151**, 1507-1523.
- Mijts, B. N., Lee, P. C. & Schmidt-Dannert, C. (2005). Identification of a carotenoid oxygenase synthesizing acyclic xanthophylls: combinatorial biosynthesis and directed evolution. *Chem Biol* **12**, 453-460.
- Mise, N. & Avner, P. (2004). BAC Modification Using a RecA Expressing Shuttle Vector System. *Methods Mol Biol* **256**, 77-87.
- Mofid, M. R., Finking, R. & Marahiel, M. A. (2002). Recognition of hybrid peptidyl carrier proteins/acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetase modules by the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp. *J Biol Chem* **277**, 17023-17031.
- Molnar, I., Schupp, T., Ono, M., Zirkle, R., Milnamow, M., Nowak-Thompson, B., Engel, N., Toupet, C., Stratmann, A., Cyr, D. D., Gorlach, J., Mayo, J. M., Hu, A., Goff, S., Schmid, J. & Ligon, J. M. (2000). The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chem Biol* **7**, 97-109.

- Montaner, B., Navarro, S., Piqué, M., Vilaseca, M., Martinell, M., Giralt, E., Gil, J. & Pérez-Tomás, R. (2000). Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br J Pharmacol* **131**, 585-593.
- Montaner, B. & Pérez-Tomás, R. (2001). Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sci* **68**, 2025-2036.
- Monti-Bragadin, C. & Samer, L. (1975). Compatibility of pTM89, a new F-like R factor, and of derivative plasmids. *J Bacteriol* **124**, 1132-1136.
- Mori, H. (2002). Transgenic insects. Expressing green fluorescent protein-silk fibroin light chain fusion protein in transgenic silkworms. *Methods Mol Biol* **183**, 235-243.
- Mungur, R., Glass, A. D., Goodenow, D. B. & Lightfoot, D. A. (2005). Metabolite fingerprinting in transgenic *Nicotiana tabacum* altered by the *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase gene. *J Biomed Biotechnol* **2005**, 198-214.
- Muyrers, J. P., Zhang, Y., Testa, G. & Stewart, A. F. (1999). Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res* **27**, 1555-1557.
- Muyrers, J. P., Zhang, Y., Buchholz, F. & Stewart, A. F. (2000). RecE/RecT and Red α /Red β initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev* **14**, 1971-1982.
- Muyrers, J. P., Zhang, Y. & Stewart, A. F. (2001). Techniques: Recombinogenic engineering—new options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem Sci* **26**, 325-331.
- Naumann, T. A. & Reznikoff, W. S. (2002). Tn5 transposase with an altered specificity for transposon ends. *J Bacteriol* **184**, 233-240.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T. & other authors (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**, 799-808.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* **66**, 1022-1037.
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **70**, 461-477.
- Nishizaki, T., Tsuge, K., Itaya, M., Doi, N. & Yanagawa, H. (2007). Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in *Escherichia coli* by ordered gene assembly in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1355-1361.
- Novagen (2008). pET *E. coli* T7 expression vectors. <http://www.emdbiosciences.com/html/NVG/pETTable.html>.
- O'Connor, M., Peifer, M. & Bender, W. (1989). Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* **244**, 1307-1312.
- Omori, K., Isoyama-Tanaka, J., Ihara, F., Yamada, Y. & Nihira, T. (2005). Active lactonizing lipase (LipL) efficiently overproduced by *Pseudomonas* strains as heterologous expression hosts. *J Biosci Bioeng* **100**, 323-330.
- Parks, A. R. & Peters, J. E. (2007). Transposon Tn7 is widespread in diverse bacteria and forms genomic islands. *J Bacteriol* **189**, 2170-2173.
- Patzel, V., Dietrich, I. & Kaufmann, S. H. (2006). RNA Silencing in the struggle against disease. *Ann N Y Acad Sci* **1082**, 44-46.
- Pfeifer, B. A., Admiraal, S. J., Gramajo, H., Cane, D. E. & Khosla, C. (2001). Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science* **291**, 1790-1792.
- Pfeifer, B. A. & Khosla, C. (2001). Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 106-118.
- Pfeifer, B. A., Wang, C. C., Walsh, C. T. & Khosla, C. (2003). Biosynthesis of Yersiniabactin, a complex polyketide-nonribosomal peptide, using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6698-6702.
- Piel, J. (2004). Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep* **21**, 519-538.
- Polisky, B., Bishop, R. J. & Gelfand, D. H. (1976). A plasmid cloning vehicle allowing regulated expression of eukaryotic DNA in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3900-3904.
- Prentki, P. & Krisch, H. M. (1984). *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**, 303-313.
- Reznikoff, W. S., Bhasin, A., Davies, D. R., Goryshin, I. Y., Mahnke, L. A., Naumann, T., Rayment, I., Steiniger-White, M. & Twining, S. S. (1999). Tn5: A molecular window on transposition. *Biochem Biophys Res Commun* **266**, 729-734.

- Reznikoff, W. S. (2003).** Tn5 as a model for understanding DNA transposition. *Mol Microbiol* **47**, 1199-1206.
- Reznikoff, W. S., Goryshin, I. Y. & Jendrisak, J. J. (2004).** Tn5 as a molecular genetics tool: *In vitro* transposition and the coupling of *in vitro* technologies with *in vivo* transposition. *Methods Mol Biol* **260**, 83-96.
- Reznikoff, W. S. (2008).** Transposon Tn5. *Annu Rev Genet* **42**, 269-286.
- Richaud, P., Vignais, P. M., Colbeau, A., Uffen, R. L. & Cauvin, B. (1990).** Molecular biology studies of the uptake hydrogenase of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodocyclus gelatinosus*. *FEMS Microbiol Rev* **7**, 413-418.
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D. & Handelsman, J. (2004).** Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* **38**, 525-552.
- Rocha, E. P., Cornet, E. & Michel, B. (2005).** Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS Genet* **1**, e15.
- Rong, M., He, B., McAllister, W. T. & Durbin, R. K. (1998).** Promoter specificity determinants of T7 RNA-polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 515-519.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000).** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365-386.
- Saier, M. H., Jr. (1995).** Differential codon usage: a safeguard against inappropriate expression of specialized genes? *FEBS Lett* **362**, 1-4.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Sanders, R. A. & Hiatt, W. (2005).** Tomato transgene structure and silencing. *Nat Biotechnol* **23**, 287-289.
- Santos, M. A., Moura, G., Massey, S. E. & Tuite, M. F. (2004).** Driving change: the evolution of alternative genetic codes. *Trends Genet* **20**, 95-102.
- Schlieker, C., Bukau, B. & Mogk, A. (2002).** Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol* **96**, 13-21.
- Schloss, P. D. & Handelsman, J. (2003).** Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 303-310.
- Schloss, P. D. & Handelsman, J. (2005).** Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol* **6**, 229.
- Schmidt, F. R. (2004).** Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**, 363-372.
- Schmidt-Dannert, C. (2000).** Engineering novel carotenoids in microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 255-261.
- Schneidinger, B. (1997).** Überexpression und transkriptionelle Regulation des Lipaseoperons von *Pseudomonas aeruginosa* und funktionelle Charakterisierung der Lipase-spezifischen Foldase LipH. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.
- Schupp, T., Toupet, C., Cluzel, B., Neff, S., Hill, S., Beck, J. J. & Ligon, J. M. (1995).** A *Sorangium cellulosum* (myxobacterium) gene cluster for the biosynthesis of the macrolide antibiotic soraphen A: cloning, characterization, and homology to polyketide synthase genes from actinomycetes. *J Bacteriol* **177**, 3673-3679.
- Shigaki, T., Kole, M., Ward, J. M., Sze, H. & Hirschi, K. D. (2005).** Cre-*loxP* recombination vectors for the expression of Riken *Arabidopsis* full-length cDNAs in plants. *Biotechniques* **39**, 301-302, 304.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. & Simon, M. (1992).** Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8794-8797.
- Simon, R., Priefer, U. & Puehler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic-engineering-Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotech* **1**, 784-791.
- Simon, R., O'Connell, M., Labes, M. & Puehler, A. (1986).** Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other Gram-negative bacteria. *Methods Enzymol* **118**, 640-659

- Slater, H., Crow, M., Everson, L. & Salmond, G. P. (2003). Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Mol Microbiol* **47**, 303-320.
- Smart, J. L., Willett, J. W. & Bauer, C. E. (2004). Regulation of *hem* gene expression in *Rhodobacter capsulatus* by redox and photosystem regulators RegA, CrtJ, FnrL, and AerR. *J Mol Biol* **342**, 1171-1186.
- Snyder, L. & Champness, W. (1997). Molecular Genetics of bacteria. *ASM Press Washington*.
- Solomon, P. S., Shaw, A. L., Lane, I., Hanson, G. R., Palmer, T. & McEwan, A. G. (1999). Characterization of a molybdenum cofactor biosynthetic gene cluster in *Rhodobacter capsulatus* which is specific for the biogenesis of dimethylsulfoxide reductase. *Microbiology* **145** (Pt 6), 1421-1429.
- Song, M.-J., Bae, J., Lee, D.-S., Kim, C.-H., Kim, J.-S., Kim, S.-W. & Hong, S.-I. (2006). Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. *J Biosci Bioeng* **101**, 157-161.
- Sørensen, H. P., Sperling-Petersen, H. U. & Mortensen, K. K. (2003). Production of recombinant thermostable proteins expressed in *Escherichia coli*: completion of protein synthesis is the bottleneck. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **786**, 207-214.
- Sørensen, H. P. & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **115**, 113-128.
- Staunton, J. & Weissman, K. J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* **18**, 380-416.
- Staunton, J. & Wilkinson, B. (2001). Combinatorial biosynthesis of polyketides and nonribosomal peptides. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 159-164.
- Stephan, S., Heinzle, E., Wenzel, S. C., Krug, D., Mueller, R. & Wittmann, C. (2006). Metabolic physiology of *Pseudomonas putida* for heterologous production of myxochromide. *Process Biochem* **41**, 2146-2152.
- Streit, W. R. & Schmitz, R. A. (2004). Metagenomics-the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol* **7**, 492-498.
- Streit, W. R., Daniel, R. & Jaeger, K.-E. (2004). Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 285-290.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA-polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *Mol Biol* **189**, 113-130.
- Takano, E., Gramajo, H. C., Strauch, E., Andres, N., White, J. & Bibb, M. J. (1992). Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **6**, 2797-2804.
- Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C. & Julien, B. (2000). Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science* **287**, 640-642.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**, 211-222.
- Thomson, N. R., Crow, M. A., McGowan, S. J., Cox, A. & Salmond, G. P. (2000). Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol* **36**, 539-556.
- Thomson, C. J., Power, E., Ruebsamen-Waigmann, H. & Labischinski, H. (2004). Antibacterial research and development in the 21(st) Century-an industry perspective of the challenges. *Curr Opin Microbiol* **7**, 445-450.
- Tobert, J. A. (2003). Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 517-526.
- Toussaint, B., de Sury d'Aspremont, R., Delic-Attree, I., Berchet, V., Elsen, S., Colbeau, A., Dischert, W., Lazzaroni, Y. & Vignais, P. M. (1997). The *Rhodobacter capsulatus* *hupSLC* promoter: identification of cis-regulatory elements and of trans-activating factors involved in H₂ activation of *hupSLC* transcription. *Mol Microbiol* **26**, 927-937.
- Vahlensieck, H. F., Pridzun, L., Reichenbach, H. & Hinnen, A. (1994). Identification of the yeast ACC1 gene product (acetyl-CoA carboxylase) as the target of the polyketide fungicide soraphen A. *Curr Genet* **25**, 95-100.

- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F. & other authors (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**, 66-74.
- Vieira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.
- Vignais, P. M., Dimon, B., Zorin, N. A., Colbeau, A. & Elsen, S. (1997). HupUV proteins of *Rhodobacter capsulatus* can bind H₂: evidence from the H-D exchange reaction. *J Bacteriol* **179**, 290-292.
- Vignais, P. M., Billoud, B. & Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 455-501.
- Vignais, P. M. & Colbeau, A. (2004). Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol* **6**, 159-188.
- Vignais, P. M., Elsen, S. & Colbeau, A. (2005). Transcriptional regulation of the uptake [NiFe]hydrogenase genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem Soc Trans* **33**, 28-32.
- Vignais, P. M. & Billoud, B. (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem Rev* **107**, 4206-4272.
- Vignais, P. M. (2008). Hydrogenases and H(+)-reduction in primary energy conservation. *Results Probl Cell Differ* **45**, 223-252.
- Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M. & Fontecilla-Camps, J. C. (1995). Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**, 580-587.
- Wall, J. G. & Pluckthun, A. (1995). Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 507-516.
- Walsh, C. T. (2002). Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *Chembiochem* **3**, 125-134.
- Walsh, C. T. (2004). Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science* **303**, 1805-1810.
- Wang, G. L., Holsten, T. E., Song, W. Y., Wang, H. P. & Ronald, P. C. (1995). Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the Xa-21 disease resistance locus. *Plant J* **7**, 525-533.
- Wasserman, H. H., McKeon, J. E., Smith, L. A. & Forgione, P. (1966). Studies on prodigiosin and the bipyrrole precursor. *Tetrahedron* **8**: 647-662.
- Waters, V. L. (2001). Conjugation between bacterial and mammalian cells. *Nat Genet* **29**, 375-376.
- Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A. & Olins, P. O. (1996). Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 494-499.
- Wenzel, S. C., Gross, F., Zhang, Y., Fu, J., Stewart, A. F. & Mueller, R. (2005a). Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in pseudomonads via Red/ET recombineering. *Chem Biol* **12**, 349-356.
- Wenzel, S. C., Kunze, B., Hofle, G., Silakowski, B., Scharfe, M., Blocker, H. & Mueller, R. (2005b). Structure and biosynthesis of myxochromides S1-3 in *Stigmatella aurantiaca*: evidence for an iterative bacterial type I polyketide synthase and for module skipping in nonribosomal peptide biosynthesis. *Chembiochem* **6**, 375-385.
- Wenzel, S. C. & Mueller, R. (2005). Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 594-606.
- Williams, R. P. & Quadri, S. M. (1980). The Genus *Serratia*. *CRC Press Inc.*, pp. 31-75.
- Williamson, N. R., Simonsen, H. T., Ahmed, R. A., Goldet, G., Slater, H., Woodley, L., Leeper, F. J. & Salmond, G. P. (2005). Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylyl-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* **56**, 971-989.
- Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J. & Salmond, G. P. (2006a). The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat Rev Microbiol* **4**, 887-899.
- Williamson, N. R., Simonsen, H. T., Harris, A. K., Leeper, F. J. & Salmond, G. P. (2006b). Disruption of the copper efflux pump (CopA) of *Serratia marcescens* ATCC 274 pleiotropically affects copper sensitivity and production of the tripyrrole secondary metabolite, prodigiosin. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**, 151-158.

Williamson, N. R., Fineran, P. C., Gristwood, T., Chawrai, S. R., Leeper, F. J. & Salmond, G. P. (2007). Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. *Future Microbiol* **2**, 605-618.

Yanish-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M. & Keller, M. (2002). Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15681-15686.

Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J. P. & Stewart, A. F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet* **20**, 123-128.

Zhang, Y., Muyrers, J. P., Testa, G. & Stewart, A. F. (2000). DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **18**, 1314-1317.

Zhang, Y., Muyrers, J. P., Rientjes, J. & Stewart, A. F. (2003). Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in *Escherichia coli* and mouse ES cells. *BMC Mol Biol* **4**, 1.

Zhang, H., Wang, Y. & Pfeifer, B. A. (2008). Bacterial hosts for natural product production. *Mol Pharm* **5**, 212-225.

Zirkle, R., Ligon, J. M. & Molnár, I. (2004). Heterologous production of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A of *Sorangium cellulosum* So ce26 in *Streptomyces lividans*. *Microbiology* **150**, 2761-2774.

8. Anhang

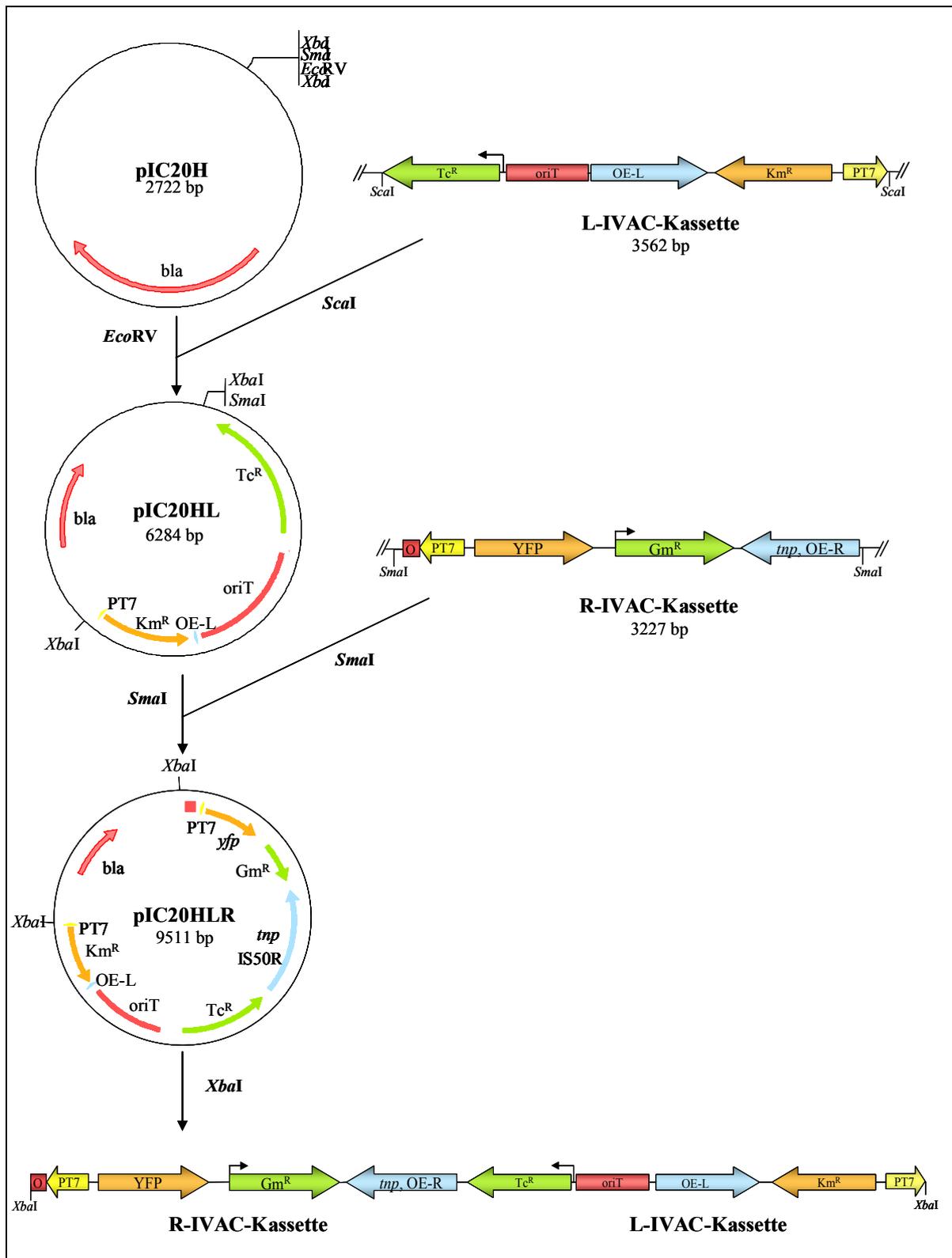


Abb. 8.1: Schematische Darstellung der Konstruktion des Vektors pIC20HRL. Durch Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen *ScaI* (L-IVAC) bzw. *SmaI* (R-IVAC) wurden die IVAC-Kassetten aus den Vektoren pL-IVAC3 und pR-IVAC3 isoliert und nacheinander in den Vektor pIC20H kloniert. Der konstruierte Vektor wurde als pIC20HRL bezeichnet. Mit dem Restriktionsenzym *XbaI* können die IVAC-Kassetten nun in einem Klonierungsschritt zusammenhängend aus dem Vektor pIC20HRL isoliert und für folgende Klonierungen verwendet werden.

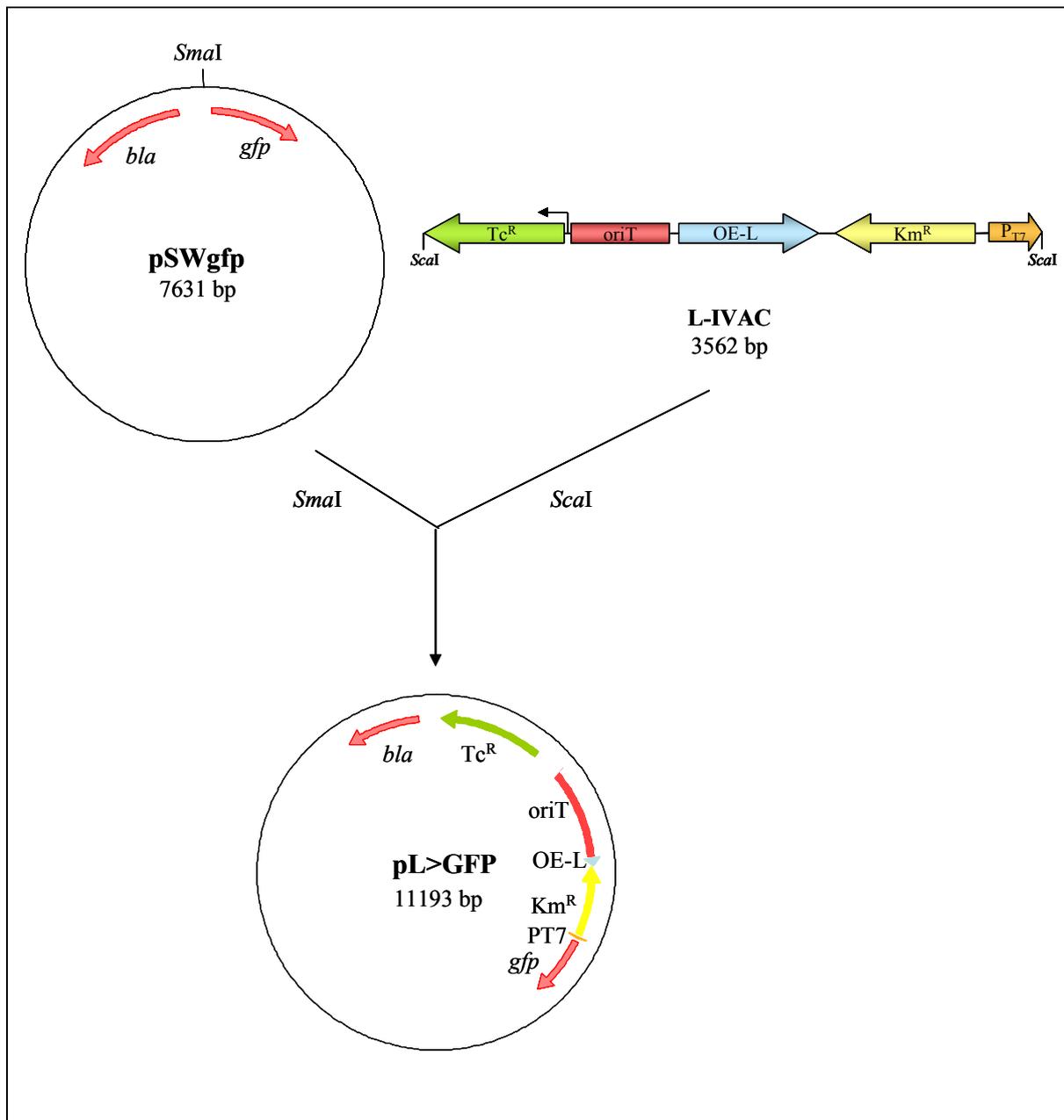


Abb. 8.2: Klonierungsschema zur Konstruktion des Vektors pL>GFP. Der Vektor pSWGFP, in dem das Gen *gfp* ohne eigenen Promotor vorliegt, wurde durch Hydrolyse mit *SmaI* linearisiert. Die L-IVAC-Kassette wurde durch Restriktion mit der Restriktionsendonuklease *ScaI* aus dem Vektor pL-IVAC3 isoliert und in den Vektor pSWGFP kloniert. Da es sich bei dieser Klonierung um eine *blunt-end* Klonierung handelt, konnte die L-IVAC-Kassette in zwei unterschiedlichen Orientierungen in den Vektor pSWGFP inserieren. Durch Restriktionsanalysen wurde der Vektor pL>GFP identifiziert, in dem der T7 RNA-Polymerase-abhängiger Promotor stromaupwärts von dem Gen *gfp* lokalisiert ist.

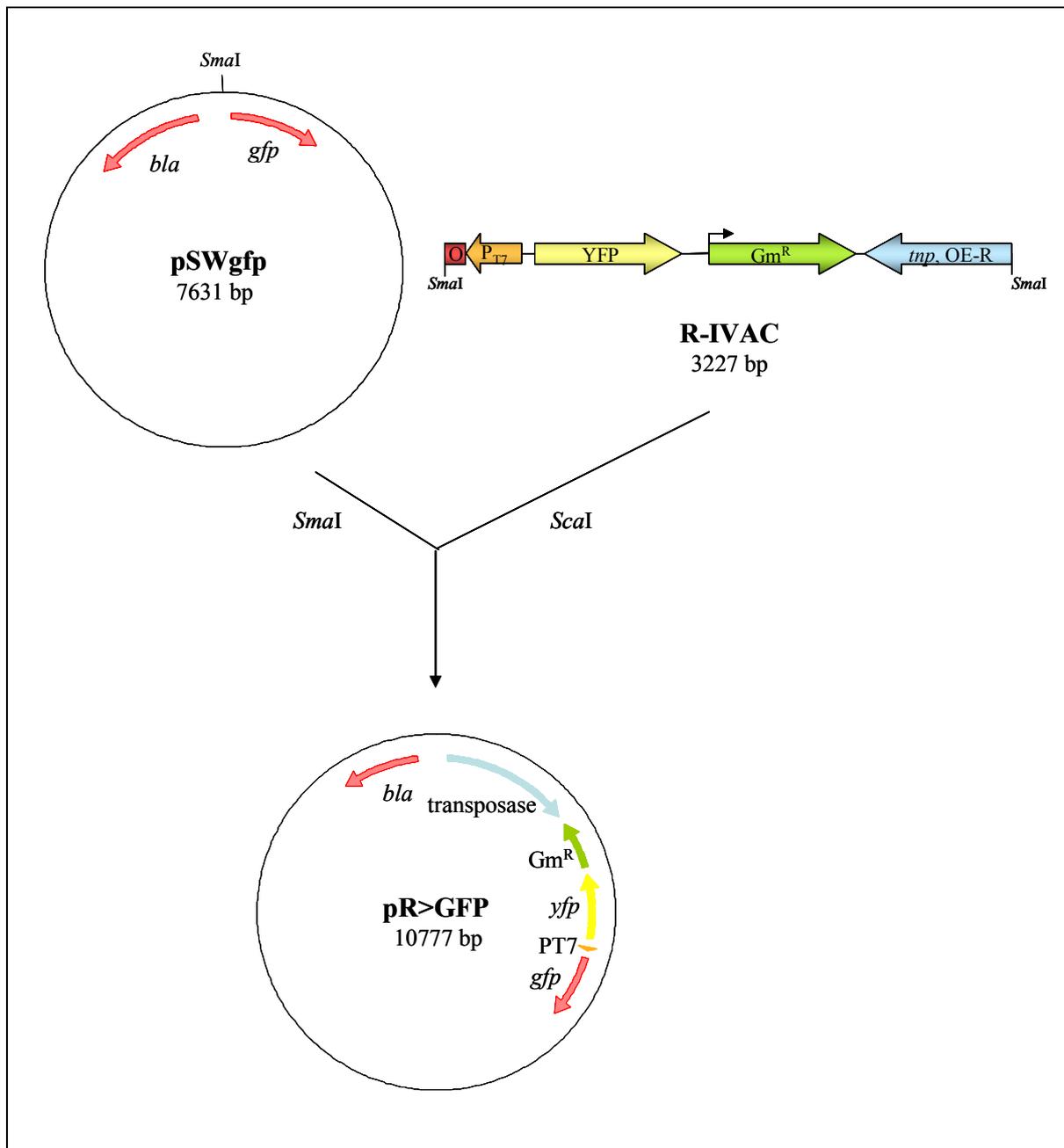


Abb. 8.3: Schema zur Konstruktion des Vektors pR>GFP. Der Vektor pSWGFP wurde durch das Restriktionsenzym *SmaI* hydrolysiert. Die R-IVAC-Kassette wurde durch Restriktion mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* aus dem Vektor pR-IVAC3 isoliert und in den Vektor pSWGFP kloniert. Da es sich bei dieser Klonierung um eine *blunt-end* Klonierung handelt, konnte die R-IVAC-Kassette in zwei unterschiedlichen Orientierungen in den Vektor pSWGFP inserieren. Durch Restriktionsanalysen wurde der Vektor pR>GFP identifiziert, in dem der T7 RNA-Polymerase-abhängiger Promotor stromaufwärts von dem Gen *gfp* lokalisiert ist.

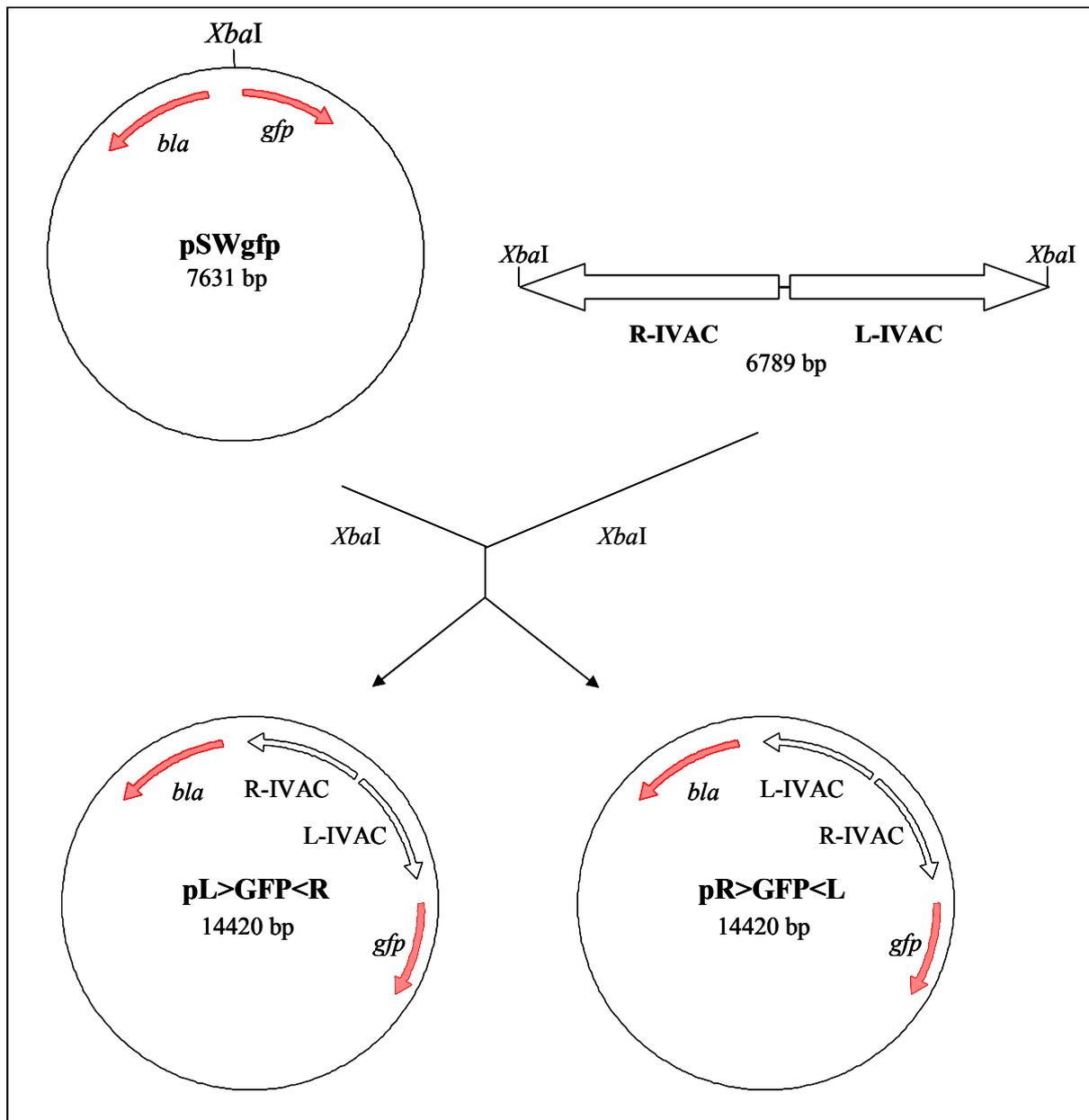


Abb. 8.4: Schema der Klonierung der IVAC-Kassetten in den Vektor pSWGFP. Durch Hydrolyse mit *Xba*I wurde der Vektor pSWGFP linearisiert und die IVAC-Kassetten aus dem Vektor pIC20HRL isoliert. Durch Ligation des Vektors pSWGFP mit den IVAC-Kassetten konnten zwei Vektoren entstehen, die sich in der Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem Gen *gfp* unterschieden. In dem Vektor pL>GFP<R wurde das Gen *gfp* von dem T7 RNA-Polymerase-abhängiger Promotor der L-IVAC-Kassette aus transkribiert, in dem Vektor pR>GFP<L von dem T7-Promotor der R-IVAC-Kassette aus.

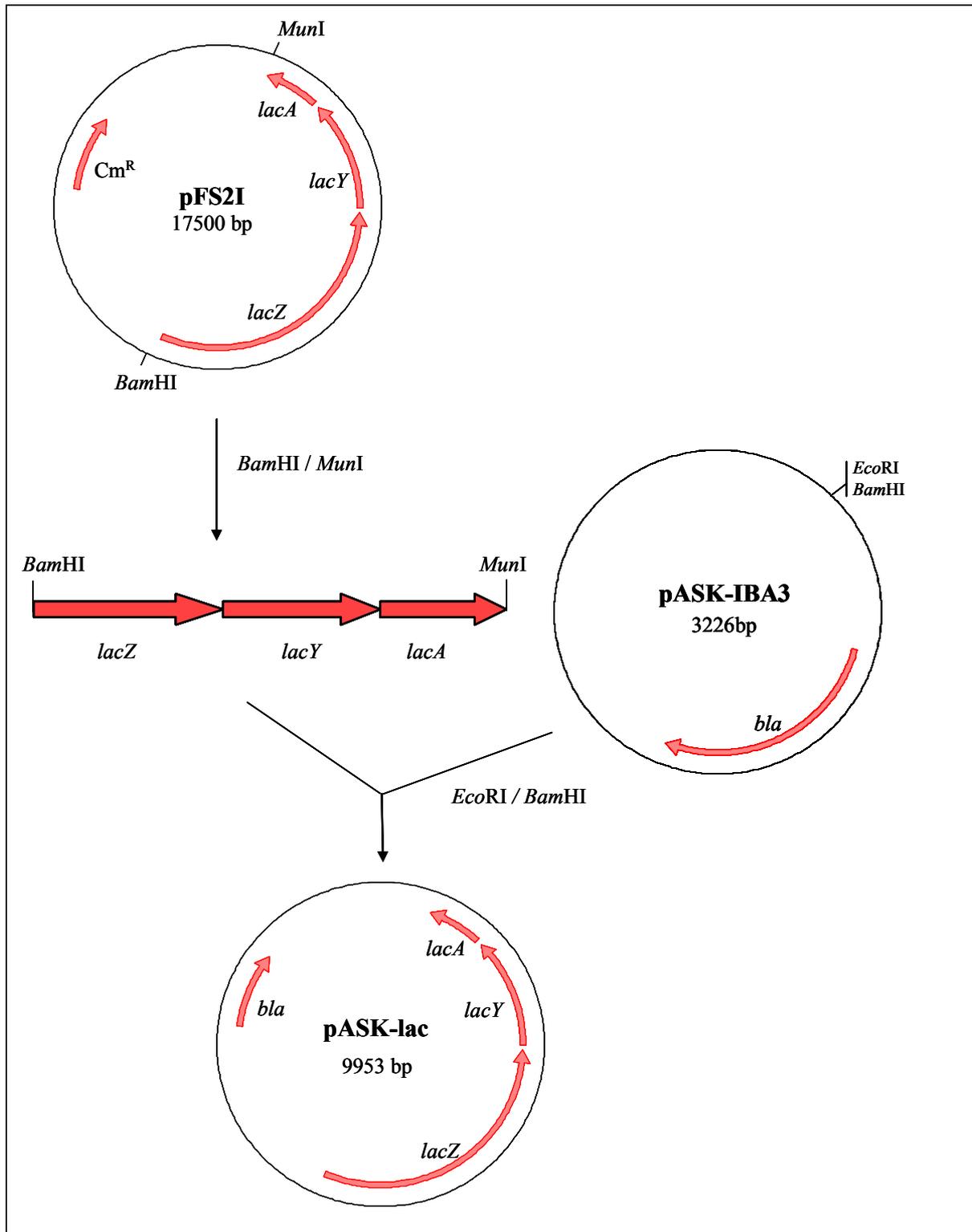


Abb. 8.5: Schema der Konstruktion des Vektors pASK-lac. Die Gene *lacZ*, *lacY* und *lacA* des *lac*-Operons wurden durch Restriktion mit den Enzymen *BamHI* und *MunI* aus dem Vektor pFS2I isoliert und in den Vektor pASK-IBA3 kloniert. Der konstruierte Vektor wurde als pASK-lac bezeichnet.

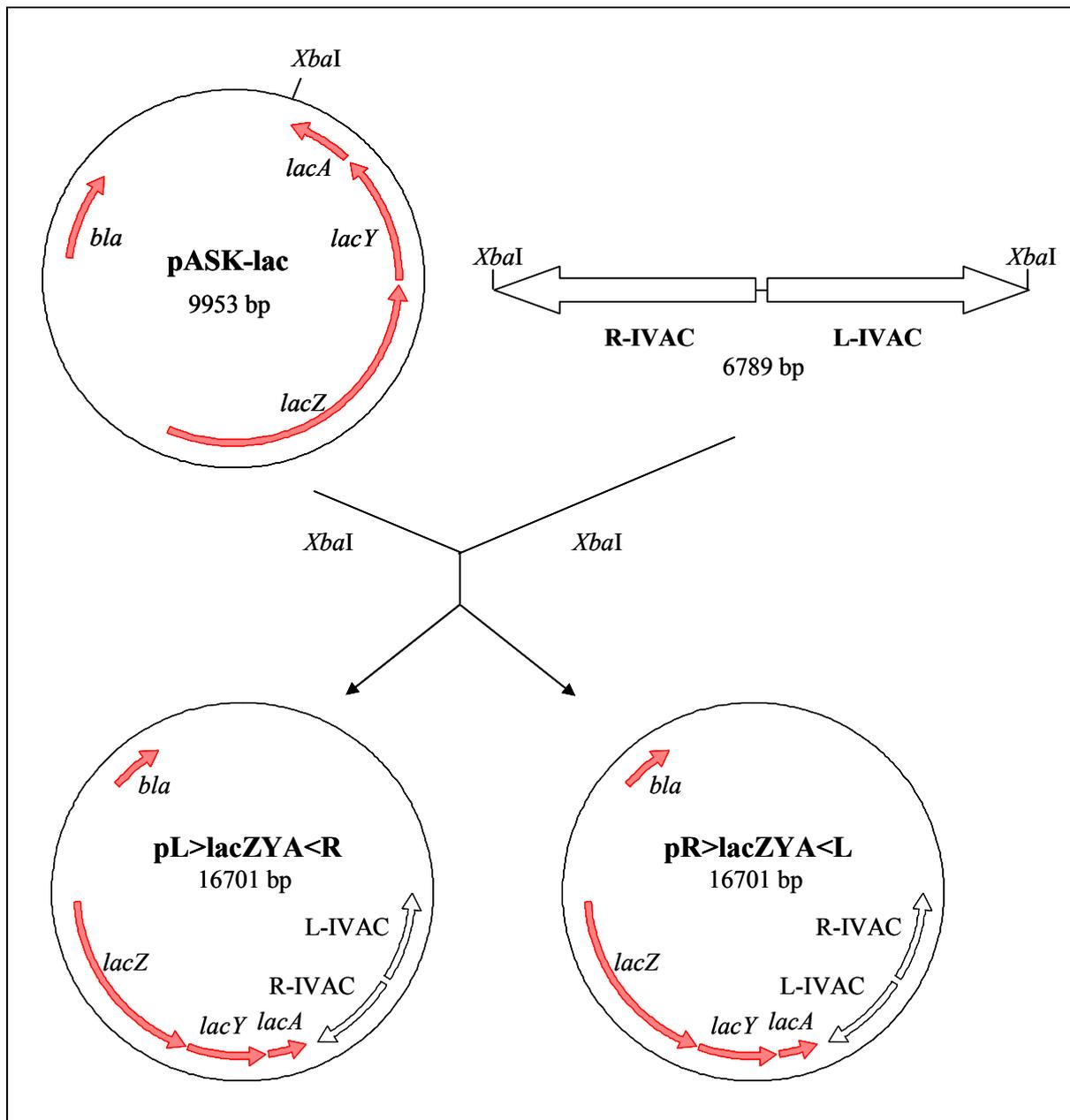


Abb. 8.6: Klonierungsschema zur Konstruktion der Vektoren pL>lacZYA<R und pR>lacZYA<L. Die IVAC-Kassetten wurden durch Hydrolyse mit dem Restriktionsenzym *XbaI* zusammenhängend aus dem Vektor pIC20HRL isoliert. Der rekombinante Vektor pASK-lac wurde ebenso durch die Restriktion mit *XbaI* linearisiert. Nach der Ligation der IVAC-Kassetten mit dem Vektor pASK-lac entstanden zwei Plasmide, die sich nur in der Orientierung der IVAC-Kassetten zu dem *lac*-Operon unterscheiden. Die L-IVAC-Kassette vermittelt in dem Plasmid pL>lacZYA<R die T7 RNA-Polymerase-abhängige Transkription der *lac*-Gene, die R-IVAC-Kassette in dem Plasmid pR>lacZYA<L.

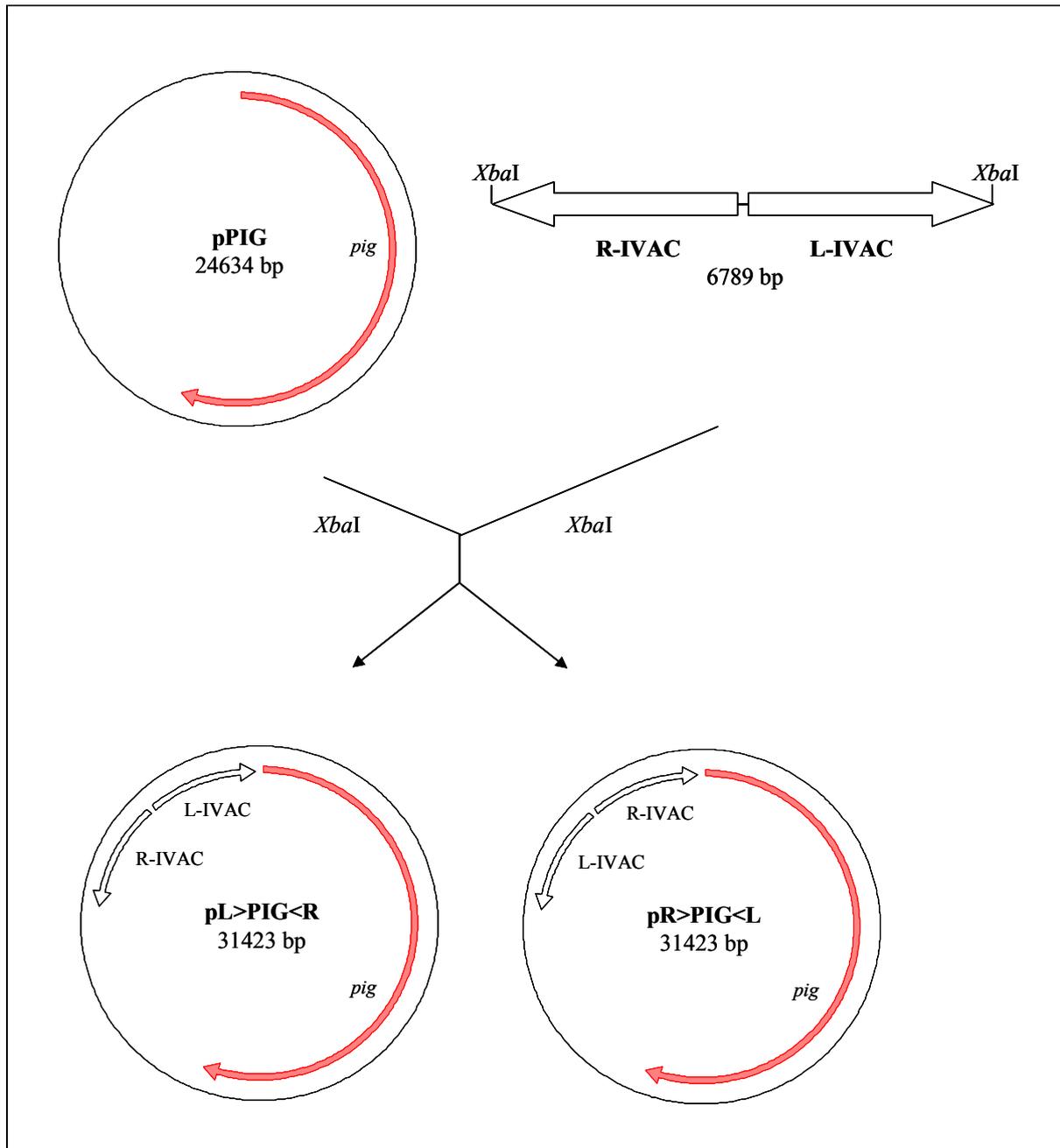


Abb. 8.7: Klonierungsstrategie zur Konstruktion der Vektoren pL>PIG<R und pR>PIG<L. Durch Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *XbaI* wurden die IVAC-Kassetten aus dem Vektor pIC20HRL isoliert und in den Vektor pPIG integriert. Die IVAC-Kassetten konnten in zwei unterschiedlichen Orientierungen inserieren. Die Plasmide wurden als pL>PIG<R bzw. pR>PIG<L bezeichnet.

Lebenslauf

Name: Annette Markert, Diplom-Biologin
geboren am: 16.02.1979
in: Bergisch Gladbach
Familienstand: ledig

Schulische und berufliche Ausbildung:

08/89 – 06/98 Ville Gymnasium Erftstadt
Allgemeine Hochschulreife

10/98 – 03/01 Grundstudium Diplom-Biologie
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

03/01 – 05/04 Hauptstudium Diplom-Biologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Schwerpunkte: Mikrobiologie
Enzymtechnologie
Biotechnologie
Organische Chemie

05/04 – 05/05 Diplomarbeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich
Thema: „*In vivo* Klonierung großer Genregionen durch Kombination
von homologer Rekombination und Transposition“

Seit 05/05 Promotion am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich im Rahmen
des BMBF geförderten Projektes „GenoMik-Plus, Genomforschung an
Mikroorganismen für industrielle Produktion, Ernährung, Umwelt und
Gesundheit“
Thema: „Etablierung eines neuen T7 RNA-Polymerase-basierten
Expressionssystems zur koordinierten Expression aller Gene einer
Genregion“

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Annette Markert

