



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Funktionelle Koexpression geclusterter Gene in verschiedenen Bakterien mithilfe des TREX-Systems

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Anita Loeschcke

aus Köln

Düsseldorf, September 2012

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 Jaeger

Korreferent: Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2012

meinem Vater

VERÖFFENTLICHUNGEN

Arvani S, Markert A, Loeschcke A, Jaeger KE & Drepper T (2012) A T7 RNA polymerase-based toolkit for the concerted expression of clustered genes. *Journal of biotechnology* **159**: 162-171.

Loeschcke A, Markert A, Wilhelm S, Wirtz A, Rosenau F, Jaeger K-E & Drepper T (2013) TREX - a universal tool for the transfer and expression of biosynthetic pathways in bacteria. *ACS Synthetic Biology* 2013, **2**, 22–33.

PRÄSENTATIONEN BEI INTERNATIONALEN KONFERENZEN

Loeschcke A, Markert A, Rosenau F, Wilhelm S, Jaeger K-E, Drepper T (2009) *Poster-Präsentation*: A novel system for the functional expression of clustered genes. 4th European Conference on Prokaryotic Genomics 'ProkaGENOMICS', Göttingen, Deutschland.

Loeschcke A, Markert A, Jaeger K-E, Drepper T (2011) *Poster-Präsentation*: A pathway transfer system that facilitates the heterologous expression of large gene clusters in a broad range of bacterial hosts. VAAM conference, Karlsruhe, Deutschland.

Loeschcke A, Markert A, Jaeger K-E, Drepper T (2011) *Poster-Präsentation*: A pathway transfer system that facilitates the heterologous expression of large gene clusters in a broad range of bacterial hosts. 2nd CLIB conference, Düsseldorf, Deutschland.

Loeschcke A, Markert A, Jaeger K-E, Drepper T (2011) *Poster-Präsentation*: A pathway transfer system that facilitates the heterologous expression of large gene clusters in a broad range of bacterial hosts. 5th European Conference on Prokaryotic Genomics 'ProkaGENOMICS', Göttingen, Deutschland.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Überlassung des interessanten wissenschaftlichen Themas, die sehr guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie, sowie für sein stetiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Martina Pohl danke ich für die Übernahme des Korreferats und die wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge.

Dem CLIB-Graduate Cluster danke ich für mein Promotionsstipendium und die einhergehende finanzielle Unterstützung des Projektes. Frau Sonja Meyer zu Berstenhorst danke ich besonders für die engagierte Koordination.

Herrn Dr. Thomas Drepper danke ich für die überaus engagierte Betreuung während meiner gesamten Doktorarbeit, für das Schaffen einer kreativen und freundschaftlichen Arbeitsatmosphäre, sowie für die Vermittlung eines wissenschaftlichen Arbeitsethos, der durch Faszination und Verantwortung bestimmt ist.

Ich danke allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der AG Drepper für ihre Hilfsbereitschaft, das gegenseitige Interesse und dafür, dass es mit dieser Arbeitsgruppe nie langweilig wird! Ich danke speziell Frau Dr. Annette Markert, Frau Dr. Nadine Katzke, Frau Dr. Solmaz Arvani, Herrn Franco Circolone, Herrn Janko Potzkei, Herrn Stephan Endres, Frau Anuschka Malach und Herrn Marcus Wingen. Mein besonderer Dank für ihre Hilfe gilt Frau Vera Svensson, Herrn Dr. Achim Heck und Herrn Dr. René Bergmann. Herrn Dennis Binder danke ich für die hervorragende Durchführung seiner Bachelorarbeit und die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern des IMET für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken, im Besonderen den wunderbaren Insassen von Büro 501.

Schließlich danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meiner Liebe Marco für die Unterstützung, die Geduld, den Zuspruch und ihr Interesse an meiner Arbeit während der gesamten Studien- und Promotionszeit!

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGEN	IV
I EINLEITUNG	1
I.1 RELEVANZ MIKROBIELLER NATURSTOFFE	1
I.2 KODIERUNG VON SEKUNDÄRMETABOLIT-SYNTHESEWEGEN DURCH GENCLUSTER.....	3
I.3 BEDEUTUNG VON CAROTINOIDEN.....	5
I.3.1 Struktur der Carotinoide	5
I.3.2 Vorkommen und Funktionen von Carotinoiden	6
I.3.3 Verwendung von Carotinoiden	6
I.3.4 Herstellung von Carotinoiden	7
I.3.5 Das Carotinoidbiosynthese-Gencluster aus <i>Pantoea ananatis</i>	8
I.4 GEWINNUNG VON NATURSTOFFEN: HETEROLOGE EXPRESSION VON GENCLUSTERN.....	10
I.4.1 Gewinnung eines Biosynthese-kodierenden Genclusters.....	10
I.4.2 Finden eines heterologen Expressionswirts.....	11
I.4.2.1 Aufnahme fremder DNA	11
I.4.2.2 Stabiler Erhalt fremder DNA.....	12
I.4.2.3 Transkription eines fremden Genclusters.....	13
I.4.2.4 Translation von mRNA fremden Ursprungs.....	15
I.4.2.5 Korrekte Biokatalyse durch heterologe Enzyme	15
I.5 DAS TREX-SYSTEM – <i>TRANSFER AND EXPRESSION</i> VON GENCLUSTERN	17
I.5.1. Markierung des Genclusters	18
I.5.2. Transfer des Genclusters in den Expressionswirt durch Konjugation.....	19
I.5.3. Integration des Genclusters im bakteriellen Chromosom durch Transposition	20
I.5.4. Konvergente Expression des Genclusters durch die T7 RNA Polymerase.....	21
I.6 ANSATZ ZUR EVALUIERUNG DES TREX-SYSTEMS	22
I.6.1 Für die Evaluierung des TREX-Systems verwendete Expressionswirte.....	23
I.6.1.1 <i>Pseudomonas putida</i>	23
I.6.1.2 <i>Rhodobacter capsulatus</i>	24
I.6.1.3 <i>Escherichia coli</i>	26
I.7 MÖGLICHE WEITERENTWICKLUNGEN DES TREX-SYSTEMS	27

I.7.1 Genregulation durch Licht.....	29
I.8 ZIELSETZUNG	31
II MATERIAL & METHODEN	32
II.1 Chemikalien, Lösungsmittel und Verbrauchsmittel	32
II.2 Verwendete Bakterienstämme	32
II.3 Verwendete Plasmide	33
II.4 Verwendete Oligonukleotide	34
II.5 Allgemeine Anzucht von Bakterien	35
II.5.1 Anzucht von <i>E. coli</i> , <i>P. putida</i> und <i>R. capsulatus</i>	35
II.5.2 Nährmedien.....	35
II.5.3 Antibiotika	36
II.5.4 Induktoren.....	36
II.6 Spezielle Anzucht von Bakterien	36
II.6.1 Kultivierung von <i>P. putida</i> und <i>E. coli</i> für <i>crt</i> -Expressionsstudien.....	36
II.6.2 Kultivierung von <i>R. capsulatus</i> zur Untersuchung der Carotinoid-Physiologie.....	37
II.6.3 Kultivierung von <i>R. capsulatus</i> für <i>crt</i> -Expressionsstudien	37
II.6.4 Kultivierung von <i>E. coli</i> zur Charakterisierung der Expressionsprofile verschiedener T7-Stämme	37
II.6.5 Kultivierung von <i>E. coli</i> für die Untersuchung von Licht-abhängiger Genexpression	38
II.7 Einbringen von DNA in Bakterien.....	38
II.7.1 Transformation.....	38
II.7.2 Konjugative Übertragung von Plasmid-DNA zu <i>P. putida</i>	38
II.7.3 Konjugative Übertragung von Plasmid-DNA zu <i>R. capsulatus</i>	38
II.7.3.1 Überprüfung der Sequenz von <i>crtZ</i> im Chromosom von <i>RcTREXcrtΔX</i>	39
II.7.4 Bestimmung der Effizienz von Konjugation und Transposition	39
II.7.5 Erzeugung von <i>EcTREXcrtΔZ</i>	39
II.7.6 Nachweis der TRES-vermittelten Etablierung von <i>crt</i> -Genen in den Expressions-Wirten.....	39
II.7.6.1 Bestimmung des Insertionsortes der <i>crt</i> -Gene im bakteriellen Chromosom	40
II.8 Manipulation von DNA.....	40
II.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	40
II.8.2 Isolierung von genomischer DNA.....	40
II.8.3 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
II.8.4 Rekombination von DNA <i>in vitro</i>	41

II.8.5 Agarosegelelektrophoretische Auftrennung von DNA	41
II.9 Proteinbiochemische Methoden.....	41
II.9.1 SDS-PAGE (<i>Sodium-dodecyl-sulfate</i> - Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	41
II.9.2 Immunologischer Proteinnachweis (<i>Western Blot</i>)	41
II.10 Carotinoid-Analytik	42
II.10.1 Messung von Absorptionsspektren.....	42
II.10.2 Bestimmung von Carotinoid-Ausbeuten	42
II.10.3 Flüssigchromatographie-Messungen (<i>high performance liquid chromatography</i> , HPLC) ...	43
II.10.4 Dünnschichtchromatographie.....	45
II.11 Transkriptanalyse: RT-qPCR (<i>reverse transcription-quantitative PCR</i>).....	46
II.12 Messung der <i>in vivo</i> -Fluoreszenz von <i>E. coli</i> -Expressionskulturen	48
II.13 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität in <i>E. coli</i> -Expressionskulturen	48
II.14 Verwendete Datenbanken, <i>software</i> und <i>online tools</i>	49
III ERGEBNISSE	50
III.1 STRATEGIE ZUR UMSETZUNG TREX-VERMITTELTER <i>crt</i> -GENEXPRESSION	50
IN VERSCHIEDENEN BAKTERIELLEN WIRTEN.....	50
III.2 TREX-VERMITTELTE CAROTINOID-PRODUKTION MIT <i>P. PUTIDA</i>	53
III.2.1 Markierung des Carotinoid-Genclusters für TREX-Anwendung.....	53
III.2.2 Erzeugung Carotinoid-produzierender <i>P. putida</i> Stämme	54
III.2.3 Konstruktion eines T7 RNA Polymerase-kodierenden <i>broad host range</i> Vektors für eine...	55
TREX-vermittelte Genexpression	55
III.2.4 Charakterisierung verschiedener Produktions-Phänotypen.....	57
nach randomisierter <i>crt</i> -Insertion in <i>P. putida</i>	57
III.2.5 Bestimmung der Carotinoid-Produktionskapazität von TREX-manipulierten <i>P. putida</i> -	
Stämmen	59
III.2.6 Untersuchung der bidirektionalen <i>crt</i> -Transkription in <i>PpTREXcrtΔX</i> -Stämmen.....	62
III.2.7 Analyse der Carotinoide in <i>PpTREXcrtΔX</i> -Stämmen.	64
III.2.8 TREX-vermittelte β -Carotin-Produktion mit <i>P. putida</i>	66
III.3 TREX-VERMITTELTE CAROTINOID-PRODUKTION MIT <i>R. CAPSULATUS</i>	69
III.3.1 Die physiologische Carotinoid-Biosynthese in <i>R. capsulatus</i>	69
III.3.2 Die Carotinoid-Biosynthese der Mutante <i>R. capsulatus ΔcrtC</i>	71
III.3.3 Etablierung des <i>crt</i> -Genclusters aus <i>P. ananatis</i> in <i>R. capsulatus ΔcrtC</i>	73
III.3.4 Charakterisierung der Carotinoid-Produktion mit <i>RcTREXcrtΔX</i>	73

III.4 TREX-VERMITTELTE CAROTINOID-PRODUKTION MIT <i>E. COLI</i>	79
III.4.1 Etablierung des <i>P. ananatis-crt</i> -Clusters in <i>E. coli</i>	79
III.4.2 Charakterisierung der Carotinoid-Produktion mit <i>EcTREXcrtΔZ</i>	80
III.5 VERGLEICHENDE ANALYSE DER TREX-VERMITTELTEN CAROTINOID-PRODUKTION MIT	83
VERSCHIEDENEN WIRTEN	83
III.6 KONTROLLE VON GENEXPRESSION DURCH LICHT	85
III.6.1 Etablierung eines geeigneten Systems für Licht-regulierte Genexpression in <i>E. coli</i>	86
III.6.2 Untersuchung von Licht-regulierter Genexpression in <i>E. coli</i>	89
IV DISKUSSION	92
IV.1 EVALUATION DER TREX-ANWENDUNG	93
IV.1.1 Markierung des <i>crt</i> -Genclusters	93
IV.1.2 (Konjugativer) Transfer des <i>crt</i> -TREX-Konstruktes zu Expressionswirten	95
IV.1.3 Transposition des rekombinanten <i>crt</i> -TREX-Transposon in das Wirtschromosom	96
IV.1.4 Vollständige Expression des <i>crt</i> -Genclusters durch die T7 RNA Polymerase	98
IV.1.4.1 Wie effizient ist die bidirektionale Expression eines Genclusters durch die T7RP?	99
IV.1.4.2 Ist die Expression größerer Gencluster durch die T7RP möglich?	100
IV.1.4.3 Wie entstehen Transkriptmuster?	102
IV.1.5 TREX-vermittelte Carotinoid-Biosynthese in verschiedenen heterologen Wirten	104
IV.1.5.1 Translation heterologer mRNA	104
IV.1.5.2 Generierung aktiver Enzyme	106
IV.1.5.3 Etablierung des Carotinoid-Biosyntheseweges in den heterologen Wirten	107
IV.1.6 Zusammenfassung der Limitierungen des TREX-Systems	108
IV.2 EVALUATION DER CAROTINOID-AUSBEUTEN	109
IV.3 PERSPEKTIVEN DER NATURSTOFF-ERSCHLIESSUNG	110
IV.3.1 <i>Screening</i> mit verschiedenen Wirten	111
IV.3.2 Optimierung der Produktionsleistung	111
IV.3.3 Möglicher kombinatorischer Kompromiss mit TREX 2.0?	112
V ZUSAMMENFASSUNG	115
VI LITERATURVERZEICHNIS	118

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG

Abb. I-1: Molekülstruktur und Vorkommen von Carotinoiden	5
Abb. I-2: Das <i>crt</i> -Gencluster aus <i>Pantoea ananatis</i> und der dadurch kodierte Biosyntheseweg	9
Abb. I-3: Überexpression eines 16 kb-Genclusters durch die T7RP	14
Abb. I-4: Schematische Darstellung des biotechnologischen Zugangs zu mikrobiellen Naturstoffen.....	16
Abb. I-5: Schematische Darstellung des Ablaufs der TREX-Anwendung.....	17
Abb. I-6: Aufbau der TREX-Kassetten	18
Abb. I-7: Vektor pIC20H-RL, der beide TREX-Kassetten trägt	19
Abb. I-8: Die Carotinoid-Biosynthese in <i>R. capsulatus</i>	25
Abb. I-9: Schematische Darstellung des Nachweises einer Verminderung des Transkriptlevels eines Reporters bei konzertierter bidirektionaler Expression durch die T7 RNA Polymerase	27
Abb I-10: Lichtabhängige Genexpression mit dem synthetischen Photorezeptor YF1.....	30

II MATERIAL UND METHODEN

Abb. II-1: HPLC-Chromatogramme und PDA-Spektren der analysierten Carotinoid-Standards.....	44
Abb. II-2: Übersicht über die Qualitätskontrolle der (RT-)qPCR-Messungen.....	47

III ERGEBNISSE

Abb. III-1: Schematische Übersicht über die Strategie zur Umsetzung komparativer <i>crt</i> -Expressionsstudien in <i>P. putida</i> , <i>R. capsulatus</i> und <i>E. coli</i> mittels TREX.....	52
Abb. III-2: Vektor pTREX- <i>crt</i> Δ X für den TREX-Transfer des Carotinoid-Biosynthesewegs aus <i>P. ananatis</i> zu heterologen Produktionswirten	54
Abb. III-3: Die rekombinanten Stämme <i>PpTREXcrt</i> Δ X -a, -b, und -c	55
Abb. III-4: <i>Low copy</i> T7RP-Expressionsplasmid pML5- <i>P</i> _{lac} T7 für <i>broad host range</i> TREX-Anwendungen	56
Abb. III-5: Wachstum und Carotinoid-Produktion der Stämme <i>PpTREXcrt</i> Δ X -a, -b, und -c.....	57
Abb. III-6: Nachweis der T7 RNA Polymerase in <i>PpTREXcrt</i> Δ X-c	58
Abb. III-7: Carotinoid-Akkumulation der Stämme <i>PpTREXcrt</i> Δ X-a, -b und -c bei verlängerter Expressionsdauer	60
Abb. III-8: Carotinoid-Produktion der Stämme <i>PpTREXcrt</i> Δ X-d bis -j.....	60
Abb. III-9: Konstruktion und Charakterisierung des mid copy T7RP-Expressionsplasmids pBBR1MCS3-T7 für die TREX-vermittelte Carotinoid-Produktion.....	61
Abb. III-10: Quantitative Analyse der <i>crt</i> -Transkripte in <i>PpTREXcrt</i> Δ X-a, -b and -c	63
Abb. III-11: <i>rpoD</i> -Transkriptanalyse in <i>PpTREXcrt</i> Δ X-a, -b und -c	64

Abb. III-12: Analyse der Carotinoide in <i>PpTREXcrtΔX</i> -a, -b und -c	65
Abb. III-13: Analyse der Carotinoide in <i>PpTREXcrtΔZ</i>	67
Abb. III-14: Charakterisierung der physiologischen Carotinoid-Biosynthese in <i>R. capsulatus</i> B10S	70
Abb. III-15: Verifizierung der Neurosporin-Akkumulation in <i>R. capsulatus ΔcrtC</i>	72
Abb. III-16: Analyse der Carotinoid-Biosynthese in <i>RcTREXcrtΔX</i> bei aerober Anzucht	75
Abb. III-17: Analyse der Carotinoid-Biosynthese in <i>RcTREXcrtΔX</i> bei photoheterotropher Anzucht	77
Abb. III-18: Analyse der Carotinoid-Biosynthese in <i>EcTREXcrtΔZ</i>	81
Abb. III-19: Expressionsprofile von <i>E. coli</i> BL21(DE3), Tuner(DE3) und JM109(DE3).....	87
Abb. III-20: Expressionsprofil von <i>E. coli</i> Tuner (DE3) mit <i>lacI</i> -tragendem Expressionsvektor	88
Abb. III-21: Vektor pRcExpII-2-YF1-FixJ- P_{fixK2} -LacZ für Licht-abhängige Genexpression.....	89
Abb. III-22: Durch ein Zwei-Komponenten-System Licht-abhängig gesteuerte Reporteraktivität	90
IV DISKUSSION	
Abb. IV-1: Restriktionsendonuklease-unabhängige Klonierungsmethoden	95
Abb. IV-2: Schematische Darstellung der Struktur des Transposon Tn5	97
Abb. IV-3: TREX-vermittelte Prodigiosin-Synthese in <i>P. putida</i>	101
Abb. IV-4: Etablierung eines Transkriptmusters über das Hydrogenase-Gencluster in <i>R. capsulatus</i> ..	104
Abb. IV-5: Abweichung des Codon-Gebrauchs der Expressionswirte im Vergleich zum Codon-Gebrauch im <i>crt</i> -Gencluster aus <i>P. ananatis</i>	105
Abb. IV-6: Carotinoid-Gehalt verschiedener Wirte bei T7RP-vermittelter <i>crt</i> -Genexpression mittels TREX.....	108

TABELLENVERZEICHNIS

I EINLEITUNG

Tab. I-1: Auswahl bakterieller Naturstoffe, auf deren Basis zugelassene Therapeutika entwickelt wurden	2
Tab. I-2: Auswahl bakterieller Gencluster, die unterschiedliche Größen und Strukturen aufweisen	4
Tab. I-3: Verschiedene Methoden, fremde DNA in bakterielle Zellen einzubringen	12

II MATERIAL UND METHODEN

Tab. II-1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und deren relevante Eigenschaften	32
Tab. II-2: Übersicht über die verwendeten Plasmide und deren relevante Eigenschaften	33
Tab. II-3: Übersicht über die genutzten Oligonukleotide, deren Sequenz und deren Verwendung	34
Tab. II-4: Verwendete Endkonzentrationen (in µg/ml) der für verschiedene Bakterien verwendeten Antibiotika	36
Tab. II-5: Übersicht über die Absorptionsmaxima der analysierten Carotinoide in Ethanol	42
Tab. II-6: Übersicht über physikochemische Eigenschaften der zu quantifizierenden Carotinoide	43
Tab. II-7: Übersicht über die PSA (<i>polar surface area</i>) der analysierten Pigmente	45

III ERGEBNISSE

Tab. III-1: <i>crt</i> -Insertionsorte und resultierende Deletionen in <i>PpTREXcrtΔX</i> -a, -b und -c.....	59
Tab. III-2: Vergleich der TREX-vermittelten Carotinoid-Produktion mit verschiedenen Wirten	83
Tab. III-3: Relevante Eigenschaften für <i>lac</i> -abhängige, T7RP-vermittelte Genexpression in <i>E. coli</i>	86

IV DISKUSSION

Tab. IV-1: GC-Gehalt der Genome der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme	105
--	-----

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser (lat.: <i>aqua destillata</i>)
a. E.	arbiträre (beliebige) Einheiten
Ap ^R	Ampicillin-Resistenzgen
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
DCW	Zell-Trockenmasse (engl.: <i>dry cell weight</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
g	Gramm
Gm ^R	Gentamycin-Resistenzgen
h	Stunde(n) (lat.: <i>hora</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
Km ^R	Kanamycin-Resistenzgen
kb	Kilobasen
L	Liter
LB	Luria-Bertani Broth
m	milli
M	Molar (mol/Liter)
mAU	milli <i>absorbance units</i> (engl.)
MCS	<i>multiple cloning site</i> (engl.)
Min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (engl.)
MW	Molekulargewicht
n	nano
OD	Optische Dichte (Schichtdicke 1 cm, Messvolumen 1 ml)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
Sm ^R	Streptomycin-Resistenzgen
Sp ^R	Spectinomycin-Resistenzgen
Tab.	Tabelle
Tc ^R	Tetrazyklin-Resistenzgen
Tnp	Transposase
TREX	<i>transfer and expression</i> (engl.)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	<i>transport RNA</i> (engl.)
T7RP	T7 RNA Polymerase
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	ultraviolett/sichtbar (engl.: <i>ultraviolet/visible</i>)
v/v	Volumen pro Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)
μ	mikro

I EINLEITUNG

I.1 RELEVANZ MIKROBIELLER NATURSTOFFE

Naturstoffe sind chemische Substanzen, die von Organismen gebildet werden, um biologische Funktionen zu erfüllen. Es kann zwischen den primären Naturstoffen, die für den Lebenserhalt notwendig sind und somit in allen Organismen vorkommen (einige 100 Verbindungen), und den mannigfaltigen sekundären Naturstoffen, die nicht am essentiellen Lebenserhalt beteiligt sind, sondern verschiedenste Funktionen erfüllen, unterschieden werden. Diese historische Einteilung, die auf Albrecht Kossel (1891) zurückgeht, ist dabei nicht als trennscharf zu verstehen. Die Sekundärmetabolite können z. B. als Repellantien, Toxine oder Pheromone hochspezialisiert wirken und damit dem Produzenten einen speziellen Selektionsvorteil verschaffen.

Bereits in frühesten Kulturen entdeckte der Mensch die vielseitigen Möglichkeiten der Verwendung solcher Substanzen zu medizinischen Zwecken. So werden seit Jahrtausenden Kräuter und Pflanzen als Heilmittel eingesetzt (Newman *et al.*, 2000; Heinrich & Gibbons, 2001). Manche Populationsgruppen profitierten auch von antibiotisch aktiven Biomolekülen, die durch Mikroorganismen in lagerndem Getreide angereichert wurden (Bassett *et al.*, 1980). Heute spielen Naturstoffe eine wichtige Rolle in der gezielten Entwicklung von Arzneimitteln. So waren z. B. über 70 % der von 1981-2010 zugelassenen antitumoralen Therapeutika Naturstoffe oder Derivate solcher (Newman & Cragg, 2012). Weiterhin können bestimmte Naturstoffe z. B. als Antibiotika, Immunsuppressiva, Cholesterin-Senker, antiparasitäre, antifungale oder antivirale Wirkstoffe eingesetzt werden (Brahmachari, 2009).

Neben Pflanzen und Tieren stellen Mikroorganismen verschiedene Klassen von Sekundärmetaboliten wie Peptide, Nukleoside, Alkaloide und Aromaten her. Darunter ist auch eine Vielzahl pharmakologisch interessanter Verbindungen (Lam, 2007; Butler & Newman, 2008; Harvey, 2008). Heute sind ca. 200.000 verschiedene bioaktive Naturstoffe bekannt, von denen ca. 25.000 von Mikroorganismen synthetisiert werden (Bérdy, 2005). Die bislang pharmakologisch genutzten mikrobiellen Sekundärmetabolite sind in der Mehrzahl Antibiotika, neben denen sich weiterhin z. B. antitumorale oder als Statine (zur Cholesterin-Senkung verabreicht) wirksame Biomoleküle finden (Brahmachari, 2009; Vaishnav & Demain, 2011). **Tabelle I-1** zeigt eine Auswahl von bakteriellen Naturstoffen, auf deren Basis Medikamente entwickelt und im Zeitraum von 2004 bis 2007 auf den Markt gebracht wurden. Eine besonders prominente Rolle spielt hier die Gruppe der Polyketide, zu denen auch die gezeigten Makrolide zählen.

Tab. I-1: Auswahl bakterieller Naturstoffe, auf deren Basis zugelassene Therapeutika entwickelt wurden

(nach Brahmachari, 2009)

Naturstoff (Wirkstoff- Klasse)	abgeleitetes Medikament	Produzent	Anwendung	Referenz
Tetrazyklin (Aromatisches Polyketid)	Tygacil [®]	<i>Streptomyces aureofaciens</i> (Actinomycetales)	antibakteriell	Sum et al. (1994); Slover et al. (2007)
Erythromycin A (Makrolid)	Ketek [®]	<i>Saccharopolyspora erythaea</i> (Actinomycetales)	antibakteriell	Raja et al. (2004)
Epothilon B (Makrolid)	Ixempra [™]	<i>Sorangium cellulosum</i> (Myxobakterium)	antitumoral	Höfle et al. (1996); Goodin (2008)
Sirolimus (Makrolid)	Torisel [™]	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Actinomycetales)	anti-Cicatrix (Kardiovaskular- Chirurgie)	Chen et al. (2007)

Da geschätzt wird, dass bislang nur ein Bruchteil von möglicherweise 1 % der mikrobiellen Welt kultiviert und untersucht werden konnte (Amann *et al.*, 1995; Handelsman, 2004) und hier aber im Zuge der Anpassung an verschiedenste Habitate ein hochdiversifiziertes Spektrum an sekundären Stoffwechselwegen vorliegt, mag man für die Zukunft die Entdeckung mannigfacher und vielfältig interessanter mikrobieller Naturstoffe prognostizieren (Reddy *et al.*, 2012). Besonders der marine Lebensraum ist bei der Suche nach bioaktiven Substanzen in den Fokus der Forschung gerückt (Pettit, 2011; Amedei & D'Elis, 2012). Hier scheinen vor allem mikrobielle Symbionten eine vielversprechende Quelle für interessante Biomoleküle darzustellen (Piel, 2004; Blunt *et al.*, 2012).

Der unmittelbare Zugang zu solchen Biomolekülen zu deren Studium ist limitiert, da natürlich gewachsenes biologisches Material, aus dem die Naturstoffe extrahiert werden können, nur begrenzt zur Verfügung steht. Alternativ können die mikrobiellen Produzenten isoliert und kultiviert werden. Allerdings ist auf diese Weise die Gewinnung der gewünschten Biomoleküle ebenfalls nur eingeschränkt möglich, da die betreffenden Mikroorganismen häufig nur sehr geringe Mengen des gewünschten Stoffes unter speziellen, häufig unbekanntenen Bedingungen produzieren oder grundsätzlich nicht kultivierbar sind (Handelsman, 2004; Ruiz *et al.*, 2010; Behnken & Hertweck, 2012). Daher besteht großes Interesse an der Entwicklung neuer biotechnologischer Methoden, die eine vereinfachte Gewinnung beliebiger Naturstoffe ermöglichen (Carter, 2011; Piel, 2011), wie in Kapitel I.4 näher beschrieben wird.

I.2 KODIERUNG VON SEKUNDÄRMETABOLIT-SYNTHESEWEGEN DURCH GENCLUSTER

In Mikroorganismen sind die Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten üblicherweise durch mehrere Gene derselben Genregion kodiert (Osbourn, 2010). Eine derartige lokale Gruppierung funktionell gekoppelter Gene wird als Gencluster bezeichnet.

Generell können Gencluster neben anabolen auch katabole Stoffwechselwege kodieren, sowie auch Enzymkomplexe, die sich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzen (Colbeau *et al.*, 1993; Ghosh *et al.*, 2011). Interessanterweise ist das Vorkommen von Genclustern jedoch nicht auf Mikroorganismen beschränkt; sie konnten vielmehr in sämtlichen Reichen des Lebens gefunden werden (von filamentösen Pilzen über Nematoden zu Pflanzen und Säugetieren) (Hurst *et al.*, 2004).

Die Größe sowie die Komplexität verschiedener mikrobieller Gencluster können stark variieren. Mikrobielle Gencluster, die für einen Sekundärmetabolit-Biosyntheseweg kodieren, können wenige Kilobasen (kb) bis über 100 kb umfassen (Ōmura *et al.*, 2001). Grundsätzlich umfasst ein Gencluster die Strukturgene, die für die eigentlichen Enzyme eines Stoffwechselweges oder Enzymkomplexes kodieren, sowie in vielen Fällen auch weitere Gene, deren Genprodukte nicht direkt an der Biosynthese beteiligt sind, sondern eine regulatorische oder auxiliäre Funktion, wie z. B. die Faltungshilfe und Assemblierung von Proteinen und Enzymkomplexen, ausüben (auch: akzessorische Gene). Außerdem bilden nicht-kodierende regulatorische DNA-Elemente wie Promotoren oder Transkriptionsterminatoren ebenfalls funktionelle Teile eines Genclusters. Diese können Gencluster in mehrere Operons gliedern, deren Transkription differentiell reguliert ist (Igarashi *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2012). Häufig liegen diese Transkriptionseinheiten in verschiedenen Orientierungen vor.

Tabelle I-2 zeigt die Größe und Struktur einiger bakterieller Gencluster im Überblick. Beispielsweise weist das Novobiocin-Gencluster eine intermediäre Größe (23 kb) und moderate Komplexität auf, indem sämtliche Gene in derselben Orientierung angeordnet sind. Das Zeaxanthin-Diglykosid-Gencluster ist ein Beispiel für ein vergleichsweise kleines Gencluster (7 kb); dabei weist es insofern eine komplexere Struktur auf, als dass es Gene mit entgegengesetzter Orientierung enthält. Das 20 kb große Prodigiosin-Gencluster besteht aus Genen derselben Orientierung und einem distal auswärts orientierten Gen. Die Gencluster der Oxytetracyclin- (32 kb) und Erythromycin- (56 kb) Biosynthese sind Beispiele für größere, hochkomplexe Genregionen, die aus diversen unterschiedlich orientierten Transkriptionseinheiten aufgebaut sind. Das Rapamycin-Gencluster schließlich ist ebenfalls ein komplexes Gencluster, das einige ausnehmend große Gene enthält und gehört zu den sehr großen Beispielen (107 kb).

Tab. I-2: Auswahl bakterieller Gencluster, die unterschiedliche Größen und Strukturen aufweisen

Die Gencluster sind schematisch dargestellt; die Orientierung der Gene ist farblich gekennzeichnet.

Produkt der Biosynthese	Größe [kb]	Struktur	Referenz
Novobiocin	23		Steffensky <i>et al.</i> (2000)
Zeaxanthin-Diglykosid	7		Misawa <i>et al.</i> (1990)
Prodigiosin	20		Harris <i>et al.</i> (2004)
Oxytetracyclin	32		Petković <i>et al.</i> (2006)
Erythromycin	56		Reeves <i>et al.</i> (1999)
Rapamycin	107		Schwecke <i>et al.</i> (1995)

Die Erfassung solcher Gencluster wurde in den letzten Jahren durch Technik- und Wissens-Fortschritte beschleunigt: Die enormen Neuerungen der Sequenzier-Techniken und damit verfügbaren Datenmengen (Stein, 2010) ermöglichen die Suche nach und Annotierung von Genclustern in (Meta)genom-Datenbanken (Ōmura *et al.*, 2001; Starcevic *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2009; Reddy *et al.*, 2012). Heute sind über 2.000 bakterielle Genome vollständig sequenziert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>). Die Sequenzdaten in Kombination mit einem zunehmenden Verständnis von Biosyntheseprozessen, wie z. B. der Polyketid-Synthese, und dem modularen Aufbau von entsprechenden Genclustern erlauben mittlerweile sogar, von der DNA-Sequenz ausgehend Vorhersagen über die Endprodukte eines Gencluster-kodierten Biosyntheseapparates zu machen (Nguyen *et al.*, 2008; Starcevic *et al.*, 2008).

I.3 BEDEUTUNG VON CAROTINOIDEN

Carotinoide stellen eine medizinisch und biotechnologisch interessante Gruppe natürlicher Pigmente dar. Die gelben bis roten Pigmente werden von vielen Mikroorganismen, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert.

I.3.1 Struktur der Carotinoide

Carotinoide sind Isoprenoide, die aus einer Kohlenwasserstoffkette mit konjugierten Doppelbindungen bestehen. Bislang sind mehr als 700 Carotinoid-Strukturen bekannt (Britton *et al.*, 2004), wobei es sich bei der Mehrzahl um Tetraterpene handelt, deren Gerüst aus 40 Kohlenstoff-Atomen besteht. Diese werden aus acht C5-Einheiten (Isopren) aufgebaut. Von Bakterien werden allerdings auch Triterpene und Pentaterpene hergestellt. Man unterscheidet die reinen Kohlenwasserstoffverbindungen (Carotine, z. B. Lycopon und β -Carotin) von denen, die Sauerstofffunktionen enthalten (Xanthophylle, z. B. Zeaxanthin und Lutein). Es kommen verschiedene Derivate z. B. mit Alkohol-, Säure- oder Esterfunktionen vor.

Als Grundgerüst der Carotinoide kann Lycopon angesehen werden (**Abb. I-1**), von dem sich die übrigen Carotinoide formal ableiten lassen. Beispielsweise entsteht β -Carotin (**Abb. I-1**) durch Zyklisierung der beiden Endgruppen des Lycopons.

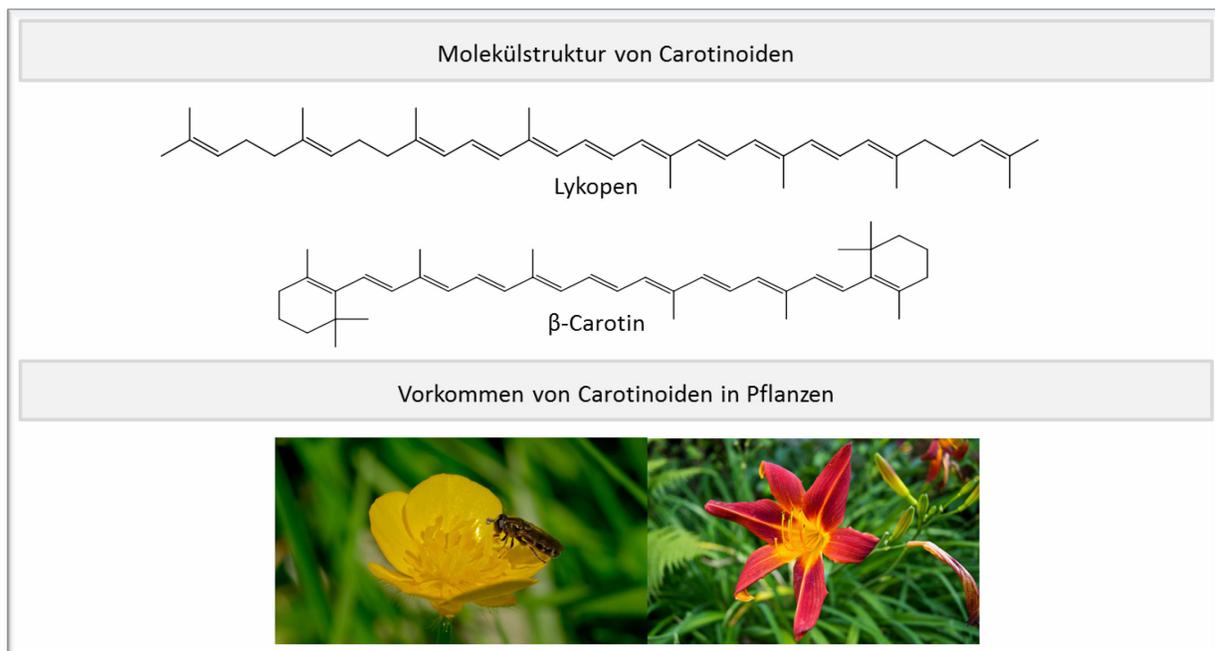


Abb. I-1. Molekülstruktur und Vorkommen von Carotinoiden

Oben: Lykopen kann als Grundgerüst, von dem sich die übrigen Carotinoide formal ableiten, angesehen werden. So entsteht beispielsweise β -Carotin durch Zyklisierung der Endgruppen des Lykopons. Unten: Carotinoide geben z. B. den Blüten von Pflanzen ihre Farbe, die zur Anlockung von Tieren dient. Gezeigt sind Pflanzen der Gattungen *Ranunculus* (links) und *Hemerocallis* (rechts). Fotografien von Marco Kaschner.

Die Farbigkeit dieser Pigmente beruht auf der Absorption bestimmter Anteile des sichtbaren Lichtspektrums durch das π -Elektronensystem der konjugierten Doppelbindungen des Kohlenstoffgerüsts. Dadurch zeigen Carotinoide ein typisches Absorptionsspektrum im Bereich von 400 bis 500 nm mit einem Hauptabsorptionsmaximum und zwei weiteren mehr oder weniger deutlichen Maxima.

I.3.2 Vorkommen und Funktionen von Carotinoiden

Carotinoide werden von Mikroorganismen, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert, in denen sie verschiedenste Funktionen erfüllen. In photosynthetischen Organismen dienen sie als akzessorische Pigmente, die das für die Photosynthese nutzbare Lichtspektrum erweitern, indem sie absorbierte Lichtenergie an die Chlorophylle weitergeben (Cogdell & Frank, 1987; Demmig-Adams *et al.*, 1996). Außerdem wirken sie als lipophile Antioxidantien, die die Zelle vor den bei der Photosynthese entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies schützen können (Jensen, 1965; Britton, 1995b). Sie reagieren etwa mit Singulett-Sauerstoff (Olson & Krinsky, 1995; Krinsky, 2002) und können Peroxy-Radikale abfangen (Conn *et al.*, 1992). Außerdem sind sie in der Lage, den Triplettzustand des Chlorophylls zu quenchen, wobei die übernommene Energie als Wärme frei wird. In manchen Pflanzen wirkt sich oxidativer Stress direkt auf die Carotinoid-Zusammensetzung aus (Bouvier *et al.*, 1998). Außerdem treten sie in nicht-grünen Pflanzenteilen wie Blüten und Früchten oft deutlich hervor und dienen als Lockfarben für Tiere (**Abb. I-1**). Aufgrund ihrer Molekülarchitektur können Carotinoide weiterhin in biologische Membranen eingelagert werden und so die Membranfluidität regulieren (Pintea *et al.*, 2005). Besonders geeignet hierfür sind Carotinoide mit polaren Endgruppen wie Hydroxycarotinoide, glykosilierte Carotinoide sowie deren Fettsäureester (Hara *et al.*, 1999). Pathogene Bakterienstämme können so möglicherweise Verteidigungsmechanismen eines Wirtes abwehren (Mishra *et al.*, 2011). Tiere können Carotinoide nicht *de novo* synthetisieren, sondern nehmen die Pigmente mit der Nahrung auf. Eine besonders wichtige Funktion in Tieren ist die sogenannte Vitamin A-Aktivität (Britton, 1995b; von Lintig & Vogt, 2004). Diese und weitere werden im Folgenden (I.3.3) näher beschrieben. Vielen Tieren geben Carotinoide ihre charakteristische Farbe. Sie werden etwa in den Federn von Vögeln oder den Panzern von Crustaceen eingelagert (Britton, 1995).

I.3.3 Verwendung von Carotinoiden

Die Verwendungsmöglichkeiten von Carotinoiden ergeben sich durch ihre Provitamin A-Aktivität, ihre Licht-absorbierenden und antioxidativen Eigenschaften und ihre Farbigkeit. Für den Menschen sind β -Carotin, Lutein und Zeaxanthin von vorrangiger Bedeutung. β -Carotin stellt die Hauptquelle für

Vitamin A im tierischen Organismus dar, weshalb es auch Provitamin A genannt wird (von Lintig & Vogt, 2004). Unter üblichen Ernährungsbedingungen ist der Bedarf rasch gedeckt. Bei Mangelernährung in Entwicklungsländern führt Vitamin A-Mangel allerdings besonders bei Kindern zu Erblindung und auch zum Tode, da die Vitamin A-Defizienz immunologische Beeinträchtigungen mit sich bringt (Semba, 1994; Sommer, 1994). Entsprechende Provitamin A-Präparate können dem vorbeugen. Lutein und Zeaxanthin kommen in der Netzhaut des Auges, genauer in der Macula, in größeren Mengen vor (Landrum & Bone, 2001), wo sie vermutlich eine Schutzfunktion gegen Phototoxizität ausüben (Loane *et al.*, 2008; Youssef *et al.*, 2011). Die Degeneration der Macula ist der Hauptgrund der Erblindung im Alter. Es hat sich gezeigt, dass eine erhöhte Aufnahme von Lutein und Zeaxanthin über die Nahrung die Pigmentdichte der Macula erhöht (Bone *et al.*, 2007) und daher möglicherweise das Risiko, an der altersbedingten Maculadegeneration zu erkranken, senkt (Seddon *et al.*, 1994). Lutein steht in vielen Gemüsesorten als eines der Hauptcarotinoide zur Verfügung, während Zeaxanthin in wesentlich geringeren Konzentrationen vorkommt (van den Berg *et al.*, 2000). Weiterhin sind die antioxidativen Eigenschaften verschiedener Carotinoide wie β -Carotin, Astaxanthin und Lykopen von außerordentlichem Interesse (Miki, 1991; Bertram & Vine, 2005). Die Korrelation von verstärkter Carotinoid-Aufnahme mit der Nahrung und einem verminderten Auftreten einiger Krebsarten wird kontrovers diskutiert (Peto *et al.*, 1981; Franceschi *et al.*, 1994; Giovannucci *et al.*, 1995; Giovannucci, 1999; Heber & Lu, 2002; Gallicchio *et al.*, 2008; Butalla *et al.*, 2012). Die Carotinoide als direkte Therapeutika einzusetzen, wurde bereits vorgeschlagen (Bendich, 2004; Lian & Wang, 2008; Molnár *et al.*, 2012).

Darüber hinaus werden die Pigmente verschiedentlich industriell genutzt. So etwa in der Viehzucht, um z. B. bei Lachs und Forelle die rötliche Färbung des Fleisches durch Carotinoid-Zufütterung zu verstärken (Simpson *et al.*, 1981), oder um dem Eigelb von Hühnereiern eine intensiv-gelbe Färbung zu verleihen (Marusich & Bauernfeind, 1981). Zudem finden sie in der Kosmetikindustrie und als Lebensmittelfarbstoffe Verwendung (Bauernfeind, 1981).

I.3.4 Herstellung von Carotinoiden

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten besteht ein gesteigertes Interesse an der Produktion bekannter und neuer Carotinoid-Verbindungen. Manche Carotinoide werden hauptsächlich durch Extraktion von Pflanzenmaterial gewonnen; dieser Prozess ist relativ arbeitsaufwendig und beansprucht große Landflächen (Fernández-Sevilla *et al.*, 2010). Außerdem wird die chemische Synthese einiger Carotinoide bereits seit einigen Jahrzehnten betrieben. Beispielsweise wird β -Carotin seit 1954 kommerziell hergestellt (Pfander, 1992). Die Verfahren sind allerdings relativ aufwendig und damit energie- und kostenintensiv (Britton *et al.*, 1995). Alternativ könnte die

Biotechnologie eine attraktive, umweltfreundliche Produktionsmöglichkeit bieten. Eine Möglichkeit der Carotinoid-Produktion bieten sogenannte Algen-Farmen, besonders *outdoor* in Teichen oder auch in Bioreaktoren (Del Campo *et al.*, 2007; García-Malea *et al.*, 2009). Hier können die natürlich carotinogenen Mikroorganismen kultiviert und die Naturstoffe aus der gewonnenen Biomasse extrahiert werden. Die Unterhaltung dieser Anlagen ist allerdings relativ anspruchsvoll, da für eine effektive Carotinoid-Produktion z. B. eine ausreichende Lichteinstrahlung, ein effektiver Gasaustausch sowie auch eine angemessene Zusammensetzung des Kulturmediums über die Dauer der Kultivierung sichergestellt sein muss (Del Campo *et al.*, 2007; Grewe & Griehl, 2008).

Weiterhin wird die Carotinoid-Produktion mithilfe von Bakterien angestrebt. Um produktive bakterielle Produktionsstämme zu erhalten, wurden Carotinoid-Synthesewege von carotinogenen in nicht carotinogene Organismen übertragen. Dafür müssen die Gencluster, die für Carotinoid-Biosynthese-Enzyme kodieren, transferiert und zur funktionellen Expression gebracht werden. Besonders das nicht carotinogene Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* wurde vielfach verwendet. In den letzten Jahren konnten dabei deutliche Fortschritte verzeichnet werden. So konnten etwa Lycopon, β -Carotin, Zeaxanthin und Astaxanthin in manipulierten *E. coli*-Stämmen hergestellt werden (Cheng, 2007; Das *et al.*, 2007; Ye & Bhatia, 2012). Neben anderen Ansätzen wurde eine entscheidende Verbesserung der Ergebnisse dabei durch die Manipulation des Organismus in Bezug auf die Bereitstellung von Isoprenoid-Vorstufen wie Isopentenyl-diphosphat (IPP) und Geranylgeranyl-diphosphat (GGPP) erbracht (Vadali *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2009).

I.3.5 Das Carotinoidbiosynthese-Gencluster aus *Pantoea ananatis*

Das Gram-negative, stäbchenförmige, phytopathogene Bodenbakterium *Pantoea ananatis* trägt ein Gencluster, das einen Carotinoid-Biosyntheseweg kodiert. In diesem nicht-photosynthetischen Bakterium dient die Carotinoid-Produktion vermutlich dem Schutz vor photooxidativen Schäden durch UV-Licht (Tuveson *et al.*, 1988) oder möglicherweise auch der Regulation der Membranfluidität. Die Carotinoid-Biosynthese-Gene (*crt*-Gene) liegen in Form eines 6,9 kb-Genclusters vor (Misawa *et al.*, 1990) (**Abb. I-2**). Es besteht aus sechs *crt*-Genen, die in zwei entgegengesetzten Transkriptionseinheiten organisiert sind. Die Gene *crtEXYIB* bilden ein Operon unter Kontrolle des Promotors P_{crtE} und das entgegengesetzt orientierte Gen *crtZ* steht unter Kontrolle von P_{crtZ} . Die kodierten Enzyme bilden gemeinsam einen Biosyntheseweg zur Bildung von Zeaxanthin- β -D-diglykosid (**Abb. I-2**). Im ersten Schritt kondensieren durch Katalyse der Geranylgeranyl-diphosphat-Synthase (CrtE) Farnesyl-diphosphat (FPP) und Isopentenyl-diphosphat (IPP) zu Geranylgeranyl-diphosphat (GGPP). GGPP wird durch die Phytoen-Synthase (CrtB) zu Phytoen dimerisiert. Die Phytoen-Desaturase (CrtI) führt im folgenden Schritt vier

Doppelbindungen in das Molekül ein, wodurch Lykopen entsteht. Die Lykopen- β -Zyklase katalysiert anschließend die Zyklisierung der beiden Endgruppen und damit die Bildung von β -Carotin. Durch die β -Carotin-3,3'-Hydroxylase (CrtZ) katalysiert, erfolgt die sukzessive Hydroxylierung der Endgruppen, so dass β -Cryptoxanthin und schließlich Zeaxanthin generiert wird. Im letzten Schritt erfolgt die Glykosilierung der Endgruppen und damit die Bildung von Zeaxanthin- β -D-diglykosid durch die Zeaxanthin-Glykosylase (CrtX).

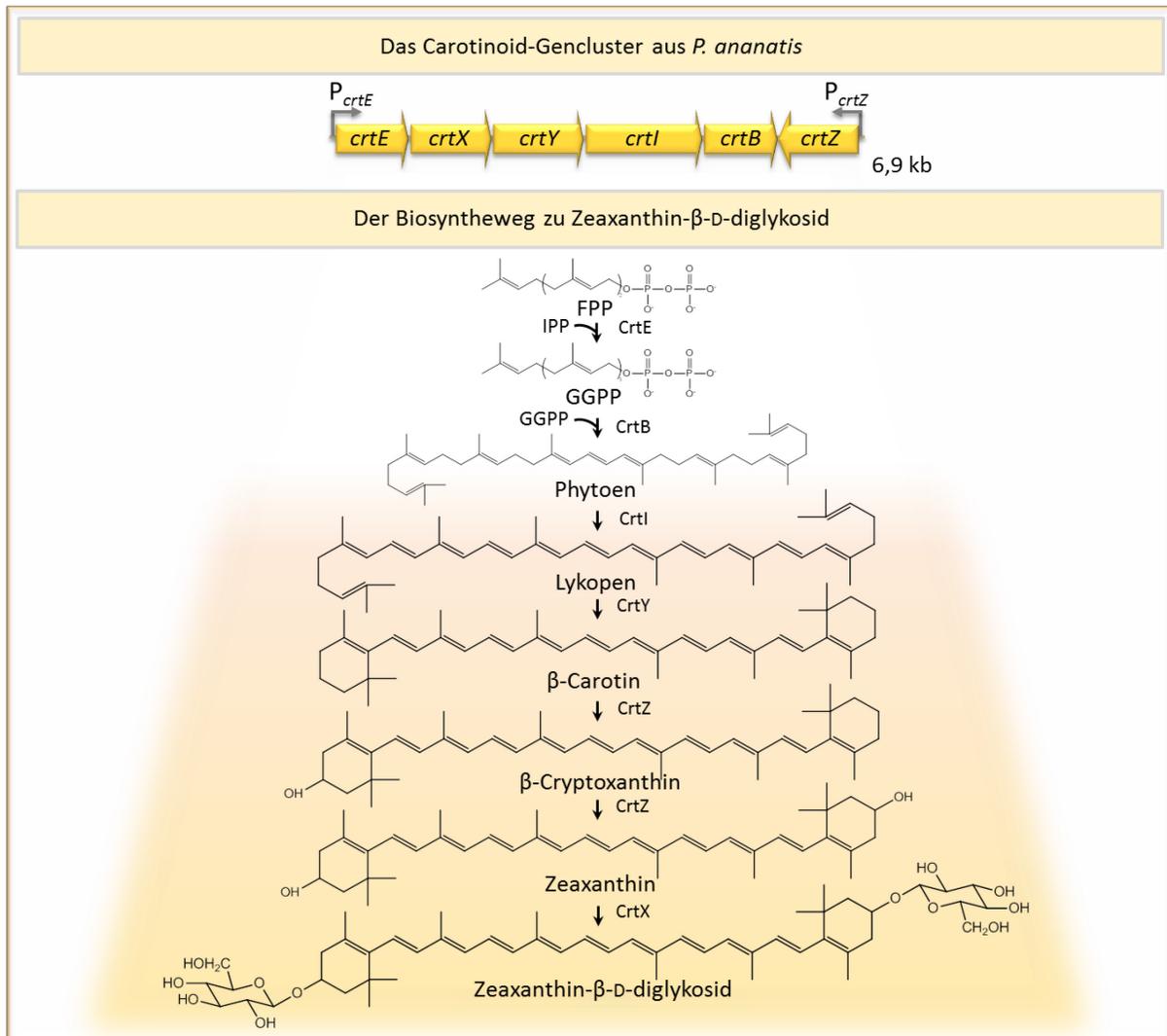


Abb. I-2: Das *crt*-Gencluster aus *Pantoea ananatis* und der dadurch kodierte Biosyntheseweg

Das Carotinoidbiosynthese-Gencluster besteht aus sechs Genen, die in zwei entgegengesetzt orientierten Transkriptionseinheiten organisiert sind. Die Gene *crtEXYIB* bilden ein Operon unter Kontrolle des Promotor P_{crtE} , während *crtZ* allein unter Kontrolle von Promotor P_{crtZ} steht. Als Endprodukt des kodierten Biosyntheseweges entsteht Zeaxanthin- β -D-Diglykosid. Der Farbverlauf deutet die Farben der Carotinoid-Verbindungen an. FPP = Farnesyl-diphosphat, IPP = Isopentenyl-diphosphat, GGPP = Geranylgeranyl-diphosphat, CrtE = GGPP-Synthase, CrtB = Phytoen-Synthase, CrtI = Phytoen-Desaturase, CrtY = Lycopon-Zyklase, CrtZ = β -Carotin-Hydroxylase, CrtX = Zeaxanthin-Glykosyltransferase. Nach Misawa *et al.*, 1990.

Die frühen Schritte der Carotinoid-Biosynthese sind in Bakterien hochkonserviert (Armstrong *et al.*, 1990). Damit sind auch die entsprechenden Gene in den Carotinoid-Genclustern anderer Organismen wie *Rhodobacter capsulatus* (Armstrong *et al.*, 1989), *Agrobacterium auraticum* (Misawa *et al.*, 1995) oder *Streptomyces griseus* (Schumann *et al.*, 1996) zu finden.

Die Einführung der beschriebenen Biokatalysator-Gene aus *P. ananatis* in einen etablierten Expressionsstamm wie z. B. *E. coli* zur heterologen Expression verspricht dort die Produktion von Carotinoiden. So wurde das *crt*-Gencluster aus *P. ananatis* bereits verschiedentlich für eine heterologe Carotinoid-Synthese verwendet (Yuan *et al.*, 2006; Nishizaki *et al.*, 2007; Harada & Misawa, 2009; Beuttler *et al.*, 2011).

I.4 GEWINNUNG VON NATURSTOFFEN: HETEROLOGE EXPRESSION VON GENCLUSTERN

Die heterologe Genexpression ist eine seit über 30 Jahren angewandte biotechnologische Methode und mittlerweile ein gängiger Prozess bezüglich einzelner Gene (Backman & Ptashne, 1978; Roberts *et al.*, 1979; Terpe, 2006; Zerbs *et al.*, 2009). Die gleichzeitige Expression mehrerer Gene stellt allerdings spezielle Anforderungen an die Technik, wie im Folgenden beschrieben wird.

I.4.1 Gewinnung eines Biosynthese-kodierenden Genclusters

Das natürliche Vorliegen der genetischen Information für die Biosynthese eines wertvollen Naturstoffes als zusammenhängendes Gencluster ist grundsätzlich von großem Vorteil für einen biotechnologischen Ansatz zur Gewinnung einer solchen Substanz. Es kann z. B. die immense Fülle an (Meta)genom-Sequenz-Daten, die durch ständig verbesserte Techniken mittlerweile generiert wird (Stein, 2010), bioinformatisch nach sogenannten Markergenen durchsucht werden, die vollständige Gencluster identifizieren (Medema *et al.*, 2011a). Weiterhin kann für die heterologe Synthese eines Naturstoffes grundsätzlich eine zusammenhängende Biosynthese-relevante Genregion gezielt vom ursprünglichen Produzenten bzw. (Meta)genom-Ansatz extrahiert und in einen Wirtsorganismus eingebracht werden. Dies wäre ungleich aufwendiger, wären alle relevanten Gene einzeln zu finden und gentechnisch zu bearbeiten. Aufgrund der dabei aber auftretenden Schwierigkeiten, sehr große DNA-Fragmente gentechnisch durch herkömmliche „Klonierung“, die auf dem Gebrauch von Restriktionsendonukleasen basiert, zu handhaben, wurden in den letzten Jahren effektive Techniken zur Restriktions-freien Klonierung entwickelt. Dabei handelt es sich einerseits um PCR-basierte Methoden (Aslanidis & de Jong, 1990; Blanusa *et al.*, 2010; Kuzuya *et al.*, 2012) und andererseits um sogenannte *Recombineering*-Methoden, die mit Hilfe der Rekombinasen von λ -Phagen (Zhang *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2011; Fu *et al.*,

2012) oder Hefen (Ma *et al.*, 1987; Gibson, 2009) funktionieren. Bei den PCR-basierten Methoden werden Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die verbunden werden sollen, verwendet, die komplementäre Überhänge beinhalten. Daraufhin werden mit unterschiedlichen Methoden Basen am 5'- oder 3'-Ende der erzeugten Fragmente entfernt, um einzelsträngige Überhänge zu generieren. Da die Überhänge der Fragmente komplementär zueinander sind, können diese hybridisieren und nach Transformation in *E. coli* zu vollständigen Plasmiden repariert werden. Beim *Recombineering* werden DNA-Fragmente, die zueinander homologe Bereiche enthalten, durch Rekombinasen zusammengefügt. Grundsätzlich können drei Szenarien benannt werden, die zur Isolierung bzw. Assemblierung Biosynthese-kodierender Gencluster führen. Zum einen werden Biosynthese-Gencluster von geringfügig produzierenden Mikroorganismen isoliert, damit ein Sekundärmetabolit mittels heterologer Expression der entsprechenden Biosynthesegene rekombinant in einem größeren Maßstab erzeugt werden kann. Weiterhin können „nackte“ Gencluster, die für die Synthese von Sekundärmetaboliten kodieren, aus Zell-unabhängigen (Meta)genom-Studien gewonnen werden. Außerdem können Biosynthese-Gencluster auf Basis des zunehmenden Verständnisses verschiedener Biosynthesewege und deren modularer Genetik rational designt und synthetisch erzeugt werden (Khalil & Collins, 2010; Walsh & Fischbach, 2010; Medema *et al.*, 2012). So werden derzeit auf unterschiedliche Weise Gencluster gewonnen, die für die Synthese interessanter Naturstoffe kodieren. Deshalb besteht zunehmend Interesse an der Entwicklung neuer Techniken zur Aktivierung solcher Gencluster in geeigneten Wirtsorganismen durch heterologe Genexpression (Zhang *et al.*, 2008; Fujii, 2009; Fischbach & Voigt, 2010; Medema *et al.*, 2011b; Pickens *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

I.4.2 Finden eines heterologen Expressionswirts

Nach der Isolierung der Biosynthese-relevanten DNA muss diese in einen geeigneten Wirtsorganismus gebracht werden. Für eine erfolgreiche Produkt-Synthese müssen verschiedenste Voraussetzungen erfüllt werden.

I.4.2.1 Aufnahme fremder DNA

Zunächst muss der Wirt in der Lage sein, die fremde Erbinformation aufzunehmen. Dies kann üblicherweise z. B. durch Elektroporation (Woodall, 2003a), chemische Transformation (Swords, 2003), oder Konjugation (Woodall, 2003b) geschehen. Die Methoden sind unterschiedlich gut geeignet für den Transfer großer DNA-Moleküle und je nach Wirt unterschiedlich effektiv (**Tab. I-3**).

Mittels Elektroporation können beispielsweise sehr große DNA-Moleküle (> 200 kb) äußerst zeiteffizient in *E. coli* eingebracht werden (Shizuya *et al.*, 1992; Sheng *et al.*, 1995), wobei allerdings ein beträchtlicher

Teil der eingesetzten Zellen zugrunde geht (Woodall, 2003). Nicht jeder Wirt ist dafür geeignet bzw. nicht für jeden Wirt ist ein entsprechendes Protokoll etabliert (Zhang *et al.*, 2011).

Tab. I-3: Verschiedene Methoden, fremde DNA in bakterielle Zellen einzubringen

Methode	Plasmid-Größen-Limitierung	Zeitaufwand	Beeinträchtigung der Zell-Viabilität	Spezies-Anwendungsbereich
chemische Transformation	bis ca. 30 kb (<i>E. coli</i> DH5 α , Invitrogen, 2001) ab ~ 10 kb beeinträchtigte Effizienz (Inoue <i>et al.</i> , 1990)	< 1 h* (Swords, 2003)	Stress durch Salz (Csonka, 1989) und Hitzeschock (Lindquist, 1986)	hauptsächlich Proteobakterien (Aune & Aachmann, 2010)
Elektroporation	<i>E. coli</i> bis > 200 kb (Sheng <i>et al.</i> , 1995)	< 15 Min* (Woodall, 2003)	50-70% Zelltod (Woodall, 2003)	viele Gram-negative (Wirth <i>et al.</i> , 1989; Aune & Aachmann, 2010) und Gram-positive (Dunny <i>et al.</i> , 1991)
Konjugation	keine (Brigulla & Wackernagel, 2010)	1 - 17 h* (Woodall, 2003)	keine, da natürlicher Prozess (Thomas & Nielsen, 2005)	Gram-negative (Brigulla & Wackernagel, 2010) Gram-positive (Teng <i>et al.</i> , 1998)

* ohne Vorbereitung der Zellen und ohne vom Selektionsmarker abhängige phänische Expression. Für die Transformation und Elektroporation können Zellen vorbereitet und eingefroren werden. Für die Konjugation muss frisches Zellmaterial angezogen werden.

Die Konjugation ist eine für alle Gram-negativen Bakterien anwendbare, ausgesprochen schonende Methode, die den Rezipienten keiner Belastung aussetzt und prinzipiell DNA-Moleküle jeder Größe transferieren kann (Brigulla & Wackernagel, 2010). Der konjugative Transfer von Plasmiden von *E. coli* zu Gram-positiven Spezies ist ebenfalls beschrieben (Teng *et al.*, 1998). Eine Ausschluss-Größe ist nicht bekannt. Allerdings nimmt die Konjugation eine gewisse Zeit in Anspruch (siehe **Tab. I-3**).

I.4.2.2 Stabiler Erhalt fremder DNA

Nach der Aufnahme der fremden DNA muss diese im Wirt stabil erhalten bleiben. Dafür können heterologe Gene auf einem replikativen Vektor oder in der chromosomalen DNA im Wirt etabliert werden. Die Verwendung replikativer Plasmide bringt gewisse Nachteile mit sich, da die Replikation eines *multi copy* Vektors -besonders mit großem Insert- erheblichen Stress für die Wirtszelle bedeuten kann, sodass deren Wachstum und die Plasmidstabilität beeinträchtigt werden (Smith & Bidochka, 1998). Insofern gewinnt die chromosomale Integration, die eine stabile Heredität der fremden DNA zusammen mit dem Wirtschromosom sicherstellt, zunehmend an Interesse (Tyo *et al.*, 2009; Striedner *et al.*, 2010). Hier wiederum besteht die Möglichkeit, die fremde DNA durch homologe Rekombination oder durch

Transposition ins Genom zu integrieren. Die Effizienz der Integration großer Fragmente durch Transposition ist dabei deutlich höher (Fu *et al.*, 2008).

I.4.2.3 Transkription eines fremden Genclusters

Für die vollständige Transkription eines im Wirt etablierten Genclusters bestehen drei Möglichkeiten: Es müssen entweder (i) die ursprünglich zugehörigen Promotoren erkannt werden (Eppelmann *et al.*, 2001; Stevens *et al.*, 2010), (ii) es müssen spezifisch im Wirt funktionierende Promotoren eingesetzt werden (Galm & Shen, 2006) oder (iii) es muss auf ein Phagen-Polymerase-basiertes System zurückgegriffen werden (Arvani *et al.* 2012).

Bei naher Verwandtschaft des Ursprungs- und des Wirtsorganismus ist die Erkennung der Promotoren wahrscheinlich (Galm & Shen, 2006). Obwohl dies grundsätzlich das wünschenswerte Szenario darstellt, da keine weiteren Manipulationen am Gencluster vorgenommen werden müssen, bedeutet dies in der Regel eine konstitutive Genexpression, die nicht gezielt kontrolliert werden kann. Im Fall von toxischen Biosynthese-Produkten kann dies problematisch sein. Müssen spezifisch im Wirt funktionierende Promotoren eingesetzt werden, besteht häufig die Wahl zwischen einem konstitutiven und einem induzierbaren System, was grundsätzlich günstig ist. So kann etwa bei toxisch wirkenden Gen- oder Biosyntheseprodukten das induzierbare System eingesetzt werden. Im Fall von komplexen Genclustern bedeutet der Einsatz Wirts-spezifischer Promotoren üblicherweise gentechnische Arbeitsschritte, die einen einzelnen Promotor integrieren und dazu die Orientierung der einzelnen Gene anpassen, um ein synthetisches Operon zu erzeugen (Bai *et al.*, 2006; Nishizaki *et al.*, 2007). Alternativ müssten mehrere Promotoren im Gencluster integriert werden, um unterschiedlich orientierte Gene oder Gengruppen zur Expression zu markieren. Möglicherweise kommen allerdings innerhalb einer gleich orientierten Gengruppe Transkriptionsterminatoren vor. Diese sollten nicht erkannt werden oder müssen zusätzlich entfernt werden, um die vollständige Transkription des Genclusters zu ermöglichen. Arbeiten der AG Drepper (Heinrich-Heine-Universität) stellen eine weitere Strategie vor, die unter Verwendung der RNA Polymerase des Bakteriophagen T7 (T7RP) die Transkription unmanipulierter unidirektionaler Gencluster unabhängig von Promotoren und Terminatoren erlaubt (Arvani *et al.*, 2012). T7RP-basierte Expressionssysteme werden seit über 20 Jahren für die Expression einzelner Gene in *E. coli* eingesetzt (Tabor & Richardson, 1985; Studier & Moffatt, 1986; Terpe, 2006). Auch für andere Bakterien konnten erfolgreich T7-Systeme etabliert werden (Gamer *et al.*, 2009; Katzke *et al.*, 2010; Lussier *et al.*, 2010). Die T7RP zeichnet sich durch verschiedene Vorteile aus: Sie startet die Transkription ausschließlich an ihrer spezifischen Promotor-Sequenz (Dunn & Studier, 1983; Tabor & Richardson, 1985), die wiederum nicht von bakteriellen Polymerasen erkannt wird, sodass die Genexpression strikt reguliert werden kann.

Weiterhin ist die Funktionalität der Polymerase von keinerlei Kofaktoren abhängig. Aufgrund dieser Eigenschaften ist sie in verschiedenen Wirten einsetzbar. Außerdem erzeugt sie Transkripte mit enormer Prozessivität (lost *et al.*, 1992). Da sie zudem in der Lage ist, besonders lange Transkripte zu erzeugen (Golomb & Chamberlin, 1974; McAllister *et al.*, 1981) und vermutet wurde, dass sie bakterielle Transkriptionsterminatoren ignoriert (Studier, 1972; Studier & Moffatt, 1986; Widenhorn *et al.*, 1988), wurde ihr Einsatz bei der Expression von Genclustern bereits vorgeschlagen (Zhang *et al.*, 2011).

Arvani *et al.* (2012) beweisen den Nutzen der T7RP: Da die T7RP bakterielle Transkriptionsstops nicht erkennt, konnte die homologe Überexpression des Hydrogenase-Gencluster in *R. capsulatus* demonstriert werden (**Abb. I-3**).

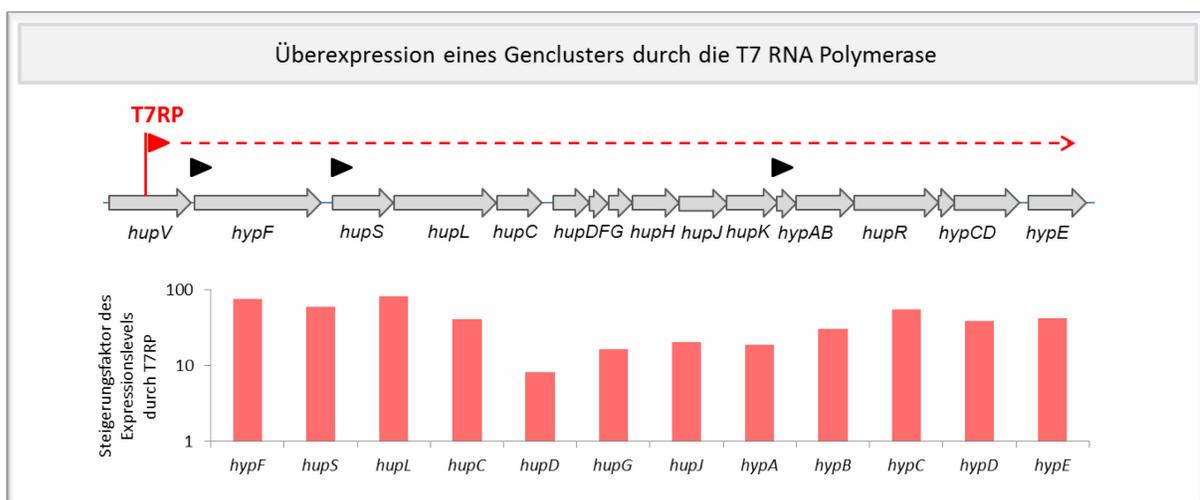


Abb. I-3: Überexpression eines 16 kb-Genclusters durch die T7 RNA Polymerase

Das Hydrogenase-Gencluster von *R. capsulatus* ist mit seinen natürlichen Promotoren (schwarze Pfeile) und einem im bakteriellen Chromosom inserierten T7-Promotor (roter Pfeil) gezeigt. Die Transkriptlevel der einzelnen Gene wurden durch die T7-Polymerase-abhängige Expression rund 8- bis 82-fach gegenüber dem Wildtyp gesteigert. Der Steigerungsfaktor wird nicht für jedes Gen dargestellt, da das Transkript mancher Gene im Wildtyp nicht nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu erbrachte die T7-Polymerase-abhängige Expression der Genregion eine nachweislich starke Transkription sämtlicher Gene. Nach Arvani *et al.* (2012).

Das Hydrogenase-Gencluster besteht aus 16 Genen, die über 16 kb unidirektional in drei Operons organisiert sind (Colbeau *et al.*, 1993; Vignais *et al.*, 2000). Es wurde das Hydrogenase-Gencluster im bakteriellen Chromosom von *R. capsulatus* mit einem T7-Promotor markiert und das Gen für die T7RP eingebracht, während das Hydrogenase-Gencluster in einem Kontroll-Stamm stattdessen in analoger Weise mit einem konstitutiven bakteriellen Promotor markiert wurde. Die Insertion des bakteriellen Promotors erbrachte keine gesteigerte Expression der Genregion, während bei inseriertem T7-Promotor durch Induktion der Expression der T7RP das gesamte Cluster, das mehrere natürliche Promotoren und laut Analyse mittels *ARNold-software* (II.14) mehrere Terminatoren enthält, stark überexprimiert werden konnte.

Damit konnte gezeigt werden, dass die T7 RNA Polymerase für die Transkription großer und komplexer Genregionen geeignet ist.

I.4.2.4 Translation von mRNA fremden Ursprungs

Für die Gewinnung eines Naturstoffes durch heterologe Expression eines Genclusters muss nach der Transkription der Biosynthese-relevanten Gene weiterhin für eine erfolgreiche Translation der mRNA in Proteine der Gebrauch der Aminosäure-kodierenden DNA-Codons (*codon usage*) mit dem des ursprünglichen Produzenten kompatibel sein. Anderenfalls werden Gene, die im Wirt seltene Codons enthalten, mit geringerer Effizienz translatiert, weil die entsprechend seltenen tRNAs den unnatürlichen Bedarf nicht abdecken können. In diesem Fall muss die DNA-Sequenz angepasst werden, sodass nur im Wirt hinreichend abundante Codons für die Expression der fremden Gene verwendet werden (Yim *et al.*, 2011). Es gibt allerdings auch Arbeiten, die eine erfolgreiche heterologe Expression mit koexprimierter tRNA belegen (Lee *et al.*, 2009b). Aufgrund des Aufwands dieser zusätzlichen Arbeitsschritte mag alternativ die Wahl eines anderen Expressionswirtes mit passender *codon usage* sinnvoll sein.

I.4.2.5 Korrekte Biokatalyse durch heterologe Enzyme

Für die Biosynthese des gewünschten Naturstoffes müssen nach der Translation im Wirt aktive Biokatalysatoren gebildet werden. Dafür müssen die Proteine zunächst korrekt gefaltet werden, wozu teilweise bestimmte Faltungshelfer, sogenannte Chaperone, benötigt werden (Samuelson, 2011). Somit kann die wirtsspezifische Faltungsmaschinerie hier eine Limitierung darstellen. Weiterhin muss der gewählte Wirt bei Beteiligung Kofaktor-beladener Proteine zur Bildung aktiver Biokatalysatoren die entsprechenden Moleküle in ausreichender Menge produzieren (Pickens *et al.*, 2011). Schließlich muss der Metabolismus des Expressionswirtes einen angemessenen „Hintergrund“ bieten und z. B. den Biokatalysatoren ausreichend Grundbausteine zur Bildung des gewünschten Naturstoffes zur Verfügung stellen (Zhang *et al.*, 2008). Für die effektive Bildung des Endproduktes eines Biosyntheseweges können sich verschiedene Wirte außerdem deshalb unterschiedlich gut eignen, weil der metabolische Fluss innerhalb des heterologen Biosyntheseweges sehr unterschiedlich ablaufen kann (Jiang *et al.*, 2010). Dies kann z. B. darauf zurückzuführen sein, dass die Aktivitäten der einzelnen Biokatalysatoren in verschiedenen Wirten unterschiedlich aufeinander abgestimmt sind. Außerdem können heterolog synthetisierte Substanzen in unterschiedlichem Maße von den Wirten abgebaut werden. Obwohl durch Genomanalysen und Metabolomstudien immense Fortschritte auf diesem Gebiet gemacht und Vorhersage-*tools* entwickelt werden (Carbonell *et al.*, 2011), ist die Kompatibilität eines Biosyntheseweges mit dem Metabolismus eines Wirtes in vielen Fällen immernoch schwer vorherzusagen.

Die beschriebenen Aspekte, die bei der Wahl eines geeigneten Wirtes für die heterologe Synthese eines Gencluster-kodierten Naturstoffes von Bedeutung sind, stellen teils schwer vorherzusagende Parameter dar (Piel, 2011). Dadurch wird ein gewisser *trial and error*-Charakter der Wirts-Suche bedingt.

Deshalb werden derzeit Möglichkeiten gesucht, Gencluster-kodierte Biosynthesewege unterschiedlichen Ursprungs (siehe I.3.1) in verschiedenen Wirten zu aktivieren. **Abbildung I-4** fasst diese Situation zusammen.

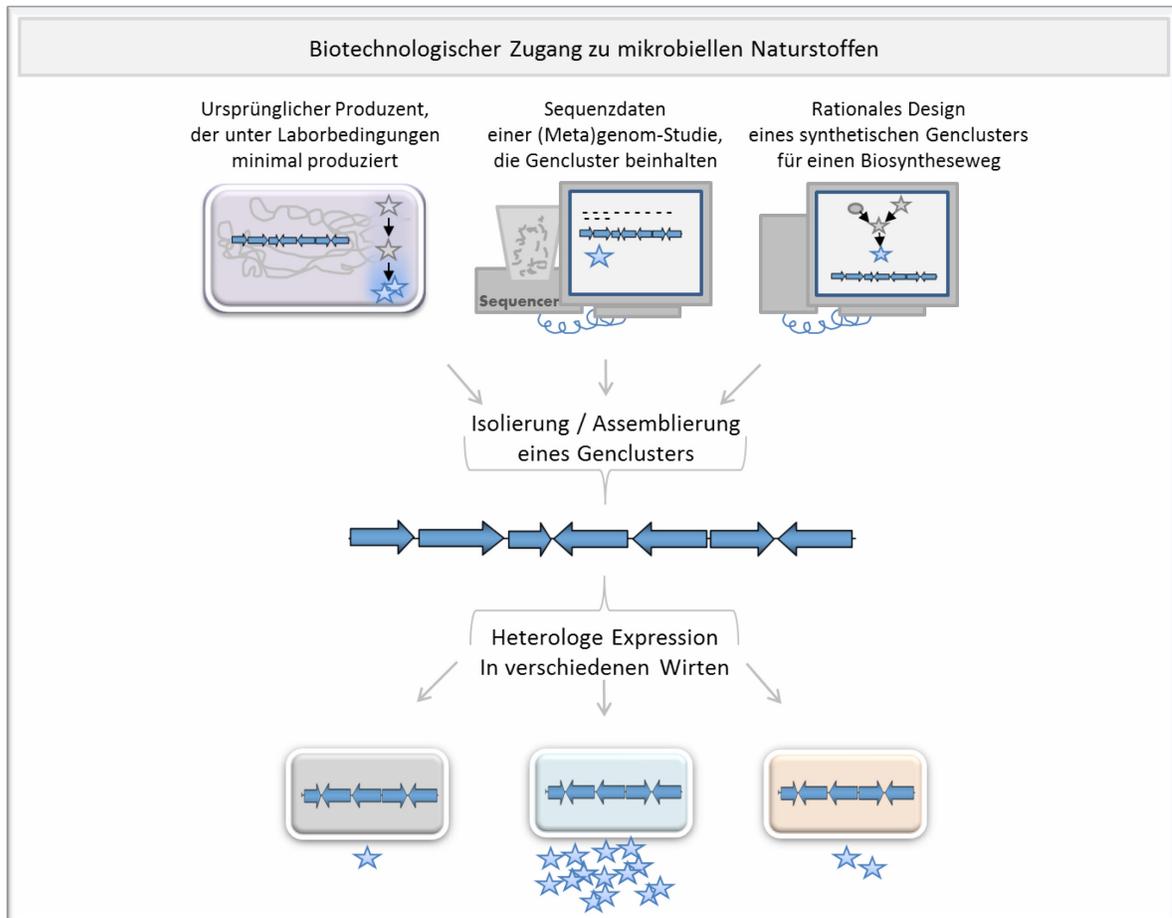


Abb. I-4: Schematische Darstellung des biotechnologischen Zugangs zu mikrobiellen Naturstoffen

Mehrere Ausgangssituationen können zur Isolierung oder Assemblierung eines Genclusters führen: Es kann z. B. der natürliche Produzent eines wertvollen Sekundärmetaboliten (blaue Sterne) isoliert worden sein, der allerdings unter Laborbedingungen nur geringe Mengen des Naturstoffes herstellt. Das entsprechende Gencluster kann von diesem Organismus isoliert werden. Weiterhin können „nackte“ Gencluster, die für die Synthese von Sekundärmetabolite kodieren, aus Zell-unabhängigen (Meta)genom-Studien gewonnen werden. Außerdem können Biosynthese-Gencluster auf Basis von rationalem Design synthetisch assembliert werden. Nachdem ein isoliertes Gencluster vorliegt, muss in der Folge ein geeigneter Expressionswirt gefunden werden, der in der Lage ist, das Gencluster zu aktivieren, also den Naturstoff zu synthetisieren. Dafür muss die heterologe Expression des Genclusters in verschiedenen Wirten ermöglicht werden.

I.5 DAS TREX-SYSTEM – TRANSFER AND EXPRESSION VON GENCLUSTERN

Das TREX-System wurde als neues Expressions-*tool* entwickelt, das die heterologe Expression isolierter unmanipulierter Gencluster in verschiedenen bakteriellen Wirten ermöglichen soll. Es besteht aus zwei Genkassetten, die alle genetischen Elemente enthalten, um ein Biosynthese-Gencluster in einem heterologen Wirt zu aktivieren. Die Anwendung des Systems erfolgt in den folgenden vier Schritten: (i) Zunächst wird ein Vektor-getragenes Gencluster mit den TREX-Kassetten markiert (**Abb. I-5, 1**). (ii) Danach wird das gesamte Konstrukt mittels Konjugation in einen Expressionswirt eingebracht (**Abb. I-5, 2**) und (iii) im bakteriellen Chromosom inseriert (**Abb. I-5, 3**), wo es (iv) schließlich von beiden Seiten aus durch die T7RP exprimiert wird (**Abb. I-5, 4**).

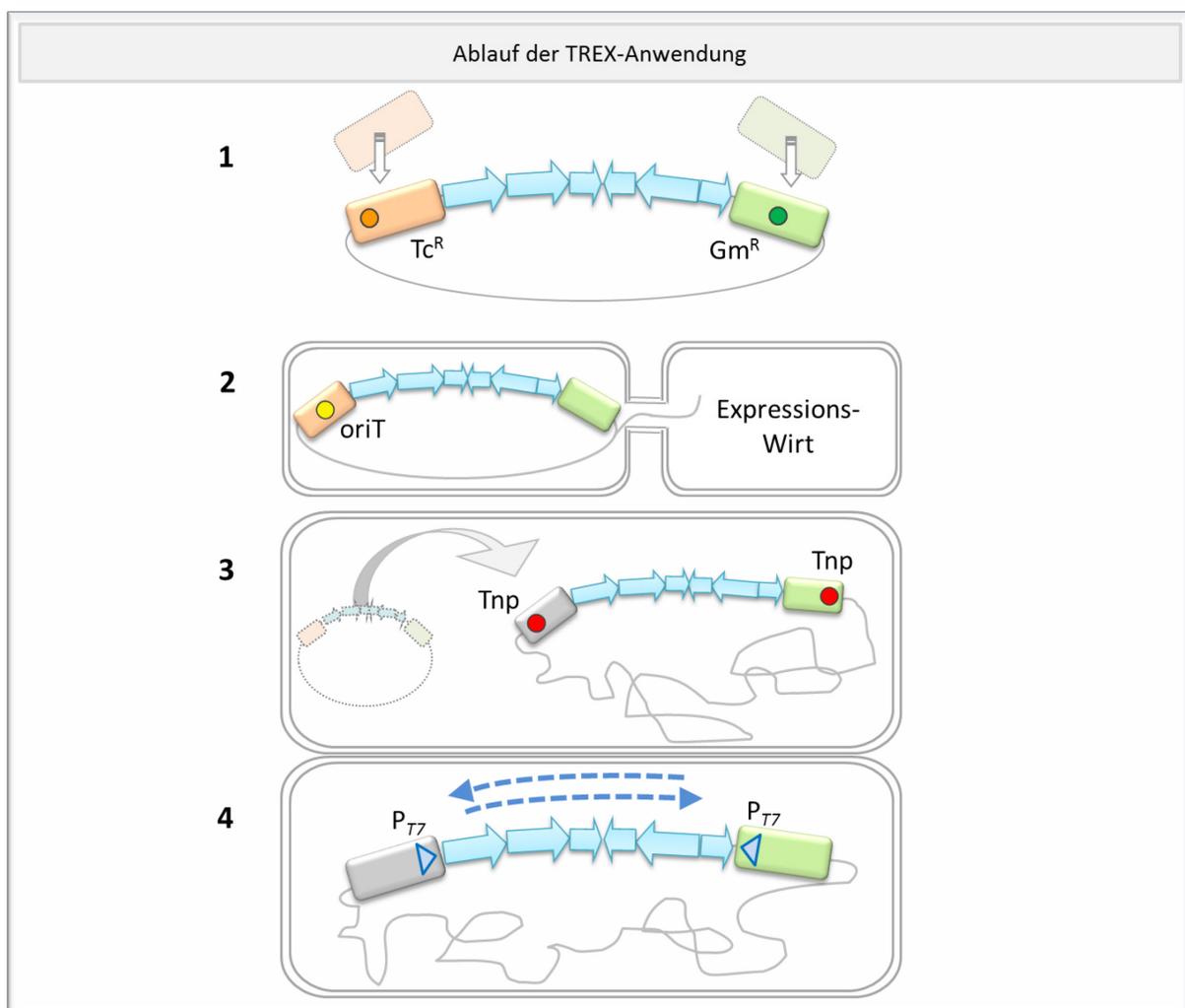


Abb. I-5: Schematische Darstellung des Ablaufs der TREX-Anwendung

1 Ein Vektor-getragenes Gencluster wird mit den TREX-Kassetten markiert. **2** Das Konstrukt wird mittels Konjugation in einen Expressionswirt eingebracht. **3** Das markierte Gencluster wird im bakteriellen Chromosom durch Transposition inseriert. **4** Das Gencluster wird von zwei flankierenden Promotoren aus durch die T7 RNA Polymerase exprimiert. Tc^R = Tetrazyklin-Resistenzgen, Gm^R = Gentamycin-Resistenzgen, *oriT* = *origin of transfer*, Tnp = Transposase, P_{T7} = T7-Promotor

Abbildung I-6 zeigt den Aufbau der TREX-Kassetten, die den Ablauf der TREX-Anwendung ermöglichen. Im Folgenden werden die Zusammensetzung der TREX-Kassetten und die Umsetzung der einzelnen Schritte im Detail erläutert.

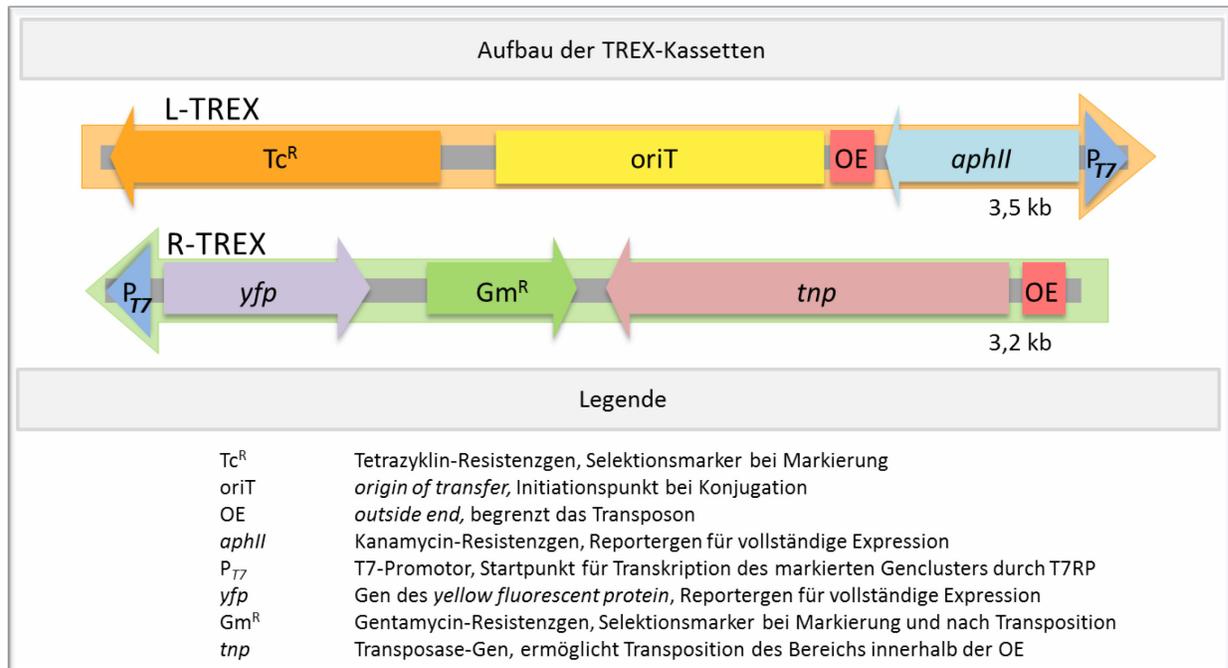


Abb. I-6: Aufbau der TREX-Kassetten

Die TREX-Kassetten enthalten alle Elemente, um die vier Schritte des TREX-Ablaufs (Abb. 5) umzusetzen. Die Farbkodierung entspricht der in Abb. I-5 verwendeten.

I.5.1. Markierung des Genclusters (Abb. I-5, 1)

Das zu exprimierende Gencluster, das auf einem Plasmid, Cosmid oder *bacterial artificial chromosome* (BAC) (Shizuya *et al.*, 1992; Shizuya & Kouros-Mehr, 2001; Singh *et al.*, 2009) lokalisiert sein kann, wird beidseits durch die TREX-Kassetten, die als L-TREX (L = *left*) und R-TREX (R = *right*) bezeichnet werden (**Abb. I-6**), markiert. Dabei kann die Anordnung frei gewählt werden, wobei die T7-Promotoren der beiden Kassetten für die spätere Expression konvergent zum Gencluster hin orientiert sein müssen. Um später im dritten Schritt einen reinen Transpositions-Stamm erzeugen zu können, sollte ein Vektor verwendet werden, der nicht im Expressionswirt repliziert wird (*suicide vector*). Die Markierung kann durch Restriktionsendonuklease-basierte Klonierung erfolgen, soweit dies möglich ist. Die Anordnung der TREX-Kassetten auf dem Vektor pIC20H-RL vereinfacht diesen Schritt: Er trägt beide TREX-Kassetten nebeneinander, wobei deren T7-Promotoren auswärts orientiert sind (**Abb. I-7**). Durch *Xba*I-Restriktion kann das <L-TREX-R>-Modul am Stück isoliert werden und ein Plasmid-getragenes Gencluster in einem Schritt durch Insertion dieses Moduls markiert werden. Bei diesem Verfahren kann notwendigerweise

ein T7-Promotor nicht direkt an das Gencluster gesetzt werden. Für die spätere Expression durch die T7RP sollte sich dies aufgrund der hohen Prozessivität des Enzyms allerdings nicht nachteilig auswirken (siehe I.4.2.3).

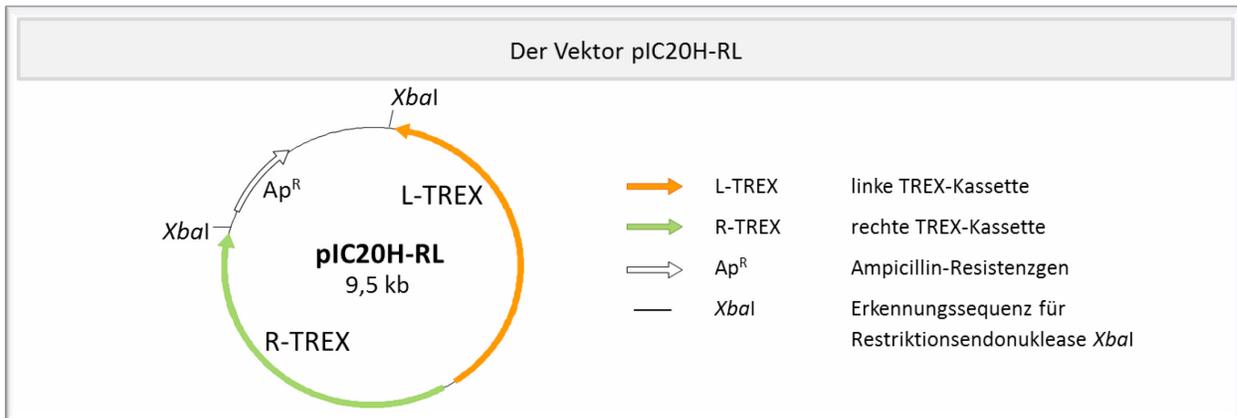


Abb. I-7: Vektor pIC20H-RL, der beide TREX-Kassetten trägt

Die Richtung der Pfeile zeigt die Orientierung der T7-Promotoren an. Durch Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *XbaI* können beide TREX-Kassetten als ein zusammenhängendes Modul isoliert und für die Markierung eines Genclusters verwendet werden.

Bei großen DNA-Fragmenten, die möglicherweise aufgrund fehlender singulärer Schnittstellen diese Methode ausschließen, kann die Markierung durch Restriktions-freie Techniken umgesetzt werden. Bei diesen Techniken handelt es sich, wie in I.4.1 beschrieben, um PCR-basierte oder um Rekombinase-basierte Methoden. Ein Tetrazyklin-Resistenzgen in der L-TREX-Kassette sowie ein Gentamycin-Resistenzgen in der R-TREX-Kassette stehen als Selektionsmarker zur Verfügung, um eine erfolgreiche Markierung zu verfolgen (**Abb. I-5, 1** und **Abb. I-6: Tc^R, Gm^R**).

I.5.2. Transfer des Genclusters in den Expressionswirt durch Konjugation (**Abb. I-5, 2**)

Das markierte Gencluster kann durch Konjugation von *E. coli* in jeden Gram-negativen bakteriellen Wirt gebracht werden. Die Konjugation erlaubt im Gegensatz zu anderen Methoden des DNA-Transfers einen für den Expressionswirt schonenden Transfer sehr großer DNA-Moleküle mit großer Effizienz (siehe I.4.2.1). Grundvoraussetzung für den von Simon *et al.* (1983) etablierten konjugativen Transfer von DNA von einem *E. coli*-Donor zu einem Rezipienten ist die Expression der *tra*-Gene im Donor und das Vorhandensein eines *origin of transfer* in der zu konjugierenden DNA. Der *E. coli* Stamm S17-1 trägt die benötigten *tra*-Gene und die L-TREX-Kassette einen *origin of transfer* (**Abb. I-5, 2** und **Abb. I-6: oriT**). Wird also *E. coli* S17-1 mit dem Vektor, der das TREX-markierte Gencluster trägt, transformiert, kann das Konstrukt zu jedem Gram-negativen Wirt übertragen werden. Für die Transformation in *E. coli* empfiehlt sich dabei die Elektroporation, weil auf diese Weise große DNA-Fragmente zeiteffizient eingebracht werden können (siehe I.4.2.1). Der Nachteil der Methode besteht in der Belastung der Zellen, was hier

vernachlässigt werden kann, da *E. coli* als Durchgangs-Träger der DNA nicht maximale Fitness wie der Expressionswirt haben muss. Bei der Konjugation von *E. coli* zum Rezipienten konstruieren die Genprodukte der *tra*-Gene zunächst den sogenannten Sex-Pilus, der den Kontakt zwischen Donor- und Rezipienten-Zelle herstellt. Daraufhin induziert eine spezifische Endonuklease einen Einzelstrangbruch am *origin of transfer*. Der linearisierte Einzelstrang kann nun vom im Donor verbleibenden zirkulären Einzelstrang „abgerollt“ und dabei zum Rezipienten übertragen werden. Schon während der Konjugation werden die Einzelstränge durch Replikation wieder zu Doppelsträngen aufgefüllt (Lanka & Wilkins, 1995; Frost, 2009).

I.5.3. Integration des Genclusters im bakteriellen Chromosom durch Transposition (Abb. I-5, 3)

Das Gencluster wird durch Transposition in die chromosomale DNA des Expressionswirtes inseriert. Die Integration des Genclusters im Wirtsgenom und damit gemeinsame Replikation bedeutet im Gegensatz zu Plasmid-basierter Replikation der Gene eine stabile Heredität der Biosynthese-Information (siehe I.4.2.2). Dabei ermöglicht die Verwendung der Transposition im Vergleich mit der homologen Rekombination eine höhere Insertionseffizienz großer Fragmente (Fu *et al.*, 2008). Außerdem funktioniert das verwendete Transposon Tn5 (Reznikoff, 2008) im Gegensatz zu anderen Transposons wie Tn7 (Craig, 1991; Choi *et al.*, 2005) in einem breiten Wirtsspektrum, da es nicht in eine spezifische Genregion inseriert (Goryshin & Reznikoff, 1998). Gleichzeitig weist es nach der Insertion in das Genom eine hohe Stabilität auf (de Lorenzo *et al.*, 1990; Herrero *et al.*, 1990). Für den Prozess der Tn5-Transposition werden grundsätzlich drei Elemente benötigt: Die Transposase und zwei spezifische, 19 Basenpaare (bp) lange DNA-Sequenzen, genannt OE (*outside end*), die den Transposon-Bereich definieren (Goryshin & Reznikoff, 1998). Die L-TREX-Kassette trägt das OE-L, während die R-TREX-Kassette das OE-R sowie das Gen für die Transposase enthält (**Abb. I-6**). Die Transposition dieses rekombinanten Transposons verläuft nach dem *cut and paste*-Mechanismus des ursprünglichen Tn5 (Reznikoff, 2008). Nach einem scheinbar ungerichteten Absuchen der DNA (Steiniger *et al.*, 2006) binden zunächst zwei Transposasen an die spezifischen Erkennungssequenzen (OE-L und OE-R) (Gradman & Reznikoff, 2008). Durch Oligomerisierung der Transposasen werden die OE-Sequenzen daraufhin in direkte Nähe zueinander gebracht, wodurch der dazwischen liegende Transposon-Bereich eine Haarnadelstruktur ausbildet (Bhasin *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 2000). Durch Trennung des DNA-Doppelstranges wird diese Struktur an den OE-Sequenzen vom Vektor isoliert (Bhasin *et al.*, 1999). Das ausgeschnittene rekombinante TREX-Transposon umfasst alle Gene „innerhalb“ der OE-Sequenzen und schließt den nicht mehr benötigten *origin of transfer* und das Tetrazyklin-Resistenzgen des L-TREX aus. So kann eine spätere Mobilisierung des Wirtschromosoms zur Konjugation ausgeschlossen werden. Im

letzten Schritt wird das Transposon an einer zufälligen Stelle in das Chromosom des Expressionsstammes integriert. Dabei zielt der Transposon-Komplex auf 9 Basen, die präferentiell eine bestimmte Basenzusammensetzung aufweisen (Schulz & Reznikoff, 1991; Shevchenko *et al.*, 2002). Nach erfolgter Insertion liegt außerhalb des Transposons beidseits diese 9 bp Sequenz einzelsträngig vor, die wohl vom Wirt jeweils zum Doppelstrang komplettiert wird (Reznikoff, 2008). Das Gentamycin-Resistenzgen der R-TREX-Kassette kann nun als Selektionsmarker verwendet werden. Um einen reinen Transpositionsstamm zu erhalten, der nur eine Kopie des Genclusters im Genom trägt, darf das konjugierte Vektor-Konstrukt im Wirt nicht replizieren.

I.5.4. Konvergente Expression des Genclusters durch die T7 RNA Polymerase (Abb. I-5, 4)

Die Region des Genclusters wird von flankierenden Promotoren ausgehend in beiden Richtungen durch die T7RP transkribiert. Die Verwendung der Phagen-Polymerase ermöglicht die Transkription der Gene unabhängig von den ursprünglich zum Gencluster gehörigen Promotoren, die möglicherweise nicht in jedem Wirt erkannt werden. Durch die bidirektionale Transkription können sämtliche Gene des Genclusters unabhängig von ihrer Orientierung exprimiert werden. Dabei erkennt die T7RP keine eventuell vorkommenden bakteriellen Transkriptionsterminatoren (Studier, 1972; Studier & Moffatt, 1986; Widenhorn *et al.*, 1988; Arvani *et al.*, 2012). Um die vollständige Transkription eines komplexen Genclusters zu ermöglichen, enthalten beide TREX-Kassetten T7-Promotoren, die das Gencluster umschließen (**Abb. I-5, 4** und **Abb. I-6**). Die T7-Polymerase selbst wird nicht durch die TREX-Kassetten bereitgestellt. Entweder muss ein T7-Expressionsstamm wie *E. coli* BL21(DE3) (Studier & Moffatt, 1986), *Rhodobacter capsulatus* B10S-T7 (Katzke *et al.*, 2010) oder *Streptomyces lividans* 10T7 (Lussier *et al.*, 2010) verwendet werden, der das Gen für die Polymerase unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors im Genom trägt, oder dieses Gen wird auf einem Vektor eingeführt. Auf diese Weise kann das Polymerase-Gen unter die strikte Kontrolle eines Wirts-spezifischen Promotors gestellt werden, sodass wiederum die Expression der Biosynthesegene des Genclusters kontrolliert werden kann. Bei Zell-toxischen Produkten der kodierten Biosynthese ist dies von besonderer Bedeutung. Außerdem enthält die R-TREX-Kassette einen *lac*-Operator vor P_{T7} , der das Repressor-Protein LacI binden kann. Dadurch kann die Genexpression in *E. coli* zusätzlich kontrolliert werden. Die vollständige Transkription des Genclusters kann anhand von Reportergenen in jeder TREX-Kassette nachvollzogen werden. Vor den auswärts orientierten kodierenden Bereichen der Reportergene sind keine Promotoren inseriert, wodurch ihre Transkription jeweils vom T7-Promotor der anderen TREX-Kassette abhängig ist und somit die vollständige Transkription des Genclusters anzeigt. Die L-TREX-Kassette trägt als Reportergen das Kanamycin-Resistenzgen *aphII*, während die R-TREX-Kassette das Fluoreszenz-Reportergen *yfp* enthält.

Beide Reporter sollten in einem weiten Wirtsspektrum funktionieren. Für die Funktionalität des *yellow fluorescent protein* werden keine Kofaktoren benötigt (Zimmer, 2002). Allerdings ist die Anwesenheit von Sauerstoff für die Chromophorreifung essentiell (Heim *et al.*, 1994). Die durch *aphII* kodierte Aminoglykosid-3'-O-Phosphotransferase kann Kanamycin in Anwesenheit zweiwertiger Kationen und ATP in verschiedenen Spezies durch Phosphorylierung inaktivieren (Haas & Dowding, 1975; Ditta *et al.*, 1980; Katzke *et al.*, 2010).

Durch die Umsetzung dieser Schritte soll das TREX-System die schnelle Aktivierung von Biosynthesegenclustern in verschiedenen bakteriellen Wirten erlauben. Auf diese Weise soll es möglich sein, passende Kombinationen von Biosynthesewegen und Expressionswirten zügig zu ermitteln.

Die unter 1.4.2 beschriebenen, potentiell problematischen Aspekte, die bei der Identifizierung eines geeigneten Wirtes essentiell sind, sollen bei Verwendung des TREX-Systems minimiert werden, da der Transfer der Biosynthesegene, der stabile Erhalt der Gene und deren Expression im Wirt sichergestellt sein sollen. Somit bleiben die fragliche korrekte Translation von mRNA fremder Ursprungs im Wirt (1.4.2.4) und die fragliche korrekte Biokatalyse durch fremde Enzyme vor dem biosynthetischen Hintergrund des Expressionswirtes (1.4.2.5) kritisch. Das TREX-System ermöglicht die experimentelle Überprüfung dieser nicht eindeutig vorherzusagenden Punkte.

1.6 ANSATZ ZUR EVALUIERUNG DES TREX-SYSTEMS

Im Rahmen dieser Arbeit soll das TREX-System hinsichtlich zweier kritischer Aspekte evaluiert werden: Es soll die Effizienz der konzertierten Transkription einer Genregion von zwei entgegengesetzten Promotoren aus untersucht werden und außerdem die Anwendbarkeit des Systems in verschiedenen Wirten überprüft werden.

Bei der gleichzeitigen Transkription einer Genregion in beiden Leserichtungen ist eine sterische Behinderung der gegenläufig transkribierenden Polymerasen denkbar. So könnte es zu einer verminderten Transkription besonders der mittig im Gencluster liegenden Gene kommen. Bei erfolgreicher mRNA-Synthese in beiden Orientierungen ist weiterhin die Hybridisierung der komplementären mRNA-Stränge denkbar, so dass keine Translation erfolgen kann. Um die Effizienz des Expressionsmodus zu evaluieren, eignet sich das in 1.3.5 vorgestellte *crt*-Gencluster aus *P. ananatis* (**Abb. 1-2**), weil es ein komplexes Gencluster mit entgegengesetzten Transkriptionseinheiten darstellt und für eine vollständige Biosynthese bis zum Carotinoid-Endprodukt die funktionelle Expression des Clusters in beiden Richtungen notwendig ist.

Um grundsätzlich die Funktionalität des Expressions-Systems in unterschiedlichen Organismen nachzuweisen, sollen verschiedene Bakterienstämme gewählt werden, die sich für die Produktion von Carotinoiden eignen. Die effektive Carotinoid-Produktion in Bakterien hängt von verschiedenen Faktoren ab. Derzeit werden besonders die Versorgung des Carotinoid-Biosyntheseweges mit ausreichend Vorstufen sowie die Verfügbarkeit von Speicherraum für lipophile Verbindungen als limitierend diskutiert (Das *et al.*, 2007). Zur Synthese von Isoprenen, die in der Carotinoid-Synthese als Vorstufen dienen, existieren zwei Wege: Der Mevalonat (MVA)-Weg (Lichtenthaler, 2007; Okada, 2011) und der Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg (Lange *et al.*, 2000; Hunter, 2007). Die meisten Bakterien stellen Isoprene über den MEP-Weg her (Rohmer *et al.*, 2004). Ausgehend von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat werden dabei über 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat und MEP die beiden Isoprene Isopentenyl-diphosphat (IPP) und Dimethylallyl-diphosphat (DMAPP) gebildet (Rohmer *et al.*, 2004). Bei erfolgreicher Carotinoid-Synthese aus den Isopren-Vorstufen muss den lipophilen Verbindungen ein geeigneter Speicherraum zur Verfügung gestellt werden. Da davon ausgegangen wird, dass die produzierten Carotinoide in die bakterielle Zellmembran eingelagert werden, könnte die Größe der Membranoberfläche direkt mit der Carotinoid-Produktionskapazität des Expressionsstammes zusammenhängen (Das *et al.*, 2007).

Im Folgenden werden daher die für die Evaluation des TRES-Systems als Expressionswirte ausgewählten Bakterienstämme, die sich im Hinblick auf die Voraussetzungen zur Carotinoid-Synthese unterscheiden, beschrieben.

I.6.1 Für die Evaluierung des TRES-Systems verwendete Expressionswirte

I.6.1.1 *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida ist ein Gram-negatives, aerobes, saprophytisches Bodenbakterium (Nelson *et al.*, 2002). Der hier verwendete Stamm *P. putida* KT2440 ist ein plasmidfreies Derivat von *P. putida* mt-2 (Bagdasarian *et al.*, 1981). Er weist ähnlich hohe Teilungsraten wie z. B. *E. coli* auf und kann ein breites Spektrum von Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen nutzen. Der Stamm *P. putida* KT2440 ist ein GRAS-Organismus (*generally recognized as safe*) (Wu *et al.*, 2011), dessen vollständige Genomsequenz verfügbar ist (Nelson *et al.*, 2002). Die Genetik und die vielseitigen Stoffwechselwege des Bakteriums sind Gegenstand eingehender Studien (Timmis, 2002; Puchałka *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011). Besonders interessant ist z. B. die Fähigkeit des Stammes Polyhydroxyalkanoate herzustellen (Wang & Nomura, 2010), die als Biokunststoffe vielfältig verwendet werden können (Keshavarz & Roy, 2010).

Der Stamm wurde bereits für die biotechnologische Produktion verschiedener Stoffe wie beispielsweise *cis, cis*-Mukonat (van Duuren *et al.*, 2011) verwendet, das als Ausgangsmaterial für verschiedene Grund-

und Feinchemikalien dienen kann. Weiterhin konnten durch heterologe Genexpression verschiedene Verbindungen mit diesem Wirt hergestellt werden. So wurde etwa die Synthese von Rhamnolipiden gezeigt (Wittgens *et al.*, 2011), die als Biotenside industrielle Anwendung finden können. Ein weiteres Beispiel ist die Synthese von Myxochromid S (Wenzel *et al.*, 2005), einem nicht-ribosomalen Peptid. Mittlerweile konnte außerdem die Synthese des Carotinoids Zeaxanthin in *P. putida* demonstriert werden (Beuttler *et al.*, 2011).

Als Grundbausteine für die Synthese von Carotinoiden stellt *P. putida* KT2440 über den MEP-Weg synthetisierte Isopren-Einheiten zur Verfügung (Eberl *et al.*, 2003). Da das Bakterium selbst nicht carotinogen ist, gibt es keinen *background* bei der Analyse heterolog synthetisierter Carotinoid-Verbindungen durch ähnliche, intrinsische Verbindungen. Die einfach strukturierte Zellmembran bietet keinen erweiterten Speicherraum für lipophile Verbindungen.

1.6.1.2 *Rhodobacter capsulatus*

Rhodobacter capsulatus ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes, phototrophes nicht-Schwefel-Purpurbakterium, das in Teichen und Seen vorkommt (Weaver *et al.*, 1975). Der hier verwendete Stamm *R. capsulatus* B10S ist ein spontan Streptomycin-resistentes Derivat des Stammes *R. capsulatus* B10 (Klipp *et al.*, 1988). Der außergewöhnlich vielseitige Energiestoffwechsel des Bakteriums wurde eingehend untersucht (Imhoff, 2006): *R. capsulatus* ist zur aeroben sowie zur anaeroben Respiration befähigt und kann zudem anoxygene Photosynthese betreiben. Durch die Prozesse der anoxygenen Photosynthese wird Lichtenergie in einen Protonengradienten umgewandelt, der zur Synthese von Energieäquivalenten in Form von ATP genutzt wird. Anders als bei Pflanzen entstehen beim hier genutzten zyklischen Photo-Elektronen-Transport weder Sauerstoff noch Redoxäquivalente. Präferenziell wächst das Bakterium photoorganoheterotroph unter anaeroben Bedingungen im Licht, kann aber auch chemotroph unter (mikro-)aeroben Bedingungen im Dunkeln gedeihen.

Die vollständige Genomsequenz von *R. capsulatus* steht zur Verfügung (Strnad *et al.*, 2010). Im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses an diesem Bakterium stehen neben dem Aufbau und der Funktionsweise des Photosynthese-Apparates (Gregor & Klug, 2002; Bauer *et al.*, 2003) verschiedene weitere Charakteristika. Beispielsweise ist *R. capsulatus* in der Lage, atmosphärischen Stickstoff zu fixieren (Masepohl *et al.*, 1988; Drepper *et al.*, 2003; Masepohl & Hallenbeck, 2010). Besonderes Interesse gilt weiterhin dem *gene transfer agent* von *R. capsulatus*, der den Austausch genetischen Materials nach einem ungewöhnlichen Mechanismus vermittelt (Leung *et al.*, 2010). Außerdem stellt das Bakterium die antimikrobielle Verbindung Bacteriocin her (Lee *et al.*, 2009a) und produziert Wasserstoff (Hoekema *et al.*, 2009).

Für die Synthese von Carotinoiden werden Isopren-Einheiten über den MEP-Weg synthetisiert (Boucher & Doolittle, 2000). *R. capsulatus* ist selbst carotinogen und bildet von den Isopren-Bausteinen ausgehend die Carotinoide Spheroiden und Spheroidenon (Armstrong *et al.*, 1989; Armstrong, 1997). **Abbildung I-8** zeigt den Carotinoid-Biosyntheseweg in *R. capsulatus*. Die ersten Schritte der Carotinoid-Synthese bis zur Entstehung von Phytoen verlaufen wie in *P. ananatis* (siehe I.3.5). Zunächst wird das durch Kondensation mehrerer Isopren-Bausteine gewonnene Farnesyl-diphosphat (FPP) mit Isopentenyl-diphosphat (IPP) durch die Geranylgeranyl-diphosphat-Synthase (CrtE) zu Geranylgeranyl-diphosphat (GGPP) kondensiert. Die Phytoen-Synthase (CrtB) katalysiert die Verbindung von zwei GGPP zu Phytoen.

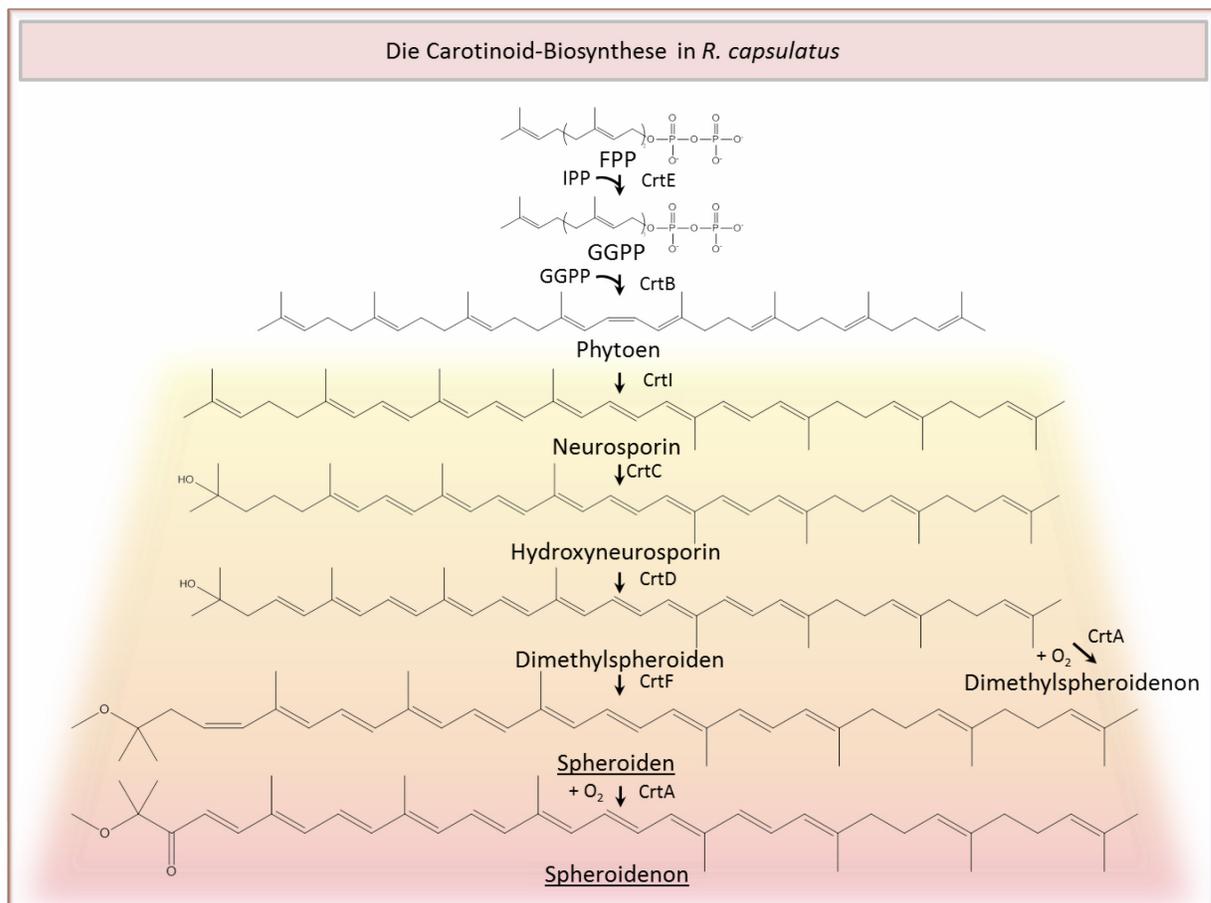


Abb. I-8: Die Carotinoid-Biosynthese in *R. capsulatus*

Ausgehend von Isopren-Bausteinen entsteht als Hauptprodukt Spheroiden oder in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Sauerstoff Spheroidenon. Der Farbverlauf deutet die Farben der Carotinoid-Verbindungen an. FPP = Farnesyl-diphosphat, IPP = Isopentenyl-diphosphat, GGPP = Geranylgeranyl-diphosphat, CrtE = GGPP-Synthase, CrtB = Phytoen-Synthase, CrtI = Phytoen-Desaturase, CrtC = Hydroxyneurosporin-Synthase, CrtD = Hydroxyneurosporin-Desaturase, CrtF = Hydroxyneurosporin-O-Methyltransferase, CrtA = Spheroiden-Monooxygenase. Nach Armstrong (1997).

Im folgenden Schritt entsteht anders als in *P. ananatis* Neurosporin durch das Einführen von drei Doppelbindungen durch die Phytoen-Desaturase (CrtI). Dieses wird durch Katalyse der

Hydroxyneurosporin-Synthase (CrtC) zu Hydroxyneurosporin umgesetzt. Die folgenden Schritte sind leicht vereinfacht dargestellt. Die Hydroxyneurosporin-Desaturase (CrtD) stellt aus Hydroxyneurosporin Dimethylspheroiden her. Hieraus kann nun das Endprodukt des Biosyntheseweges Spheroiden durch Katalyse der Hydroxyneurosporin-O-Methyltransferase (CrtF) entstehen. In Anwesenheit von Sauerstoff kann allerdings die Spheroiden-Monooxygenase (CrtA) Spheroiden zu Spheroidenon und auch Dimethylspheroiden zu Dimethylspheroidenon umsetzen.

Die Carotinoide in *R. capsulatus* sind als Bestandteil des Photosystems gemeinsam mit den Chlorophyllen im Lichtsammelkomplex II assembliert, wo sie zwei Funktionen erfüllen. Sie dienen als sogenannte akzessorische Pigmente, die im blau-grünen Spektralbereich Licht absorbieren und diese Energie an die Bakteriochlorophyll-Moleküle abgeben (Noguchi *et al.*, 1990; Armstrong, 1997), wodurch sie einen Teil der „Grünlücke“ im Absorptionsspektrum des Bakteriochlorophylls schließen. Außerdem schützen sie die Bakteriochlorophylle vor Zerstörung durch Photooxidation (Armstrong, 1997; Glaeser & Klug, 2005).

R. capsulatus kann in Anpassung an den phototrophen *lifestyle* spezielle Membran-Strukturen ausbilden (Golecki *et al.*, 1980). Dieses intrazytoplasmatische Membransystem entsteht durch Ausstülpungen der Zytoplasmamembran und Abschnürungen davon zu Vesikeln und dient der Einlagerung der Proteinkomplexe des Photosyntheseapparates (Golecki *et al.*, 1979; Drews & Golecki, 2004; Imhoff, 2006). Diese Strukturen könnten einen Speicherraum für heterologe lipophile Verbindungen bieten. Bei der Synthese heterologer Carotinoide im nah verwandten *Rhodobacter spheroides* wurde die Inkorporation dieser in die Lichtsammelkomplexe selbst gezeigt (Hunter *et al.*, 1994; Garcia-Asua *et al.*, 2002).

1.6.1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes Enterobakterium, das erstmals 1885 isoliert wurde (Escherich, 1885). Das schnell-wachsende Bakterium ist der Modellorganismus unter den Prokaryoten und gilt als der erste Expressionswirt der Wahl.

Das Genom des hier verwendeten Stammes *E. coli* BL21(DE3) (Studier & Moffatt, 1986) ist vollständig sequenziert (Jeong *et al.*, 2009) und hat GRAS-Status. Aufgrund von zwei Eigenschaften ist er der am häufigsten verwendete Expressionsstamm für heterologe Proteinsynthese (Terpe, 2006). Zunächst ist der Ausgangsstamm *E. coli* BL21 Protease-defizient (*lon*⁻ und *ompT*⁻), was die Stabilität heterologer Proteine begünstigt. Außerdem trägt der Stamm BL21(DE3) das λ DE3 Lysogen im Genom, das das Gen für die T7RP unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors zusammen mit dem *lac*-Repressor-Gen *lacI* unter Kontrolle seines natürlichen Promotors enthält (Studier & Moffatt, 1986). Durch Laktose wird der Repressor vom *lac*-Promotor gelöst und damit die Expression der T7RP induziert. So kann indirekt die Expression von

Genen mit T7-Promotoren, wie sie z. B. die pET-Vektoren enthalten (Rosenberg *et al.*, 1987; Studier *et al.*, 1990), kontrolliert werden. Der Stamm wurde bereits unter anderem für die biotechnologische Produktion von humanem Insulin (Shin *et al.*, 1997), L-Phenylalanin (Khamduang *et al.*, 2009), einem *single-chain* Antikörper (Zhao & Wei, 2007), Biowasserstoff (Kim *et al.*, 2012) und Hämoglobin (Smith *et al.*, 2011) verwendet. Es konnten außerdem bereits erfolgreich Biosynthesewege für verschiedene Carotinoide in *E. coli* etabliert werden (Kim *et al.*, 2003; Lee & Kim, 2006).

Für die heterologe Synthese von Carotinoiden stellt *E. coli* Isopren-Vorläufer über den MEP-Weg her (Rohmer *et al.*, 1993; Boucher & Doolittle, 2000). Wie auch in *P. putida* wird hier die Analytik heterologer Pigmente nicht durch einen intrinsischen *background* behindert. Ebenfalls wie in *P. putida* und anders als in *R. capsulatus* ist hier der Speicherraum für lipophile Verbindungen begrenzt.

I.7 MÖGLICHE WEITERENTWICKLUNGEN DES TREX-SYSTEMS

Für die Aktivierung eines Biosynthese-Genclusters in einem heterologen Wirt werden im TREX-System zwei flankierend am Gencluster liegende, entgegengesetzt orientierte T7-Promotoren verwendet, von denen aus die Transkription aller dazwischen liegenden Gene unabhängig von ihrer Orientierung durch die T7RP bewerkstelligt werden soll. Es wurde allerdings gezeigt, dass die konzertierte Transkription eines Gens in beiden Orientierungen zu verminderten Leveln an *sense* mRNA im Gegensatz zu unidirektionaler Transkription des Gens in *sense* führt (Markert, 2008). **Abbildung I-9** zeigt dies schematisch.



Abb. I-9: Schematische Darstellung des Nachweises einer Verminderung des Transkriptlevels eines Reportergens bei konzertierter bidirektionaler Expression durch die T7 RNA Polymerase

Es wurden die dargestellten Plasmide in vergleichenden Expressionsstudien in *E. coli* eingesetzt. Bei Verwendung des Plasmids mit beiden TREX-Kassetten und einem Reportergen wurde im Vergleich zur Kontrolle mit nur einer TREX-Kassette ein vermindertes *sense* Transkriptlevel festgestellt (durch Anzahl $+$ dargestellt). Nach Markert (2008).

Dieses Phänomen könnte auf die gegenseitige physische Behinderung der gegenläufig lesenden Polymerasen oder die Hybridisierung komplementärer mRNA-Moleküle zurückzuführen sein (siehe I.6). Um eine effiziente und vollständige Transkription der relevanten Gene einer im TREX-Modus umschlossenen Genregion sicherzustellen, könnte die Regulation der Genexpression von den einzelnen Promotoren vorteilhaft sein. Eine strikte Kontrolle über die individuelle Promotoraktivität würde eine gezielte Ansteuerung erlauben und so die Transkription in nur einer Orientierung zu einer Zeit ermöglichen.

Außerdem könnte die gezielte Regulation der Expression von den beiden Promotoren der TREX-Kassetten in bestimmten Fällen auch den metabolischen Fluss im kodierten Biosyntheseweg unterstützen. Es ist bekannt, dass die Expression von Genen, also die Produktion von Proteinen eine Bakterienzelle viel Energie und Ressourcen kostet. Deshalb steht in natürlichen Systemen die ökonomische Optimierung von Expressionsleveln unter Evolutionsdruck (Wagner, 2007). Eine entsprechende Optimierung bei der Aktivierung von Genclustern mittels TREX könnte effizientere Produktsynthesen erbringen. Dazu müssen die Gene eines zu exprimierenden Genclusters, deren Enzyme die frühen Schritte der Biosynthese katalysieren, in entgegengesetzter Orientierung zu denen arrangiert sein, deren Enzyme die späten Schritte der Biosynthese umsetzen. Ein solches Arrangement mag bei natürlich vorkommenden Genclustern höchstens äußerst selten vorkommen, aber bei der Erzeugung synthetischer Gencluster (siehe I.4.1) könnte dies berücksichtigt werden. So könnten die zuerst benötigten Biokatalysatoren durch Aktivierung nur eines Promotors exprimiert werden und die Expression von später benötigten Biokatalysatoren zum entsprechenden Zeitpunkt durch Aktivierung des zweiten Promotors realisiert werden. Für die Produktion eines Zell-toxischen Endprodukts mag ein solches Arrangement besonders attraktiv sein. So könnte etwa die Umsetzung zum problematischen Endprodukt gezielt unterbunden werden, solange die Zellkultur wächst und maximale Mengen an Vorstufen bereitstellt, um schließlich die Umsetzung maximal anzuschalten und nach möglichst kurzer Zeit das Produkt zu extrahieren.

Es bestehen verschiedene Möglichkeiten, auf die Expression von beiden T7-Promotoren im TREX-System Einfluss zu nehmen. Natürlicherweise nutzen Bakterien verschiedenste Aktivierungs- und Repressions-Mechanismen zur Kontrolle der Genexpression. Ein Teil dieser Kontrollsysteme wie z. B. das *lac*-System ist detailliert beschrieben und für biotechnologische Anwendungen adaptiert worden (Jacob & Monod, 1961; Terpe, 2006). Daneben werden fortlaufend weitere Kontrollsysteme entwickelt und etabliert.

I.7.1 Genregulation durch Licht

Bakterien sind in der Lage durch komplexe regulatorische Netzwerke auf verschiedene Umwelteinflüsse zu reagieren (Samal & Jain, 2008; van Hijum *et al.*, 2009). Dabei werden verschiedenste Aktivierungs- und Repressions-Mechanismen verwendet, um adaptiv die Genexpression zu steuern. Licht stellt einen externen Reiz dar, der solche Prozesse triggern kann und für die synthetische Kontrolle von Genexpression verwendet werden kann. Der damit befasste Forschungsbereich wird als *optogenetics* bezeichnet. Er ist deshalb so reizvoll, weil die einzigartigen physikalischen Eigenschaften von Licht eine unabhängige, Raum- und Zeit-aufgelöste Steuerung verschiedener mikrobieller Prozesse in nicht-invasiver Art und Weise erlauben (Drepper *et al.*, 2011).

Um dies umzusetzen, können sogenannte *photocaged* Biokomponenten genutzt werden, die in Reaktion auf Belichtung eine Schutzgruppe verlieren und so ihre biologische Funktion wie die Derepression von Expression (*photocaged* IPTG) (Young & Deiters, 2007) oder der Start der Transkription (*photocaged* T7 RNA Polymerase) (Chou *et al.*, 2010) erlangen.

Weiterhin wurden synthetische Photorezeptoren konstruiert, die aus einer Licht-absorbierenden Sensor-Domäne und einer fusionierten Effektor-Domäne, deren Aktivität durch den Licht-abhängigen Zustand der Sensor-Domäne kontrolliert wird, bestehen (Möglich & Moffat, 2010). Aufgrund des modularen Aufbaus natürlich vorkommender Photorezeptoren ist die Funktionalität derartiger synthetischer Fusionskonstrukte möglich (Pawson & Nash, 2003; Grünberg & Serrano, 2010). Um mithilfe synthetischer Photorezeptoren Kontrolle über Genexpression zu erlangen, werden als Effektor-Domäne solche Proteine gewählt, die Teil eines Zwei-Komponenten-Systems sind. Zwei-Komponenten-Systeme setzen sich grundsätzlich aus einer Histidin-Kinase und einem *response regulator* zusammen, der typischerweise direkt als Transkriptionsfaktor agiert (West & Stock, 2001). In solcher Weise funktionierende Licht-abhängige Zwei-Komponenten-Systeme sind aus der Natur bekannt (Drepper *et al.*, 2011). Das erste Beispiel eines synthetischen, Licht-abhängigen Zwei-Komponenten-Systems war Cph8 (Levskaia *et al.*, 2005), das aus einer Rotlicht-detektierenden Photosensor-Domäne vom Phytochrom Cph1 aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 und einer Histidin-Kinase-Domäne von EnvZ aus *E. coli* zusammengesetzt ist. Die Domänen entstammen jeweils natürlichen Zwei-Komponenten-Systemen (Forst & Roberts, 1994; Yeh *et al.*, 1997) und behalten in dieser Kombination ihre Funktion. Es konnte in Expressionsstudien mit *E. coli* gezeigt werden, dass Cph8 im Dunkeln aktiviert ist, was die Phosphorylierung eines spezifischen *response regulators* durch die Kinase-Domäne bewirkt, sodass dieser die Expression eines Reportergens aktivieren kann. Rotes Licht inhibiert dies spezifisch, sodass die Expression des Reporters reprimiert wird. Ein weiteres Beispiel eines Licht-abhängigen Zwei-Komponenten-Systems stellt YF1 dar (Möglich *et al.*, 2009) (**Abb. I-10**). Es besteht aus der Blaulicht-

detektierenden LOV-Domäne von YtvA aus *Bacillus subtilis* und der Kinase-Domäne von FixL aus *Bradyrhizobium japonicum*. Die Kinase-Domäne von FixL ist ebenfalls natürlicherweise Teil eines Zwei-Komponenten-Systems, wobei die Sensor-Domäne dieses Systems strukturelle Ähnlichkeiten mit der LOV-Domäne von YtvA aufweist. Expressionsstudien in *E. coli* zeigten die Funktionalität der kombinierten Elemente. Im Dunkeln ist YF1 aktiviert, so dass die Kinase-Domäne wiederum ihren *response regulator* FixJ phosphoryliert, der die Transkription eines Reportergens unter Kontrolle eines spezifischen Promotors P_{fixK2} erwirkt. Unter Blaulicht ist dieses System wie Cph8 im Rotlicht inaktiv.

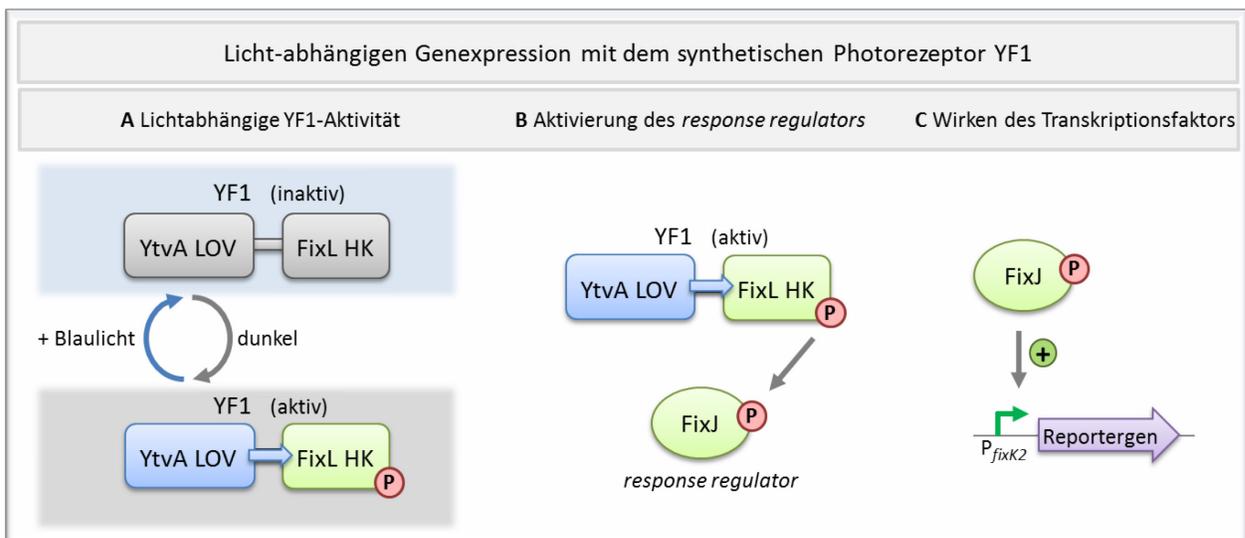


Abb I-10: Lichtabhängige Genexpression mit dem synthetischen Photorezeptor YF1

A Die Aktivität der Histidin-Kinase-Domäne von YF1 wird durch den Lichtzustand der LOV-Domäne kontrolliert. Unter Blaulicht ist die Kinase inaktiv, während sie im Dunkeln eine Autophosphorylierung vollziehen kann. **B** Die phosphorylierte Kinase-Domäne von YF1 aktiviert den *response regulator* FixJ durch Phosphorylierung. **C** Der phosphorylierte *response regulator* FixJ kann als aktivierender Transkriptionsfaktor spezifisch am Promotor P_{fixK2} die Expression eines Reportergens bewirken.

YF1 = Chimärer Photorezeptor aus YtvA LOV und FixL HK (Möglich *et al.* (2009)), YtvA LOV = LOV-Domäne von YtvA aus *Bacillus subtilis*, FixL HK = Histidin-Kinase-Domäne von FixL aus *Bradyrhizobium japonicum*, P = Phosphat.

Nach Drepper *et al.* (2011).

Diese Mechanismen wurden bereits zu komplexeren Schaltkreisen weiterentwickelt (Tabor *et al.*, 2009; Tabor *et al.*, 2011; Ohlendorf *et al.*, 2012). Zudem existieren weitere Beispiele, die nach dem beschriebenen Grundprinzip funktionieren (Strickland *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 2010; Morgan & Woolley, 2010; Strickland *et al.*, 2010).

Die angesprochenen Arbeiten demonstrieren eindrücklich die Anwendbarkeit von Licht für die Steuerung von Genexpression. Es könnte die differentielle Regulation der Expression von den T7-Promotoren im TRES-System durch *optogenetics* eine elegante, nicht-invasive Möglichkeit bieten, die Aktivierung der beiden Transkriptionsrichtungen zeitlich aufzulösen.

I.8 ZIELSETZUNG

Mikroorganismen produzieren eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten, die für medizinische und andere Applikationen relevant sind - oder sein könnten, wäre ihre Analyse möglich. Der direkte Zugang zu diesen Verbindungen ist allerdings eingeschränkt, weil die ursprünglichen Produzenten häufig nicht kultivierbar sind. Daher werden natürliche Verbindungen häufig in besser handhabbaren, heterologen Wirtsstämmen produziert. Dafür müssen ganze Biosynthese-Gencluster in einem solchen Wirt zur heterologen Expression gebracht werden. Da dabei die Kompatibilität eines Biosyntheseweges mit der Wirtsphysiologie schwer vorherzusagen ist, ist ein breites *Screening* verschiedener Wirtsorganismen wünschenswert. Derzeit ist die Umsetzung eines solchen Verfahrens mit großem Aufwand verbunden, weil für die Aktivierung eines Genclusters in verschiedenen Wirtskandidaten üblicherweise verschiedene genetische Elemente angepasst werden müssen. Durch ein kombinatorisches Verfahren soll das in I.5 beschriebene *transfer and expression* (TREX) System das *Screening* verschiedener Wirte bei Verwendung unmanipulierter Gencluster ermöglichen und so den Zugang zu wertvollen mikrobiellen Naturstoffen verbessern.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die eingehende Charakterisierung der TREX-Anwendung. Dabei stehen zwei Hauptfragen im Vordergrund: Es soll (i) die Umsetzbarkeit der im TREX-System vorgesehenen simultanen, konvergenten Transkription eines Genclusters durch die T7 RNA Polymerase untersucht und (ii) die Anwendbarkeit des Systems in einem weiten Wirtsspektrum überprüft werden. Dazu soll das Carotinoidbiosynthese-Gencluster aus *P. ananatis* mittels TREX in *P. putida*, *R. capsulatus* und *E. coli* zur Expression gebracht werden.

Unter Verwendung von *P. putida* als Expressionswirt soll zunächst die Frage nach der bidirektionalen Expression des *crt*-Genclusters untersucht werden. Weiterhin soll der Einfluss der randomisierten Integration der heterologen *crt*-Gene im Wirtschromosom analysiert werden.

Um die Funktionalität des TREX-Systems in verschiedenen Wirten zu zeigen und den Einfluss der Wirtsphysiologie auf die Carotinoid-Synthese darzustellen, soll das Gencluster außerdem im phototrophen, intrinsisch carotinogenen Bakterium *R. capsulatus* sowie im Standard-Expressionswirt *E. coli* vergleichend exprimiert werden.

Im letzten Teil der Arbeit soll schließlich ein *optogenetics*-System vorgestellt werden, auf dessen Basis eine gezielte Regulation von Promotoraktivitäten durch Licht im Rahmen des TREX-Systems etabliert werden könnte.

II MATERIAL & METHODEN

II.1 Chemikalien, Lösungsmittel und Verbrauchsmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Lösungsmittel sowie Verbrauchsmittel wurden jeweils im Reinheitsgrad entsprechend der Anwendung von den folgenden Firmen bezogen. Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Roth, Invitrogen, Sigma, Serva, Gerbu und Fluka erworben. Für HPLC-Anwendungen wurden Lösungsmittel im entsprechenden Reinheitsgrad benutzt. Sämtliche Verbrauchsmittel sowie Lösungen für RNA-Aufarbeitungen und qPCR-Anwendungen wurden als RNase-frei erworben. Medienkomponenten wurden von Difco BRL, Fluka, Roth und Sigma bezogen. Spezielle Verbrauchsmittel sowie Geräte werden bei der Beschreibung der jeweiligen Methoden angegeben.

II.2 Verwendete Bakterienstämme

Tab. II-1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und deren relevante Eigenschaften

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> : Klonierung		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F</i> ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁺) <i>phoA supE44</i> λ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> JM110	<i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>thr leu thi-1 lacY galk galT ara tonA tsx dam dcm supE44</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) [<i>F'</i> <i>traD36 proAB lacI</i> ^Z Δ M15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
<i>E. coli</i> S17-1	<i>recA, thi, pro, hsdR</i> ^M [<i>RP4 2-Tc</i> ^R :: <i>Mu</i> :: <i>Km</i> ^R <i>Tn7</i>] <i>Tp</i> ^R <i>Sm</i> ^R	Simon <i>et al.</i> (1983)
<i>Pseudomonas putida</i> : <i>crt</i> Expression		
<i>P. putida</i> KT2440	Wildtyp-Stamm	Nelson <i>et al.</i> (2002)
<i>PpTREXcrt</i> Δ X-a	<i>P. putida</i> KT2440:: <i>TREX-crt</i> Δ X in PP_5236	diese Arbeit
<i>PpTREXcrt</i> Δ X-b	<i>P. putida</i> KT2440:: <i>TREX-crt</i> Δ X in PP_3797	diese Arbeit
<i>PpTREXcrt</i> Δ X-c	<i>P. putida</i> KT2440:: <i>TREX-crt</i> Δ X zwischen PP_3618/PP_3619	diese Arbeit
<i>PpTREXcrt</i> Δ X-d	<i>P. putida</i> KT2440:: <i>TREX-crt</i> Δ X-d	diese Arbeit
<i>PpTREXcrt</i> Δ X-e	<i>P. putida</i> KT2440:: <i>TREX-crt</i> Δ X-e	diese Arbeit
<i>PpTREXcrt</i> Δ X-f	<i>P. putida</i> KT2440:: <i>TREX-crt</i> Δ X-f	diese Arbeit
<i>PpTREXcrt</i> Δ X-g	<i>P. putida</i> KT2440:: <i>TREX-crt</i> Δ X-g	diese Arbeit
<i>PpTREXcrt</i> Δ X-h	<i>P. putida</i> KT2440:: <i>TREX-crt</i> Δ X-h	diese Arbeit
<i>PpTREXcrt</i> Δ X-i	<i>P. putida</i> KT2440:: <i>TREX-crt</i> Δ X-i	diese Arbeit
<i>PpTREXcrt</i> Δ X-j	<i>P. putida</i> KT2440:: <i>TREX-crt</i> Δ X-j	diese Arbeit
<i>PpTREXcrt</i> Δ Z	<i>P. putida</i> KT2440:: <i>TREX-crt</i> Δ Z	diese Arbeit
<i>Rhodobacter capsulatus</i> : <i>crt</i> Expression		
<i>R. capsulatus</i> B10S	Wildtyp-Stamm	Klipp <i>et al.</i> (1988)
<i>R. capsulatus</i> Δ crtC	<i>R. capsulatus</i> B10S Δ crtC (Ω -Sp ^R)	Loeschcke (2008)
<i>RcTREXcrt</i> Δ X	<i>R. capsulatus</i> Δ crtC:: <i>TREX-crt</i> Δ X	diese Arbeit

Tab. II-1: Fortsetzung - Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und deren relevante Eigenschaften.

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> : crt Expression und Licht-regulierte Genexpression		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ $\lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])$	Studier & Moffat (1986)
<i>EcTREXcrtΔZ</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)::TREX-crtΔZ	diese Arbeit
<i>E. coli</i> Tuner(DE3)	$F^- ompT hsdSB (r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1(DE3)$	Novagen
<i>E. coli</i> JM109(DE3)	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k^-, m_k^+), relA1, supE44, λ-, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^ΔZΔM15], IDE3</i>	Promega

II.3 Verwendete Plasmide

Tab. II-2: Übersicht über die verwendeten Plasmide und deren relevante Eigenschaften

Erzeugte Konstrukte wurden durch Sequenzierung (Firma Sequiserve) überprüft.

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
pEB1	P_{lacUV5} T7 RNA Polymerase-Gen, <i>lacI</i> , Ap ^R	Brunschwig & Darzins (1992)
pASK-IBA3	Ap ^R , P_{tetA} , Strep-tag	IBA
pML5	RSF1010-Derivat, Tc ^R , <i>lacZYA</i>	Labes <i>et al.</i> (1990)
pML5- P_{lac} T7	pML5, P_{lacUV5} T7 RNA Polymerase-Gen, <i>lacI</i>	diese Arbeit
pUC18crtΔX	pUC18, <i>crtEYIBZ</i>	Loeschcke (2008)
pTREX-crtΔX	pUC18, <i>crtEYIBZ</i> , L-/R-TREX	Loeschcke (2008)
pBBR1MCS3	Tc ^R , <i>lacZα</i>	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pBBR1MCS3-T7	pBBR1MCS3, P_{lacUV5} T7 RNA Polymerase-Gen, <i>lacI</i>	diese Arbeit
pUC18crtΔZ	pUC18, <i>crtEXYIZ</i>	Loeschcke (2008)
pTREX-crtΔZ	pUC18, <i>crtEXYIB</i> , L-/R-TREX	Loeschcke (2008)
pML5- P_{fru} T7	pML5, P_{fru} T7 RNA Polymerase-Gen, <i>lacI</i>	Arvani <i>et al.</i> (2012)
pUC18	Ap ^R , <i>lacZα</i>	Vieira & Messing (1982)
pKD46	Ap ^R , P_{araB} , <i>araC, exo beta gam, ori101 repA</i>	Datsenko & Wanner (2000)
pUC18ts	pUC18 MCS & Ap ^R , pKD46 ori101 + <i>repA</i>	diese Arbeit
pUC18tsCRTΔZ	pUC18ts, <i>crtEXYIB</i>	diese Arbeit
ptsTREX-crtΔZ	pUC18ts, <i>crtEXYIB</i> , L-/R-TREX	diese Arbeit
pRhotHi-2	pBBR1-MCS-Derivat, pET22b- P_{T7} -MCS, Km ^R , Cm ^R	Katzke (2010)
pRhotHi-2-YFP	pRhotHi-2, YFP-His6	Binder (2011)
pRcExpII-2	pBBR1-MCS-Derivat, pET22b- P_{T7} -MCS, Km ^R , Cm ^R , <i>lacI</i>	Binder (2011)
pRcExpII-2-YFP	pRcExpII-2, YFP-His6	Binder (2011)
pET28c-YF1-FixJ	pET28c, <i>yf1-fixJ</i> , Km ^R	Möglich <i>et al.</i> (2009)
pFKlac	pRK290, P_{fixK2} <i>lacZ</i> , Tc ^R	Möglich <i>et al.</i> (2009)
pRcExpII-2-YF1-FixJ	pRcExpII-2, <i>yf1-fixJ</i>	Binder (2011)
pRcExpII-2-YF1-FixJ-PFixK2-LacZ	pRcExpII-2-YF1-FixJ, P_{fixK2} <i>lacZ</i> , Km ^R , Cm ^R	diese Arbeit

II.4 Verwendete Oligonukleotide

Tab. II-3: Übersicht über die genutzten Oligonukleotide, deren Sequenz und deren Verwendung

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Nachweis der <i>crt</i> -Gene		
Crt1-for	ATATTCTAGAGGTACCGCACGGTCTGCCAATC	PCR <i>crtEXYI'</i>
Crt1-rev	ATATGGATCCCCGCAGCTTGTAGACGAATTG	PCR <i>crtEXYI'</i>
Überprüfen der Sequenz von <i>crtZ</i>		
Crt2-for	ATATGGATCCCCGCTTACTGCTTGAAC	PCR <i>crt'IBZ</i>
Crt2-rev	ATATGAATTCAAGCTTTAAAAAGCCTGGCG	PCR <i>crt'IBZ</i>
crtZSeq-up	GAGATGAAAACGCGCCAG	Sequenzierung <i>crtZ</i>
crtZSeq-dwn	ATATGAATTCAAGCTTTAAAAAGCCTGGCG	Sequenzierung <i>crtZ</i>
Bestimmung des <i>crt</i> -Insertionsortes im bakteriellen Chromosom		
Seq out OEL	GTTTCGAAATGACAGATCCTCGCTAC	Sequenzierung Insertionsort
Seq out OER	ACGGGAAAGGTTCCGTTCCAGG	Sequenzierung Insertionsort
PCRs für Klonierungen		
pUC18 MCS <i>NcoI</i>	ATATCCATGGGATAACAATTTACAC	PCR MCS + Ap ^R
pUC18 Ap ^R <i>BstBI</i>	TATATTCGAAATATGAGTAAACTTGG	PCR MCS + Ap ^R
pKD46 ori101 <i>BstBI</i>	ATATTTGAAACCCCGTTGATGATACC	PCR ori101 + <i>repA</i>
pKD46 rep <i>NcoI</i>	TATACCATGGAACCTCAGATCCTCCG	PCR ori101 + <i>repA</i>
pFKlac P _{fixK2} <i>NheI</i>	ATATGCTAGCTGGGAATTCGAGCTCGGTAC	PCR P _{fixK2} + <i>lacZ</i>
pFKlac LacZ <i>NheI</i>	ATAT GCTAGC GCTTATTTTTGACACCAGACCA	PCR P _{fixK2} + <i>lacZ</i>
RT-qPCR		Größe [bp] / Tm [°C]
<i>crtE</i> -for	GCGGTTTCTGAACTGTCAAA	20 / 59
<i>crtE</i> -rev	TCCCCTTCAGACAGATCCTT	20 / 59
<i>crtX</i> -for	CGTTACCGGCTTGTTCAT	20 / 60
<i>crtX</i> -rev	AACGGGATGAAGACGTTGAC	20 / 60
<i>crtY</i> -for	CCTACCACGGCTATTCCT	20 / 59
<i>crtY</i> -rev	GAGGCCGACGTAAAGACATC	20 / 60
<i>crtI</i> -for	GATCCCCGCTTACTGCTTG	20 / 60
<i>crtI</i> -rev	ACCCCTGATCCTCGTAGACA	20 / 60
<i>crtB</i> -for	ACCAGGCGTAGAGCATCAGT	20 / 60
<i>crtB</i> -rev	CGAAAAGTTTTGCGACAGC	19 / 60
<i>crtZ</i> -for	ATCATGAACCGGTAAAGGT	20 / 60
<i>crtZ</i> -rev	CAGGATCGATAATGCAGCAA	20 / 60
<i>Ec rpoD</i> -for	ATATCAACCGTGTATGTCCATC	23 / 60
<i>Ec rpoD</i> -rev	TAAGTTCGCTTCAACCATCTCTT	23 / 60
<i>Rc rpoD</i> -for	GCTACATCACCATCGACCAG	20 / 59
<i>Rc rpoD</i> -rev	ACATCACATCCTCGATCTGC	20 / 59
<i>Pp rpoD</i> -for	TCGCCAAGAAGTACACCAAC	20 / 59
<i>Pp rpoD</i> -rev	TTTCATCAGACCGATGTTGC	20 / 60

II.5 Allgemeine Anzucht von Bakterien

II.5.1 Anzucht von *E. coli*, *P. putida* und *R. capsulatus*

E. coli und *P. putida* wurden mit LB-Medium (in flüssigem LB oder auf LB_{Agar}-Platten) kultiviert. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C (*E. coli*) bzw. 30°C (*P. putida*). Platten wurden über Nacht inkubiert. Flüssigkulturen bis 5 ml wurden im Reagenzglas auf einem Brutroller bzw. im *deep-well*-Format bei 600 UpM auf einer Schüttelplatte inkubiert, während größere Volumina in Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen: max. 1/10 des Gefäßvolumens) mit 120 UpM geschüttelt wurden. Die Zelldichte wurde photometrisch durch Trübungsmessung bei 580 nm mit dem Photometer *Genesys 6* (Thermo Scientific) bestimmt und wird als OD (= optische Dichte, 1 ml Messvolumen, 1 cm Schichtdicke) angegeben. Zum Anlegen einer Gefrierkultur wurde eine 5 ml-Kultur mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht inkubiert. Zu 1,8 ml dieser Kultur wurden 138 µl DMSO gegeben und die Gefrierkultur bei -80°C gelagert. *R. capsulatus* wurde in flüssigem RCV+N-Minimalmedium oder auf PY_{Agar}-Platten anaerob oder aerob kultiviert. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 30°C. Für die anaerobe (photoheterotrophe) Kultivierung wurden Platten in dicht verschließbaren Inkubationstöpfen unter Verwendung von *Microbiology Anaerocult*®A (Merck) über drei Tage im Licht von Glühbirnen (etwa 2500 lux) inkubiert. Anaerobe Flüssigkulturen wurden in dicht verschließbaren Hungate-Röhrchen (Hungate, 1969), die durch ein Septum mit Argon begast wurden, stehend inkubiert. Die aerobe Anzucht von Platten erfolgte im Dunkeln in einem üblichen Inkubator, Flüssigkulturen verschiedener Volumina wurden in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 120 UpM im Dunkeln geschüttelt. Die Zelldichte wurde photometrisch bei 660 nm gemessen und wird als OD angegeben. Zum Anlegen einer Gefrierkultur wurde eine 5 ml-Kultur mit Zellmaterial einer anaerob gewachsenen Platte inokuliert und über Nacht inkubiert. Es wurden 2 ml von dieser Kultur pelletiert und in 1 ml PYG-Medium resuspendiert. Zu 0,5 ml dieser Zellsuspension wurden 0,5 ml Glycerol gegeben und die Gefrierkultur bei -80°C gelagert.

Wurden Bakterien mit eingebrachten Plasmiden oder Transposons kultiviert, wurden den Kulturen entsprechende Antibiotika zugesetzt.

II.5.2 Nährmedien

Sämtliche Lösungen wurden mit A. dest. angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert.

Die folgenden Medien wurden für die Kultivierung von Bakterien verwendet:

LB (1 L): 10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt (+ 15 g Agar für LB_{Agar}-Platten)

PY (1 L): 10 g Bacto Peptone, 0,5 g Hefeextrakt (+15 g Agar für PY_{Agar}-Platten)

Separat autoklaviert: 2 ml 1 M MgCl₂, 2 ml 1 M CaCl₂, 2,4 ml 0,5 % FeSO₄ (w/v)

II.5.2 Nährmedien *Fortsetzung*

PYG (1 L): 3 g Bacto Peptone, 3 g Hefeextrakt

Separat autoklaviert: 2,5 ml 20% MgCl₂ (w/v), 4 ml 7,5% CaCl₂ (w/v)

RCV+N (1 L): 40 ml 10% DL-Malat (w/v), 1 ml 20% MgSO₄ (w/v), 1 ml 7,5% CaCl₂ (w/v), 2 ml 1% EDTA (w/v), 2,4 ml 0,5% FeSO₄ (w/v), 1 ml 0,1% Thiamin (w/v), 1 ml Spurenelementlösung, 9,6 ml 1M Phosphat-Puffer (pH 6,8), 10 ml 10% (NH₄)₂SO₄; pH 6,8

Spurenelementlösung für RCV (1 L): 0,4 g MnSO₄ (x1 H₂O), 0,7 g H₃BO₃, 0,01 g Cu(NO₃)₂(x3 H₂O), 0,06 g ZnSO₄ (x7 H₂O), 0,02 g NaMoO₄ (x2 H₂O)

II.5.3 Antibiotika

Antibiotika wurden mit A. dest. angesetzt und steril filtriert (Sterile Syringe Filter 0,45 µm, Celluloseacetat, von VWR), bzw. in 70 % Ethanol angesetzt (Tetrazyklin und Irgasan).

Tab. II-4: **Verwendete Endkonzentrationen (in µg/ml) der für verschiedene Bakterien verwendeten Antibiotika**

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>P. putida</i>	<i>R. capsulatus</i>
Ampicillin	100	-	-
Gentamycin	10	25	4
Tetrazyklin	10	50	1,5 (PY) / 0,25 (RCV)
Kanamycin	50	25	-
Spectinomycin	100	-	10
Streptomycin	-	-	200
Irgasan	-	25	-

II.5.4 Induktoren

E. coli-Expressionskulturen wurden unter Verwendung von 1 M IPTG-Lösung (in A. dest., steril filtriert) induziert, während für *P. putida* 100 mM IPTG in 70 % Ethanol verwendet wurde. Zur Induktion von *R. capsulatus*-Expressionskulturen wurde steril filtrierte 1,2 M Fruktose-Lösung genutzt.

II.6 Spezielle Anzucht von Bakterien

II.6.1 Kultivierung von *P. putida* und *E. coli* für *crt*-Expressionsstudien

Um einen TRES-manipulierten *P. putida* oder *E. coli*-Stamm in *crt*-Expressionsstudien zu untersuchen, wurde zunächst eine mit einer Einzelkolonie inokulierte 5 ml-Kultur über Nacht inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 50 ml-Hauptkulturen in Replikaten auf eine OD von 0,1 angeimpft und in adäquater Weise (siehe II.5.1) inkubiert. Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (nach ca. 2 h, OD = 0,5) wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG die Expression der T7 RNA Polymerase induziert und die Kultivierung dem Versuch entsprechend fortgesetzt.

II.6.2 Kultivierung von *R. capsulatus* zur Untersuchung der Carotinoid-Physiologie

Für sämtliche Studien wurde zunächst eine anaerobe 5 ml-Vorkultur mit 5 – 20 Kolonien eines anaerob gewachsenen Einzelkolonie-Ausstrichs inokuliert und über drei Tage inkubiert. Hiervon wurden entweder wiederum anaerobe 10 ml-Hauptkulturen in Hungates oder aerobe 20 ml-Hauptkulturen in Replikaten auf eine OD von 0,05 beimpft und diese über zwei Tage inkubiert.

II.6.3 Kultivierung von *R. capsulatus* für *crt*-Expressionsstudien

Um einen TREX-manipulierten *R. capsulatus*-Stamm in *crt*-Expressionsstudien zu untersuchen, wurde zunächst eine anaerobe 5 ml-Vorkultur angezogen, wie in II.5.1 beschrieben. Hiervon wurden Hauptkulturen in Replikaten mit einer Start-OD von 0,05 angesetzt, entweder wiederum als anaerobe 10 ml-Hauptkulturen in Hungates oder als semiaerobe 30 ml-Hauptkulturen in Kolben. Die Kulturen wurden mit 8 mM Fruktose als Induktor der Expression der T7 RNA Polymerase supplementiert und über zwei Tage inkubiert.

II.6.4 Kultivierung von *E. coli* zur Charakterisierung der Expressionsprofile verschiedener T7-Stämme

Nach Transformation eines Fluoreszenzreporter-tragenden Plasmids wurde zunächst eine mit einer Einzelkolonie inokulierte 5 ml-Kultur über Nacht inkubiert. Hiervon wurden in *deep-well*-Platten (96 well Masterblock, steril, natur, von Greiner bio-one) Hauptkulturen mit einem Startvolumen von 950 µl in Replikaten mit einer Start-OD von 0,1 angesetzt. Nach ca. 2 h (OD = 0,5) wurde die Expression der T7 RNA Polymerase durch Zugabe von 50 µl 10 mM IPTG (Endkonzentration 0,5 mM IPTG) induziert, sodass sich 1 ml-Hauptkulturen ergaben. Die Inkubation wurde für 3,5 h fortgesetzt. Das Wachstum der Kulturen in den 96er *deep-well*-Platten wurde durch Trübungsmessung bei 580 nm im *microplate-reader Spectra Max 250* der Firma Molecular Devices verfolgt. Hierzu wurden 20 µl der Kultur 1:5 mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8) verdünnt, sodass sich in den verwendeten 96er *Flat Bottom Transparent Polystyrol* Mikrotiter-Platten (nunc) ein Messvolumen von 100 µl ergab. Da die Schichtdicke des Messkörpers schwierig zu bestimmen ist, wurde eine Eichung vorgenommen, um vergleichbare Aussagen über die Zelldichte wie mit dem Spektralphotometer *Genesys 6* (Thermo Scientific), an dem mit 1 cm Schichtdicke gemessen wurde, treffen zu können. Dazu wurden Trübungsmessungen von Suspensionen verschiedener Zelldichten an beiden Geräten durchgeführt und mit Hilfe einer daraus erstellten Eichreihe die im *deep-well*-Format produzierten Werte in solche des Photometers von Thermo Scientific mit Schichtdicke 1 cm übersetzt.

II.6.5 Kultivierung von *E. coli* für die Untersuchung von Licht-abhängiger Genexpression

Nach Transformation des Plasmids zur Licht-abhängigen Genexpression wurde zunächst eine mit einer Einzelkolonie inokulierte 5 ml-Kultur über Nacht inkubiert. Hiervon wurden 10 ml-Hauptkulturen in Replikaten auf eine Start-OD von 0,05 angeimpft. Die Kolben wurden zwischen Blaulicht-LED-Platinen platziert bzw. mit Aluminium-Folie dunkel gehalten und für 3 h inkubiert. Für den Sauerstoffeintrag wurden die Kulturen mit Magnetrührern bewegt.

II.7 Einbringen von DNA in Bakterien

II.7.1 Transformation

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

II.7.2 Konjugative Übertragung von Plasmid-DNA zu *P. putida*

Der *E. coli*-Donorstamm S17-1 wurde mit dem gewünschten Konstrukt transformiert und als Einzelkolonie-Ausstrich unter Selektionsdruck auf LB_{Agar} angezogen. *P. putida*-Zellen wurden ebenfalls als Einzelkoloniausstrich angezogen. Von diesen Platten wurden 5 ml-Kulturen (*E. coli* weiterhin unter Selektionsdruck) mit Einzelkolonien inokuliert und über Nacht inkubiert. Von diesen Kulturen wurden je 0,5 ml abgenommen und vereinigt. Die Zellen wurden pelletiert, in 1 ml frischem LB aufgenommen und wieder pelletiert, um sie in 200 µl zu resuspendieren und auf einen Filter (OE Membranfilter, 0,2 µm, Ø 22 mm, von Whatman) auf LB_{Agar} ohne Antibiotikum zu geben und über Nacht bei 30°C zu inkubieren. Die Zellen wurden anschließend durch Vortexen mit LB in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vom Filter gelöst. Nach Pelletieren und Resuspendieren der Zellen in 200 µl LB wurde die Mischung auf LB_{Agar} mit dem jeweils zum konjugierten Plasmid adäquaten Antibiotikum ausplattiert. Außerdem enthielten sämtliche LB-Selektionsplatten nach Konjugation Irgasan, um das Wachstum von *E. coli*-Donorzellen zu verhindern.

II.7.3 Konjugative Übertragung von Plasmid-DNA zu *R. capsulatus*

R. capsulatus-Zellen von einem auf PY_{Agar} anaerob inkubierten Ausstrich wurden unter aeroben Bedingungen in 5 ml RCV + N über Nacht resuspendiert. Der *E. coli*-Donorstamm S17-1 wurde mit dem gewünschten Konstrukt transformiert und als Einzelkolonie-Ausstrich unter Selektionsdruck auf LB_{Agar} angezogen. 2 ml der *R. capsulatus*-Zellsuspension wurden abgenommen, die Zellen pelletiert und in PY ohne Eisen resuspendiert. Mit einer Impföse wurden der Suspension 5 - 10 Kolonien des *E. coli*-Stammes zugegeben. Die Mischung wurde pelletiert, in 200 µl PY ohne Eisen resuspendiert und auf einem Filter (siehe II.7.2) auf PY_{Agar} ohne Antibiotikum über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend

durch Vortexen mit RCV in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vom Filter gelöst. Nach Pelletieren und Resuspendieren der Zellen in 200 µl RCV wurde die Mischung auf PY_{Agar} mit dem jeweils zum konjugierten Plasmid adäquaten Antibiotikum ausplattiert. Außerdem enthielten sämtliche PY-Selektionsplatten nach Konjugation Streptomycin, um das Wachstum von *E. coli*-Donorzellen zu verhindern.

II.7.3.1 Überprüfung der Sequenz von *crtZ* im Chromosom von *RcTREXcrtΔX*

Genomische DNA des zu untersuchenden Stammes wurde in drei unabhängigen PCR-Ansätzen als Template verwendet. Die eingesetzten Primer (Crt2-for und Crt2-rev, **Tab. II-3**) amplifizieren den Bereich *crt'IBZ*. Die Sequenz des Gens *crtZ* im generierten PCR-Produkt wurde durch Sequenzierung, ausgehend von den Primern crtZSeq-up und crtZSeq-dwn überprüft und in allen Fällen der unter III.3.4 beschriebene Basenaustausch gefunden.

II.7.4 Bestimmung der Effizienz von Konjugation und Transposition

Es wurde die Anzahl Kolonien nach effektiver Konjugation und Transposition pro eingesetzter Rezipientenzelle bestimmt: Nach Konjugation von Plasmiden mit Transpositionselementen wurden Verdünnungsreihen der Konjugationsansätze von *P. putida* bzw. *R. capsulatus* auf Selektions-Medium ausplattiert. Um die Anzahl eingesetzter Rezipientenzellen zu ermitteln wurde parallel mit dem jeweiligen Rezipientenstamm ohne Donor in gleicher Weise verfahren, wobei diese nicht unter Selektionsdruck gesetzt wurden. Der Quotient aus der Anzahl der Klone nach effektiver Konjugation und Transposition und der Anzahl eingesetzter Rezipientenzellen beschreibt die Effizienz des Verfahrens.

II.7.5 Erzeugung von *EcTREXcrtΔZ*

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) wurde mit dem Vektor ptsTREX-crtΔZ, der den temperatursensitiven ori101 trägt, transformiert. Nach dem Hitze-Schock und Aufnahme der Zellen in LB-Medium wurden die Zellen für eine Stunde bei 30°C in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß im Schüttelinkubator bei 120 UpM inkubiert. Nach Ausplattieren auf LB_{Agar} mit Gentamycin wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Da der Vektor bei dieser Temperatur nicht repliziert wird, konnte so direkt auf *crt*-Transpositions-Mutanten selektiert werden.

II.7.6 Nachweis der TREX-vermittelten Etablierung von *crt*-Genen in den Expressions-Wirten

Nach Selektion von Klonen, die Gentamycin-Resistenz, nicht aber Tetrazyklin-Resistenz aufwiesen, wurde genomische DNA von diesen mithilfe des *DNeasy Blood & Tissue* Kits der Firma *Qiagen* isoliert. Diese wurde als Template in einer Standard-PCR eingesetzt, die mit dem Gebrauch *crt*-spezifischer Primer (Crt1 und Crt2, **Tab. II-3**) die Etablierung der *crt*-Gene im untersuchten Stamm nachweist. Um die Spezifität

des Ergebnisses zu belegen, wurde die jeweilige wildtypische genomische DNA in einer Kontroll-Reaktion eingesetzt.

II.7.6.1 Bestimmung des Insertionsortes der *crt*-Gene im bakteriellen Chromosom

Es wurde genomische DNA des zu untersuchenden Stammes enzymatisch hydrolysiert (Enzym *MluI* oder *BglII*) und anschließend ligiert. Dabei bilden sich zirkuläre DNA-Elemente. Da das rekombinante Transposon eine *Site* für die Enzyme *BglII* und *MluI* und einen *E. coli*-Replikationsursprung sowie eine Ampicillin-Resistenz trägt, kann ein replikativer Vektor entstehen, der aus einem Teil des Transposons und einem Teil der genomischen DNA des chromosomalen Insertionsortes besteht. *E. coli* DH5 α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert und auf Ampicillin-haltigem Medium ausplattiert. Von diesen Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert und zur Kontrolle mit dem jeweilig verwendeten Enzym verdaut. Bei einer definierten Bande im Agarose-Gel wurde die Plasmid-DNA ausgehend von Primer Seq out OEL bzw. Seq out OER, die innerhalb des rekombinanten Transposons binden und auswärts orientiert sind, sequenziert. Bei hinreichender Sequenzierlänge kann der Insertionsort eindeutig bestimmt werden.

II.8 Manipulation von DNA

II.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse und Säulen-Reinigung mittels Kits der Firmen Analytik Jena (*innuPREP Plasmid Mini Kit*), PeqLab (*PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit*) oder Macherey & Nagel (*NucleoBond Xtra Midi*) nach Angaben der Hersteller. Die Konzentration von DNA-Präparationen wurde durch analytische Gelelektrophorese bestimmt.

II.8.2 Isolierung von genomischer DNA

Chromosomale DNA aus *E. coli*, *P. putida* oder *R. capsulatus* wurde mit Hilfe des *DNeasy Blood & Tissue* Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert.

II.8.3 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *Phusion*-Polymerase (Finnzymes) wurde zur PCR-Amplifikation (*polymerase chain reaction*) von DNA-Fragmenten im PCR-Automaten *ep gradient S* (Eppendorf) in Reaktionsansätzen und mit Temperaturprogrammen entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. PCR-Produkte wurden mithilfe des *innuPREP PCRpure Kit* der Firma Analytik Jena gereinigt.

II.8.4 Rekombination von DNA *in vitro*

Die enzymatische Restriktion von DNA, Modifikation von DNA-Enden und Ligation von DNA-Fragmenten wurde nach Standard-Verfahren (Sambrook *et al.*, 1989) sowie nach Angaben des jeweiligen Enzym-Herstellers durchgeführt.

II.8.5 Agarosegelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Agarosegelelektrophorese diente zur Größenbestimmung hydrolysierter DNA-Moleküle, zur Konzentrationsabschätzung von DNA-Lösungen sowie zur Isolierung von DNA-Fragmenten und wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Dabei wurden die folgenden Lösungen verwendet:

TBE-Puffer: 8,9 mM Tris-HCl, 8,9 mM Borat, 0,5 mM EDTA;

DNA-Probenpuffer (5x): 100 mM EDTA, 43 % Glycerol (v/v), 0,05 % Bromphenolblau (w/v)

Agarosegele wurden mit einem *Eagle Eye II*-System der Firma Stratagene dokumentiert. Dabei wird die DNA bei Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254\text{-}366\text{ nm}$) durch das in die DNA-Doppelhelix interkalierte und bei 590 nm emittierende Ethidiumbromid, sichtbar gemacht. Als DNA-Größen-Standard wurde der *GeneRuler 1kb DNA Ladder* (Fermentas) verwendet. Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde das *innuPREP Gel Extraction Kit* (Analytik Jena) verwendet.

II.9 Proteinbiochemische Methoden

II.9.1 SDS-PAGE (*Sodium-dodecyl-sulfate* - Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinproben (Ganzzellextrakte, entsprechend einer $OD_{580\text{ nm}} = 0,2$) erfolgte nach (Laemmli, 1970) unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem mit einem 5 % Sammel- und einem 12 % Trenngel. Dabei wurden die folgenden Lösungen verwendet:

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS (w/v)

Protein-Probenpuffer (5x): 50 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % Glycol (v/v), 4 % SDS (w/v),

2 % β -Mercaptoethanol (v/v), 0,03 % Bromphenolblau (w/v)

Als Protein-Größen-Standard wurde der *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas) genutzt.

II.9.2 Immunologischer Proteinnachweis (*Western Blot*)

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden Proteine auf eine Methanol-aktivierte PVDF-Membran (Biorad) übertragen. Der Transfer erfolgte in Dunn-Carbonat-Puffer (Dunn, 1986) (10 mM NaHCO_3 , 3 mM Na_2CO_3 , 20 % Methanol (v/v)). Auf der Membran wurden die Proteine T7 RNA Polymerase, YFP oder YF1 spezifisch durch einen immunologischen Nachweis entsprechend den Angaben der Antikörper-Hersteller detektiert. Dabei wurde TBST-Puffer (25 mM Tris/HCl (pH 6,8), 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,2 % Tween 20

(v/v)) für sämtliche Inkubations- und Wasch-Schritte verwendet. Verwendete Antikörper: Detektion der T7 RNA Polymerase: *T7 RNA Polymerase monoclonal antibody* (Fermentas), *Goat Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate* (Biorad); Detektion von YF1: *Kaninchen-Anti-YtvA* (Krauss & Eggert), *Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP Conjugate* (Biorad), Detektion von YFP: *Anti-His (C-term)-HRP Antibody* (Invitrogen).

II.10 Carotinoid-Analytik

II.10.1 Messung von Absorptionsspektren

Zellmassen entsprechend einer $OD_{580\text{ nm}} = 4$ (*P. putida* und *E. coli*) bzw. $OD_{660\text{ nm}} = 0,2$ (*R. capsulatus*) wurden durch Zentrifugation pelletiert. Nach Resuspension der Zellen in 50 μl H_2O wurden die Pigmente mit 1 ml Ethanol extrahiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgeschieden (1 Min, 18620 g) und am Spektralphotometer *Genesys 6* (Thermo Scientific) das Absorptionsspektrum des Überstands von 400 - 500 nm (*P. putida* und *E. coli*) bzw. von 300 - 900 nm (*R. capsulatus*) gemessen. Die gemessenen Absorptionsmaxima wurden mit publizierten Werten (**Tab. II-5**) verglichen.

Tab. II-5: Übersicht über die Absorptionsmaxima der analysierten Carotinoide in Ethanol
Absorptionsmaxima, die als Schulter auftreten sind durch Klammern gekennzeichnet.
Referenzen: Davies (1976) und Britton (2004).

Carotinoid	$\lambda_{\text{max 1}}$	$\lambda_{\text{max 2}}$	$\lambda_{\text{max 3}}$
Lykopen	446	472	503
β -Carotin	(425)	450	478
β -Cryptoxanthin	(428)	450	478
Zeaxanthin	(428)	450	478
Neurosporin	416	440	470
Spheroiden	429	454	486
Spheroidenon	-	-	488

II.10.2 Bestimmung von Carotinoid-Ausbeuten

Zellmassen entsprechend einer $OD_{580\text{ nm}} = 4$ (*P. putida* und *E. coli*) bzw. $OD_{660\text{ nm}} = 0,2$ (*R. capsulatus*) wurden durch Zentrifugation pelletiert. Nach Resuspension der Zellen in 50 μl H_2O wurden die Pigmente mit 1 ml Ethanol extrahiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgeschieden (1 Min, 18620 g) und die Carotinoid-spezifische Absorption des Überstands photometrisch bestimmt. Die Carotinoid-Menge im Extrakt wurde unter Verwendung bekannter molarer Extinktionskoeffizienten ϵ (siehe **Tab. II-6**) bestimmt:

$$\text{Abs}_{\lambda_{\text{max}}} / \epsilon [\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}] \times \text{MW} [\text{g mol}^{-1}] = \text{mg Carotinoid} / \text{ml Extrakt}$$

Tab. II-6: Übersicht über physikochemische Eigenschaften der zu quantifizierenden Carotinoide

Für die Quantifizierung der Carotinoide werden die Extinktionskoeffizienten ϵ bei bestimmten Wellenlängen λ_{\max} und das Molekulargewicht MW der Verbindungen benötigt.

Carotinoid	ϵ [L mol ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{\max}	MW [g mol ⁻¹]	Referenz
<i>Pigmente von Pantoea ananatis</i>				
Zeaxanthin	144500 (Ethanol)	450	569	Britton (1995a)
β -Carotin	140500 (Ethanol)	450	536	Britton (1995a)
<i>Pigmente von Rhodobacter capsulatus</i>				
Spheroiden	147700 (Petrolether)	454	569	Goodwin <i>et al.</i> (1956)
Spheroidenon	122200 (Petrolether)	480	582	Goodwin <i>et al.</i> (1956)
Neurosporin	156000 (Hexan)	440	538	Britton (1995a)

Da für die Pigmente von *R. capsulatus* die Extinktionskoeffizienten nicht im hier verwendeten Lösungsmittel Ethanol bestimmt wurden, sind die Ausbeuten für diese Carotinoide als Schätzwerte angegeben. Um die Mengen auf Zelltrockenmassen (DCW, *dry cell weight*) zu beziehen, wurde die OD-Zellmasse-Korrelation durch Auswiegen getrockneter Zellpellets von Zellsuspensionen mit bekannter OD bestimmt:

P. putida: 1 mgDCW \cong OD 2

E. coli: 1 mgDCW \cong OD 2

R. capsulatus: 1 mgDCW \cong OD 1,4

Also gilt für *P. putida*/*E. coli*: [mg Carotinoid / 1 ml Extrakt (OD 4)] / 2 x 1000 = mg Carotinoid / gDCW

R. capsulatus: [mg Carotinoid / 1 ml Extrakt (OD 0,2)] x 7 x 1000 = mg Carotinoid / gDCW

II.10.3 Flüssigchromatographie-Messungen (*high performance liquid chromatography*, HPLC)

Zellmassen entsprechend einer OD_{580 nm} = 15 (*E. coli* und *P. putida*) bzw. OD_{660 nm} = 15 (*R. capsulatus*) wurden durch Zentrifugation pelletiert. Carotinoide wurden mit 500 μ l Aceton bei 50°C 5 Min extrahiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgeschieden (1 Min, 18620 g) und der Überstand mit 500 μ l H₂O gemischt. Die Mischung wurde mit 2 ml Petrolether extrahiert. Nach Trocknung der farbigen Etherphase unter N₂-Begasung wurden die Pigmente für die HPLC-Analyse in 15 μ l Hexan und anschließend 200 μ l Acetonitril gelöst. Alle Extraktionsschritte wurden rasch bei minimaler Beleuchtung durchgeführt. Die HPLC-Methode wurde auf Basis der Arbeit von de Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya (2009) entwickelt. Die Analyse wurde mit dem Gerät LC-10Ai (Shimadzu) mit SPD-M10Avp *photodiode array detector* (PDA) und mit dem Programm *LabSolution/LCSolution* Version 1.22SP1 durchgeführt. Es wurde eine C30-*reverse-phase* HPLC-Säule (250 mm x 4,6 mm ID, S-5 μ m, YMC-Europa GmbH) mit einer Vorsäule des gleichen Materials (20 mm x 4,0 mm ID) verwendet. Probenvolumen von

20 µl wurden injiziert und bei einer Flussrate von 1 ml/Min bei 25°C analysiert. Die mobile Phase bestand aus Methanol, Acetonitril (mit 0,05 % Triethylamin) und Ethylacetat. Eine Gradient-Elution wurde angelegt von 15:70:15 (v/v/v) zu 20:60:20 (v/v/v) in 20 Min, zu 5:15:80 (v/v/v) in weiteren 20 Min mit abschließend konstanter Elution mit dieser Mischung für 10 Min. Die Säule wurde nach jedem Lauf für 10 Min mit 15:70:15 (v/v/v) reäquilibriert. Chromatogramme wurden bei 450 nm aufgenommen. Mit dem PDA wurden Spektren des Eluats von 350 – 550 nm gemessen. Carotinoide wurden durch den Vergleich ihrer Retentionszeiten und Absorptionsspektren mit denen kommerzieller Standards identifiziert (**Abb. II-1**). Lycopon, β-Carotin, β-Cryptoxanthin und Zeaxanthin wurden von DHI bezogen, Neurosporin von CaroteNature GmbH. Zur Zuordnung wurden Retentionszeiten mit Abweichungen bis 1 Min akzeptiert. Da β-Cryptoxanthin und Zeaxanthin durch Hydroxylierung aus β-Carotin hervorgehen, ohne dass das System konjugierter Doppelbindungen verändert wird, weisen sie nahezu die gleichen Spektren auf, können aber durch verschiedene Retentionszeiten eindeutig identifiziert werden (**Abb. II-1**). Die HPLC-Analysen wurden zur qualitativen und nicht zur quantitativen Bestimmung der Carotinoide genutzt; bei der unwillkürlichen Interpretation der relativen *peak*-Höhen im Chromatogramm ist zu bedenken, dass i) die Chromatogramme bei 450 nm aufgenommen wurden und hier Neurosporin und Lycopon nicht maximal absorbieren (**Abb. II-1**) und ii) die Carotinoide unterschiedliche Extinktionskoeffizienten aufweisen (siehe **Tab. II-6**).

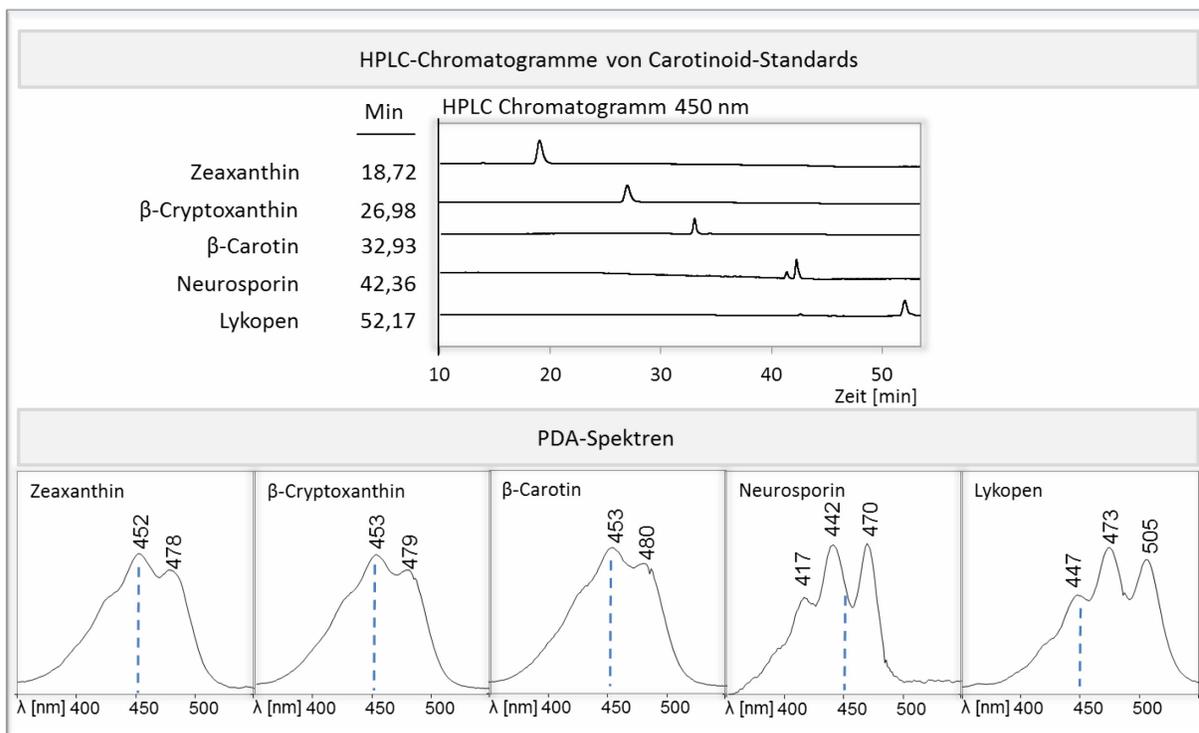


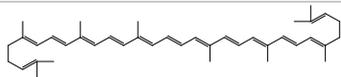
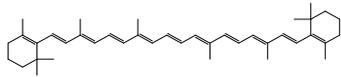
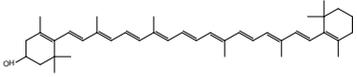
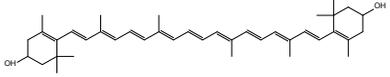
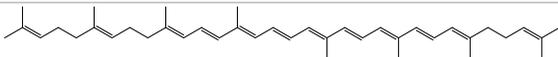
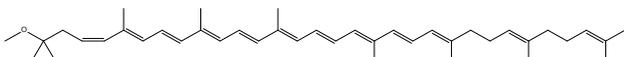
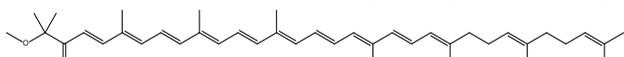
Abb. II-1: HPLC-Chromatogramme und PDA-Spektren der analysierten Carotinoid-Standards

Für die intrinsischen Carotinoide von *R. capsulatus* standen keine Standards für HPLC-Messungen zur Verfügung. Diese wurden kombinatorisch anhand der bekannten Carotinoid-Physiologie, des relativen Retentionsverhaltens in der HPLC und durch den Vergleich der Absorptionsspektren der Analyten mit publizierten Spektren identifiziert.

II.10.4 Dünnschichtchromatographie

Carotinoide wurden wie in II.10.1 beschrieben mit Ethanol extrahiert und auf Dünnschichtchromatographie-Platten (Polygram® SIL G/UV254; 0,2 mm Kieselgel, Macherey-Nagel) mit Laufmittel aus Hexan : Ethylacetat (3:1) analysiert. Die Extraktion und Dünnschichtchromatographie wurden bei minimaler Beleuchtung durchgeführt. Die erwarteten Bandenmuster können auf Basis der unterschiedlichen *polar surface area* (PSA) der Pigmente (**Tab. II-7**) abgeschätzt und relativ zueinander eingeordnet werden. Dabei ist für Lycopon, β -Carotin und Neurosporin bei der hier verwendeten Methode keine Auftrennung zu erwarten. Die eindeutige Identifizierung der Banden erfolgte durch Abgleich mit HPLC-Daten.

Tab. II-7: Übersicht über die PSA (*polar surface area*) der analysierten Pigmente

Carotinoid	Struktur	PSA [\AA^2]
<i>Pigmente von Pantoea ananatis</i>		
Lykopen		0
β -Carotin		0
β -Cryptoxanthin		20,23
Zeaxanthin		40,46
<i>Pigmente von Rhodobacter capsulatus</i>		
Neurosporin		0
Spheroiden		9,23
Spheroidenon		26,3
Bakteriochlorophyll a	$C_{55}H_{74}MgN_4O_6$	119,63

Quelle: www.chemspider.com, Daten wurden generiert mit ACD/PhysChem Suite.

II.11 Transkriptanalyse: RT-qPCR (*reverse transcription-quantitative PCR*)

Aus wachsenden Expressionskulturen wurden bei einer Zelldichte von $OD_{580\text{ nm}} = 3 - 4$ (*E. coli* und *P. putida*) bzw. $OD_{660\text{ nm}} = 1 - 1,5$ (*R. capsulatus*) Zellen aus 2 ml Kulturvolumen geerntet. Bei den langsam wachsenden Stämmen *PpTREXcrtΔX-c* + pML5-*P_{lac}*T7 und *RcTREXcrtΔX* + pML5-*P_{fru}*T7 wurden Proben bei geringeren Zelldichten genommen. Für die folgenden Arbeiten wurden ausschließlich gestopfte, RNase-freie Pipetten-Spitzen der Firma Eppendorf verwendet. Die Quantifizierung von RNA und DNA für RT-qPCR-Anwendungen wurde mithilfe des *Qubit® 2,0 Fluorometer* (life technologies) durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde mit dem *RNeasy Protect Bacteria Mini Kit* (Qiagen) aus biologischen Triplikaten extrahiert. DNA-Kontaminationen wurden mit DNase (Promega) beseitigt. Um spezifisch *sense* und *antisense* Transkript von jedem *crt*-Gen nachzuweisen, wurde zunächst die jeweilige einzelsträngige cDNA synthetisiert. Dazu wurden 900 ng (*P. putida*), 300 ng (*R. capsulatus*) bzw. 1000 ng (*E. coli*) Gesamt-RNA als Template in separaten Ansätzen mit 20 pmol eines Strang-spezifischen *crt*-Primers in 20 µl-Reaktionen mit dem *High Capacity cDNA RT Kit* (Applied Biosystems) eingesetzt. Die quantitative *real-time* PCR wurde in 20 µl-Ansätzen mit 2 µl cDNA-Template und 200 nM der entsprechenden Primer mit dem *7900 HT Thermal Cycler* (ABI-Applied Biosystems) unter Verwendung des Standard-Protokolls des Herstellers durchgeführt. Die Amplikongröße lag bei 75 bp (+/- 5 bp). Alle für die reverse Transkription und qPCR verwendeten Primer sind in **Tabelle II-3** aufgeführt. Die Daten wurden gemäß den MIQE-Richtlinien (Bustin *et al.*, 2009) evaluiert, sodass sowohl Versuchs-Präzision und -Spezifität als auch die individuelle PCR-Effizienz berücksichtigt wurden.

Dementsprechend wurde der lineare Messbereich der qPCR für alle untersuchten Gene durch Einsatz von Plasmid-DNA als Template in verschiedenen Konzentrationen bestimmt (Beispiel, siehe **Abb. II-2**: Gen *crtB*, Template pUC18crtΔZ). In allen Fällen wurden optimale Messbereiche des C_q Wertes (*quantification cycle*) zwischen Zyklus 7 und 26 festgestellt und ausschließlich Werte innerhalb dieser akzeptiert.

Die methodische Präzision der qPCR von $\leq 0,21$ Zyklen wurde durch Einsatz desselben Templates (pUC18crtΔX und pUC18crtΔZ) in technischen Replikaten ermittelt (siehe **Abb. II-2**).

Die Präzision von reverser Transkription und anschließender qPCR wurde mit derselben RNA-Probe aus *PpTREXcrtΔX-a* mit pML5-*P_{lac}*T7 für zwei Methoden untersucht: **1** Reverse Transkriptions-Ansätze einzeln in 96-Well-Platten und anschließende einzelne qPCRs. **2** Reverse Transkription mit allen *sense*- bzw. *antisense*-Primern zusammen in drei parallelen Sammel-Ansätzen und daraus jeweils zweifach qPCRs. Fehler bei **1**: < 0,15 Zyklen, Fehler bei **2**: bis > 1,5 Zyklen (siehe **Abb. II-2**). Also wurde die weniger aufwendige Methode **2** verworfen und ausschließlich nach Methode **1** verfahren.

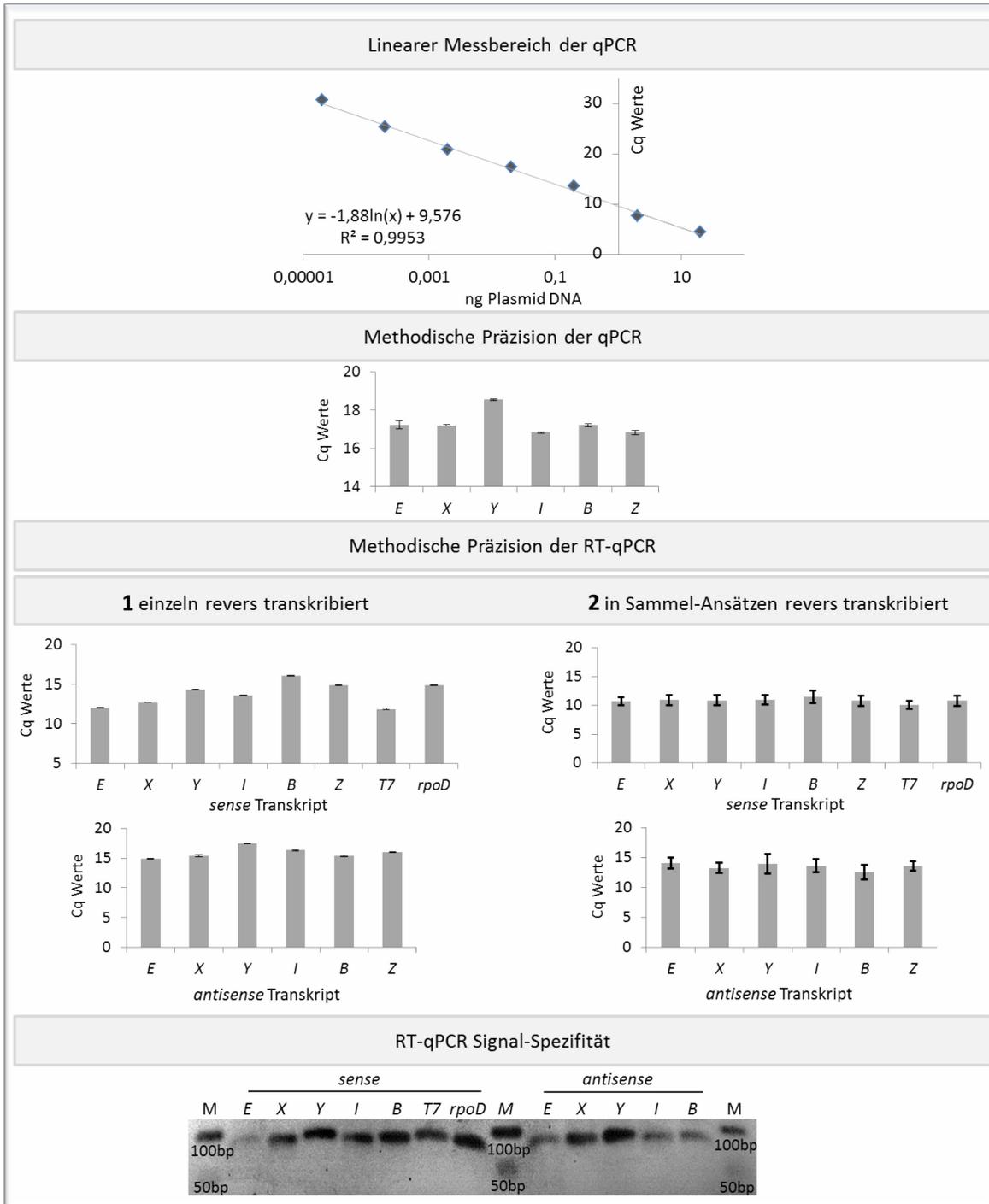


Abb. II-2: Übersicht über die Qualitätskontrolle der (RT-)qPCR-Messungen

Als Beispiel ist ein Ergebnis der Bestimmung des linearen Messbereichs der quantitativen PCR (qPCR) durch Verwendung eines DNA-Templates in verschiedenen Verdünnungen dargestellt. Weiterhin ist die Bestimmung der methodischen Präzision der qPCR durch Verwendung desselben DNA-Templates in Replikaten gezeigt. Außerdem ist die methodische Präzision der Kombination von reverser Transkription (RT) und qPCR bei zwei unterschiedlichen Arbeitsabläufen im Vergleich dargestellt. Schließlich ist ein Agarosegel der erzeugten PCR-Produkte, das zur Kontrolle der Signalspezifität der RT-qPCR angefertigt wurde, abgebildet. Nähere Details sind im Text beschrieben.

Um die Signalspezifität der qPCR zu gewährleisten, wurden für jedes Template Negativ-Kontrollen ohne reverse Transkriptase gemessen, um DNA-Kontaminationen auszuschließen. Die Primer-Spezifität wurde durch Kontrolle von qPCR-Sybr-Green-Schmelzkurven und Agarose-Gelen der PCR-Produkte (Beispiel, siehe **Abb. II-2**: qPCR-Produkte von *EcTREXcrtΔZ*) sichergestellt.

Außerdem wurde die reverse Transkription (abweichend von den Angaben des Herstellers) bei 50°C statt 37°C durchgeführt, um die spezifische Primer-Bindung zu verbessern. Die Funktionalität des Enzyms bei dieser Temperatur wurde sichergestellt durch Einsatz desselben RNA-Templates in parallelen RT-qPCR-Ansätzen mit reverser Transkription bei 37°C und bei 50°C. Die erhöhte Temperatur führte dabei nicht zu einem erniedrigten Signal.

Die absolute Transkript-Quantifizierung erfolgte unter Berücksichtigung der individuellen PCR-Effizienz, die gemäß MIQE durch Kalibrier-Reihen wie der lineare Messbereich bestimmt wurden. C_q Werte wurden mithilfe einer Plasmid-DNA-Eichreihe in Transkriptkopien umgerechnet. Dabei wurden die Größen der DNA-Moleküle berücksichtigt.

II.12 Messung der *in vivo*-Fluoreszenz von *E. coli*-Expressionskulturen

Die Bestimmung der *in vivo* Fluoreszenz des Reporterproteins YFP in *E. coli*-Expressionskulturen (Anzucht im *deep-well*-Format, siehe II.6.4) erfolgte in *96er Flat Bottom Transparent Polystyrol* Mikrotiterplatten (nunc) am *fluorescence microplate reader Infinite 200 Pro* (Tecan). Dazu wurden den Expressionskulturen 20 µl Proben entnommen und 1:5 in 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8) verdünnt, so dass sich ein Messvolumen von 100 µl ergab. Nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm wurde die Intensität der Fluoreszenz-Emission bei 527 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der mitgelieferten *software i-control*. Die Fluoreszenzwerte wurden auf eine Zellzahl entsprechend einer OD von 1 normalisiert.

II.13 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität in *E. coli*-Expressionskulturen

Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde in Abwandlung nach Miller (1972) durchgeführt. Zunächst wurde die OD der *E. coli*-Expressionskulturen (siehe II.6.5) bestimmt. Um die Aktivität der β -Galaktosidase zu bestimmen, wurden den Expressionskulturen 10 µl-Proben entnommen. Hierzu wurden 390 µl 1x Z-Puffer, 25 µl Chloroform und 25 µl 4x Z-Puffer gegeben und durch Vortexen gemischt. Die Mischung wurde 3 Min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 µl ONPG-Substrat-Lösung gestartet. Nach 2 Min wurde die β -Galaktosidase durch Zugabe von 400 µl Stopp-Lösung inaktiviert und dabei das Reaktions-Produkt *o*-Nitrophenol durch einen *pH-shift* vollständig in seine anionische, gelbe Form überführt. Durch Zentrifugation wurden die Zelltrümmer abgeschieden (1 Min, 18620 g) und die Absorption des Überstandes bei 420 nm photometrisch bestimmt. Als *blank* für

diese Messung wurde die folgende Mischung verwendet: 400 µl Substrat-Lösung, 450 µl 1x Z-Puffer, 400 µl Stopp-Lösung. Die verwendeten Lösungen wurden folgendermaßen angesetzt:

- 4x Z Puffer: 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl,
50 mM β-Mercaptoethanol (jeweils zur Anwendung frisch zugegeben).
- Substrat-Lösung: 0,8 mg/ml ONPG in 1x Z-Puffer (jeweils zur Anwendung frisch angesetzt)
- Stopp-Lösung: 1 M Na₂CO₃

Die angegebenen Miller-Units wurden folgendermaßen bestimmt:

$$(A_{420} / OD_{580}) \times (V_{\text{ges}} \times 1000 / V_{\text{Probe}} \times t) = \beta\text{-Galaktosidase-Aktivität [Miller-Units]}$$

A₄₂₀ = im Assay gemessene Absorption bei 420 nm

OD₅₈₀ = Zelldichte

V_{ges} = Gesamtvolumen (1,25 ml)

V_{Probe} = Probenvolumen (0,01 ml)

T = Zeit (2 Min)

II.14 Verwendete Datenbanken, software und online tools

Datenbanken: Zur Charakterisierung von Enzymen wurden die Datenbanken *BRENDA* (<http://www.brenda-enzymes.org/>), *EXPASY ENZYME* (<http://www.expasy.org/>) und *ExplorEnz* (<http://www.enzyme-database.org/index.php>) genutzt. Pseudomonas-spezifische Analysen von DNA-Sequenzen wurden mithilfe der *Pseudomonas Genome Database* (<http://www.pseudomonas.com>) (Winsor *et al.*, 2011) durchgeführt. Der Codon-Gebrauch der hier verwendeten Organismen wurde der *Codon Usage Database* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) entnommen.

Software: Zur Verwaltung von Plasmidkarten, Planung von Klonierungen und Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen wurde *Clone Manager 9* verwendet. Die Verwaltung und Analyse von HPLC- bzw. qPCR-Daten wurde mithilfe der vom jeweiligen Gerätehersteller mitgelieferten Programme *LABSolutions LCsolution Version 1.22 SP1* bzw. *SDS 2.3* und *RQ-Manager 1.2* durchgeführt. Chemische Strukturen wurden mit *ChemBioDraw Ultra 12.0* erstellt. Zur Textverarbeitung, Datenverwaltung und -analyse wurden außerdem die MS-office-Programme (2010) *Word*, *Excel* und *Powerpoint* verwendet.

Online tools: Zur Identifizierung von potentiellen Rho-unabhängigen Transkriptionsterminatoren in DNA-Sequenzen wurde *ARNold* (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/index.php>) genutzt. Für Vergleiche von DNA-Sequenzen wurde *NCBI BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet. Primer für die RT-qPCR wurden mithilfe von *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen & Skaletsky, 2000) erstellt. Der Codon-Gebrauch des *crt*-Genclusters aus *P. ananatis* wurde mithilfe von *Mobyle@Pasteur codonw 1.4.4* (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::codonw>) ermittelt.

III ERGEBNISSE

Eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen, die für biotechnologische oder medizinische Anwendungen bedeutsam sind, wird von Mikroorganismen produziert. Da nur ein Bruchteil dieser Organismen kultivierbar ist (Amann *et al.*, 1995; Handelsman, 2004) und die natürlichen Produzenten solcher Substanzen zudem häufig nur geringe Mengen synthetisieren, ist der direkte Zugang zu diesen relevanten Stoffen eingeschränkt. Daher werden natürliche Verbindungen häufig in heterologen Wirtsstämmen produziert. Allerdings ist die Effizienz dieses Ansatzes derzeit noch limitiert, da die heterologe Expression großer und komplexer Genregionen und das *Screening* verschiedener Wirtskandidaten bislang mit großem Aufwand verbunden sind (siehe I.4). Durch ein kombinatorisches Verfahren soll das *transfer and expression* (TREX)-System (I.5) diese Limitierungen aufheben beziehungsweise minimieren, und so den Zugang zu wertvollen mikrobiellen Naturstoffen verbessern.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die TREX-Anwendung eingehend charakterisiert. Dabei standen zwei Hauptfragen im Vordergrund: Es wurde (i) die Umsetzbarkeit der im TREX-System vorgesehenen simultanen, konvergenten Transkription eines Genclusters durch die T7 RNA Polymerase untersucht und (ii) die Anwendbarkeit des Systems in einem weiten Wirtsspektrum überprüft.

Dazu wurde das Carotinoidbiosynthese-Gencluster aus *Pantoea ananatis* (I.3.5) mittels TREX in *Pseudomonas putida*, *Rhodobacter capsulatus* und *Escherichia coli* zur Expression gebracht.

III.1 STRATEGIE ZUR UMSETZUNG TREX-VERMITTELTEN *crt*-GENEXPRESSION IN VERSCHIEDENEN BAKTERIELLEN WIRTEN

Das Carotinoidbiosynthese-Gencluster aus *P. ananatis* (I.3.5) soll im Rahmen dieser Arbeit mittels TREX (I.5) in den Wirten *P. putida*, *R. capsulatus* und *E. coli* zur Expression gebracht werden. Zunächst wird die Strategie zur Umsetzung solcher komparativer Expressionsstudien mittels TREX beschrieben.

Das TREX-System basiert auf zwei Genkassetten (**Abb. I-6**), die alle genetischen Elemente für die Umsetzung der folgenden TREX-Schritte enthalten: Sie sollen den Transfer des *crt*-Genclusters in einen Expressionswirt sowie die Insertion der Gene ins Wirtschromosom ermöglichen und die Expression aller Gene des Genclusters durch die T7 RNA Polymerase (T7RP) erlauben (ausführlich beschrieben in I.5).

Um diese Schritte einleiten zu können, werden neben den TREX-Kassetten weitere Komponenten benötigt. Zunächst muss die TREX-Markierung des Genclusters erfolgen. Das bedeutet, dass das Gencluster isoliert und zusammen mit den TREX-Kassetten in einen Vektor kloniert werden muss. Ist

diese Komponente vorhanden, können die genannten Schritte des TREX-Systems eingeleitet werden. Um im letzten Schritt die Expression aller Gene durch die T7RP zu erreichen, muss hier gegebenenfalls ein Vektor mit dem Gen der T7RP in den Expressionswirt eingebracht werden. Also muss ein solches, im jeweiligen Wirt induzierbares Konstrukt als weitere Komponente zur Verfügung stehen.

Abbildung III-1 zeigt eine schematische Übersicht der in dieser Arbeit angewendeten Strategie zur Expression des *crt*-Genclusters in den Wirten *P. putida*, *R. capsulatus* und *E. coli*.

Zunächst erfolgt die Markierung des isolierten, Plasmid-getragenen *crt*-Genclusters aus *P. ananatis*. Dazu wurde bei dieser Anwendung der Vektor pIC20H-RL verwendet, der das <L-TREX-R>-Modul trägt (I.5.1; **Abb. I-7**), das durch *Xba*I-Restriktion isoliert und in einem Schritt in den *crt*-tragenden Vektor inseriert werden kann. Dadurch entsteht ein Vektor, der sowohl die *crt*-Gene, als auch die TREX-Kassetten enthält (**Abb. III-1**, *crt*-TREX-Vektor) und zwei Schlüssel-Merkmale aufweist: Erstens wird durch Markierung des *crt*-Genclusters mit den TREX-Kassetten ein rekombinantes Transposon erzeugt, weil die TREX-Kassetten Elemente des Transposon Tn5 beinhalten (in **Abb. III-1** markiert durch OE = *outside end*). Dieses Transposon umfasst einen Teil der TREX-Kassetten und das *crt*-Gencluster (in **Abb. III-1**, blau hinterlegt). Zweitens werden dabei zwei T7-Promotoren, die in den TREX-Kassetten enthalten sind, in Orientierung zum *crt*-Gencluster in den Vektor eingebracht (**Abb. III-1**, P_{T7}).

Dieses Konstrukt kann nun in *E. coli* transformiert werden und von dort konjugativ zu *P. putida* oder *R. capsulatus* übertragen werden, wo das rekombinante *crt*-TREX-Transposon in das Chromosom des Wirtes inseriert (**Abb III-1**, mittig links). Der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) kann das Konstrukt direkt durch Transformation erhalten, so dass auch hier das Transposon ins bakterielle Genom inserieren kann (**Abb III-1**, mittig links). Um nach diesem Schritt auf solche Zellen selektieren zu können, die das *crt*-TREX-Transposon im Genom tragen, muss der *crt*-TREX-Vektor für den jeweiligen Wirt einen *suicide* Vektor darstellen.

Im letzten Schritt sollen die Gene ausgehend von den zwei T7-Promotoren exprimiert werden. Da die hier verwendeten Wirtsstämme von *P. putida* und *R. capsulatus* selbst nicht die T7RP zur Verfügung stellen, muss ein Vektor, der das Gen der T7RP unter einem induzierbaren Promotor trägt, in die Wirte eingebracht werden (**Abb III-1**, T7RP, Promotor P). Bei der Verwendung von *E. coli* BL21(DE3) als Expressionswirt ist ein solches Vorgehen nicht notwendig, da dieser Stamm die T7RP selbst zur Verfügung stellt (**Abb III-1**, mittig rechts). Somit soll sowohl in *P. putida* oder *R. capsulatus* als auch in *E. coli* die Transkription des kompletten Genclusters durch die T7RP in beiden Orientierungen ermöglicht werden (**Abb III-1**, rechts unten).

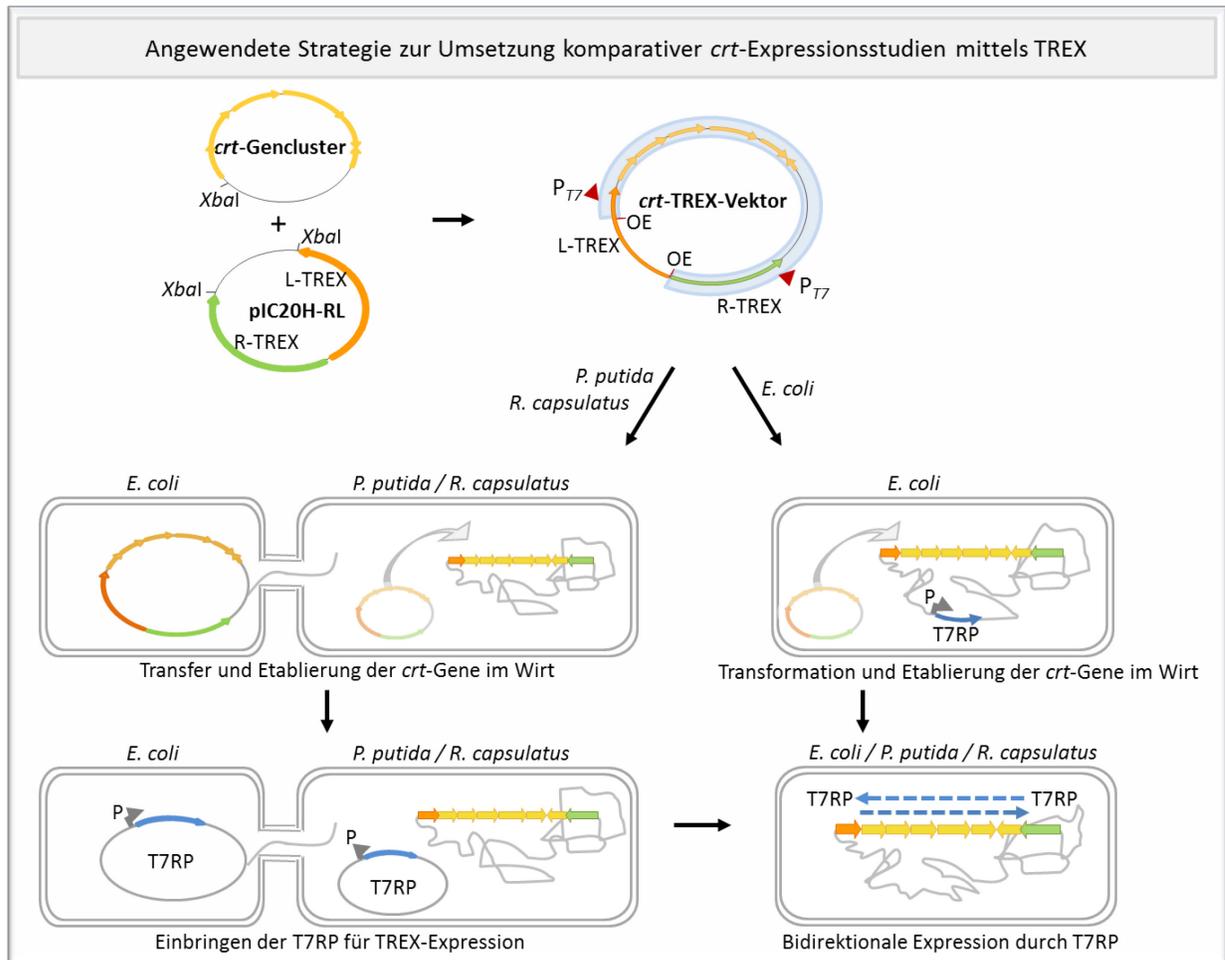


Abb. III-1: Schematische Übersicht über die Strategie zur Umsetzung komparativer *crt*-Expressionsstudien in *P. putida*, *R. capsulatus* und *E. coli* mittels TREX

Zunächst wird durch einen *Xba*I-Klonierungsschritt ein Vektor erzeugt, der das *crt*-Gencluster aus *P. ananatis* sowie die TREX-Kassetten trägt (*crt*-TREX-Vektor). Dieser kann durch Konjugation in *P. putida* oder *R. capsulatus* eingebracht oder in *E. coli* transformiert werden. In jedem Wirt soll das *crt*-TREX-Transposon daraufhin stabil ins Genom inseriert werden. In *P. putida* und *R. capsulatus* wird daraufhin die T7 RNA Polymerase (T7RP) durch einen Vektor zur Verfügung gestellt, während in *E. coli* bereits ein entsprechendes Gen im Genom integriert ist. Im letzten Schritt soll in jedem Wirt die vollständige, bidirektionale Expression des *crt*-Genclusters durch die T7RP erfolgen. L-/R-TREX = TREX-Kassetten, OE = *outside end* Sequenzen des Transposon, P_{T7} = T7-Promotor, P = im jeweiligen Wirt induzierbarer Promotor, T7RP = T7 RNA Polymerase(-Gen)

Weitere Details werden im Text beschrieben.

Im Folgenden werden jeweils die Umsetzung der beschriebenen Strategie zur TREX-vermittelten *crt*-Genexpression sowie die Ergebnisse der Expressionsstudien in den verschiedenen Wirten beschrieben.

III.2 TREX-VERMITTELTE CAROTINOID-PRODUKTION MIT *P. PUTIDA*

P. putida eignet sich aus verschiedenen Gründen als heterologer Wirt für die Produktion von Naturstoffen. Das Gram-negative, aerobe, saprophytische Bodenbakterium zeichnet sich durch schnelles Wachstum und unkomplizierte Kultivierung aus. Das Genom des hier verwendeten Stammes *P. putida* KT2440 wurde vollständig sequenziert (Nelson *et al.* 2002). Der Stamm hat den GRAS-Status (*generally recognized as safe*) (Wu *et al.*, 2011) und bietet einen vielseitigen Stoffwechsel, weshalb er als Produktionswirt für verschiedene Verbindungen inklusive Carotinoide eingesetzt wurde.

III.2.1 Markierung des Carotinoid-Genclusters für die TREX-Anwendung

Um die Umsetzbarkeit der im TREX-System vorgesehenen, simultan-konvergenten Transkription eines Genclusters durch die RNA Polymerase des Bakteriophagen T7 zu untersuchen, wurde das in I.3.5 beschriebene Carotinoidbiosynthese-Gencluster aus *P. ananatis* gewählt.

Das 6,9-kb umfassende Gencluster besteht aus sechs Genen (*crtEXYIBZ*), deren Genprodukte die Umsetzung der Terpenoid-Ausgangsverbindung Farnesyl-Pyrophosphat zu den Carotinoiden β -Carotin, Zeaxanthin und Zeaxanthin- β -D-diglykosid katalysieren. Die Gene sind in zwei entgegengesetzten Transkriptionseinheiten organisiert, nämlich *crtEXYIB* unter Kontrolle des Promotors P_{crtE} und *crtZ* unter Kontrolle von P_{crtZ} .

Es wurde der Biosyntheseweg bis Zeaxanthin für die Transplantation zu *P. putida* ausgewählt, sodass die durch *crtZ* kodierte β -Carotin-Hydroxylase den letzten Schritt der Biosynthese ausführt. Somit kann der Nachweis des Endprodukts Zeaxanthin die funktionelle bidirektionale Expression des Genclusters anzeigen. Dazu wurde das Gen *crtX* deletiert, dessen Genprodukt Zeaxanthin zweifach glykosylieren würde. Da das TREX-System als *plug&play*-Instrument für die Expression natürlicher, unbearbeiteter Gencluster entworfen wurde, wurde das *crt*-Cluster -abgesehen von der *crtX*-Deletion- unmanipuliert, inklusive aller natürlicher Regulationselemente wie der Promotoren, eingesetzt.

Das vollständige Gencluster wurde zunächst in zwei PCRs von genomischer DNA amplifiziert und in den Klonierungsvektor pUC18 eingefügt. Zur funktionellen Deletion von *crtX* wurde anschließend ein Teil des Gens entfernt, wodurch pUC18crt Δ X (Loeschcke, 2008) entstand. Die TREX-Kassetten wurden dem Vektor pC20H-RL entnommen und als <L-TREX-R>-Modul (siehe I.5.1, **Abb. I-7**) in einem Schritt in die *Xba*I-Site von pUC18crt Δ X eingebracht. Das entstandene Konstrukt, pTREX-crt Δ X (Loeschcke, 2008; **Abb. III-2**), trägt die *crt*-Gene für die Synthese von Zeaxanthin und die TREX-Kassetten, wobei die L-TREX-Kassette direkt am Carotinoid-Cluster liegt, während die R-TREX-Kassette durch den Vektor-*backbone* davon getrennt wird.

kleine Carotinoid-Gencluster die Transpositionseffizienz nicht beeinträchtigt. Das natürliche Tn5 hat eine Größe von 5,8 kb, während das hier verwendete rekombinante Transposon 13,5 kb umfasst.

Interessanterweise zeigten die *P. putida*-Varianten, die das TREX-crt Δ X-Konstrukt an unterschiedlichen Stellen im Genom trugen, bereits ohne die T7RP eine variable Pigmentierung, von weiß (4-5 %) bis gelb-orange. Die gelbe Färbung der Mehrzahl der Klone weist daher auf eine basale, von den *P. ananatis*-Promotoren und der Wirts-Polymerase abhängige Expression der *crt*-Gene hin. Dieser Befund geht einher mit Beobachtungen von Beuttler *et al.* (2011), die ebenfalls auch ohne induzierte Expression Pigmentproduktion in *P. putida* mit *crt*-Genen aus *P. ananatis* fanden.

Drei phänotypisch unterschiedliche Klone wurden ausgewählt: Ein intensiv-gelb gefärbter (*PpTREXcrt Δ X-a*), ein heller gelber, fluoreszierender (*PpTREXcrt Δ X-b*) sowie ein nahezu unpigmentierter Klon (*PpTREXcrt Δ X-c*) (**Abb. III-3 A**). Die Etablierung der *crt*-Gene in diesen Stämmen wurde durch PCR mit *crt*-spezifischen Primern und genomischer DNA als Template verifiziert (II.7.6) (**Abb. III-3 B**).



Abb. III-3: Die rekombinanten Stämme *PpTREXcrt Δ X* -a, -b, und -c

A Unterschiedliche Pigmentierung der mittels TREX manipulierten *P. putida*-Stämme *PpTREXcrt Δ X*-a, -b und -c nach Kultivierung auf LB-Agar-Platten im Vergleich mit dem Wildtyp (Wt). **B** Verifizierung der Etablierung der *crt*-Gene in diesen Stämmen durch PCR mit *crt*-spezifischen Primern und genomischer DNA als Template. M = Fermentas 1 kb ladder.

Da die *crt*-Gene unabhängig von phänotypischen Unterschieden in den Stämmen *PpTREXcrt Δ X*-a, *PpTREXcrt Δ X*-b und *PpTREXcrt Δ X*-c nachgewiesen werden konnten, wurden diese *P. putida*-Stämme zur näheren Charakterisierung in komparativen *crt*-Expressionsstudien verwendet.

III.2.3 Konstruktion eines T7 RNA Polymerase-kodierenden *broad host range* Vektors für eine TREX-vermittelte Genexpression

Die erzeugten *PpTREXcrt Δ X*-Stämme sollen in komparativen *crt*-Expressionsstudien eingesetzt werden. Im Genom der Stämme befinden sich die *crt*-Gene sowie zu beiden Seiten des Genclusters T7-Promotoren, die inwärts orientiert sind. So besteht die Möglichkeit, die *crt*-Gene bidirektional durch

die T7RP zu exprimieren. Um die T7RP dafür in *P. putida* zur Verfügung zu stellen, wurde ein *broad host range* Vektor konstruiert, der das Polymerase-Gen unter Kontrolle eines *lac*-Promotors trägt.

Vom Vektor pEB1 (Brunschwig & Darzins, 1992) wurde dazu ein 4456-bp-Fragment, das das T7RP-Gen unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und das *lac*-Repressor-Gen *lacI* enthält, durch *Bam*HI/*Sma*I-Restriktion isoliert und in den *Bam*HI/*Eco*47III hydrolysierten Vektor pASK-IBA3 kloniert. Anschließend wurde dasselbe Fragment mit *Bam*HI/*Hind*III reisoliert und in den *Bgl*III/*Hind*III hydrolysierten *broad host range* Vektor pML5 eingebracht. Dabei wurde ein etwa 7,8 kb großes DNA-Fragment, das das *lacZYA*-Operon enthält, aus dem Plasmid pML5 entfernt. Die Größe des erzeugten Konstrukts pML5-*P_{lac}T7* (**Abb. III-4 A**) beträgt etwa 17,7 kb. Die exakte Größe ist nicht bekannt, da keine vollständige Sequenz des Vektors pML5 existiert.

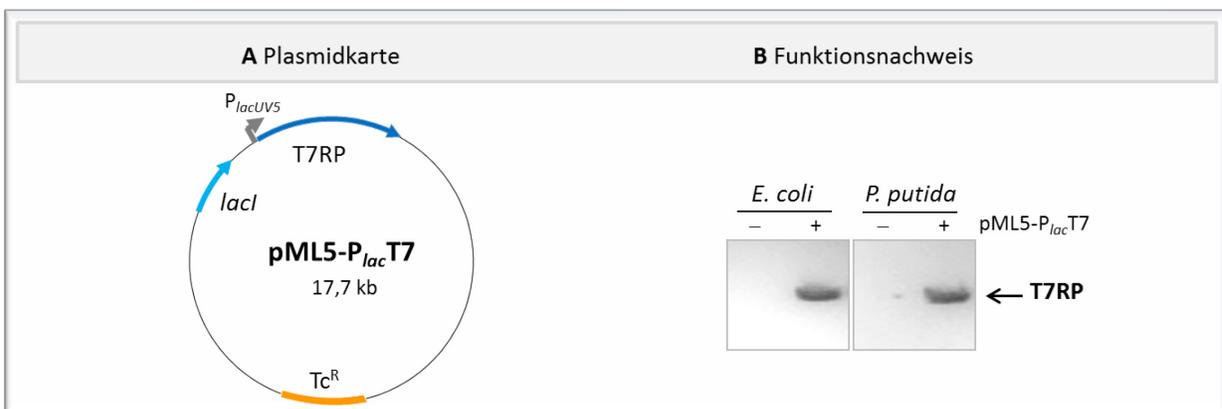


Abb. III-4: Low copy T7RP-Expressionsplasmid pML5-*P_{lac}T7* für *broad host range* TREX-Anwendungen

A Schematische Plasmidkarte. *lacI* = *lac*-Repressor-Gen, T7RP = T7 RNA Polymerase-Gen, *P_{lacUV5}* = *lacUV5*-Promotor, *Tc^R* = Tetracyclin-Resistenzgen. **B** Nachweis der T7 RNA Polymerase in *E. coli* DH5 α und *P. putida* KT2440 mit Vektor pML5-*P_{lac}T7* durch *Western Blot*-Analysen. Es wurden Zellkulturen in LB-Medium angezogen und die *lac*-abhängige Expression der T7RP durch Zugabe von 0,5 mM IPTG bei einer Zelldichte von $OD_{580\text{ nm}} = 0,5$ induziert. 3 h nach Induktion wurden den Zellkulturen Proben für den immunologischen Nachweis der T7RP entnommen.

Um die Funktionalität des *low copy* Konstrukts zu überprüfen, wurde der Vektor in *E. coli* DH5 α und *P. putida* KT2440 eingebracht und nach IPTG-induzierter Expression die T7RP immunologisch mittels *Western Blot* (II.9.2) nachgewiesen (**Abb. III-4 B**). In den Kulturen konnte die T7RP mit einem deutlichen Signal spezifisch nachgewiesen werden.

Somit kann der neue *broad host range* Vektor dazu verwendet werden, die T7RP in verschiedenen Gram-negativen Bakterien bereitzustellen, in denen die *lacUV5*-Promotor-abhängige Genexpression induziert werden kann. Dies ist eine Grundvoraussetzung für ein breites *Screening* in verschiedenen unmodifizierten Wirten mittels TREX. In dieser Arbeit wird der Vektor im Folgenden eingesetzt, um die T7RP in *P. putida* für die *crt*-Expression zur Verfügung zu stellen.

III.2.4 Charakterisierung verschiedener Produktions-Phänotypen nach randomisierter *crt*-Insertion in *P. putida*

Um die Carotinoid-Syntheseleistung der Stämme *PpTREXcrtΔX-a*, *PpTREXcrtΔX-b* und *PpTREXcrtΔX-c* zu testen, wurde zunächst die T7RP durch den Vektor pML5-*P_{lac}*T7 per Konjugation (II.7.2) eingeführt und anschließend die Carotinoid-Produktion und das Wachstum der Stämme in Expressionsstudien (II.6.1) vergleichend über den Verlauf der logarithmischen Wuchsphase charakterisiert (II.10.2). Durch Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde 2 h nach Inokulation die Expression der T7RP bei einer Zelldichte von etwa 0,5 (OD_{580 nm}) induziert. Als Kontrollen wurden die Stämme mit Leervektor pML5 verwendet. Die Ergebnisse sind in **Abbildung III-5** zusammengefasst.

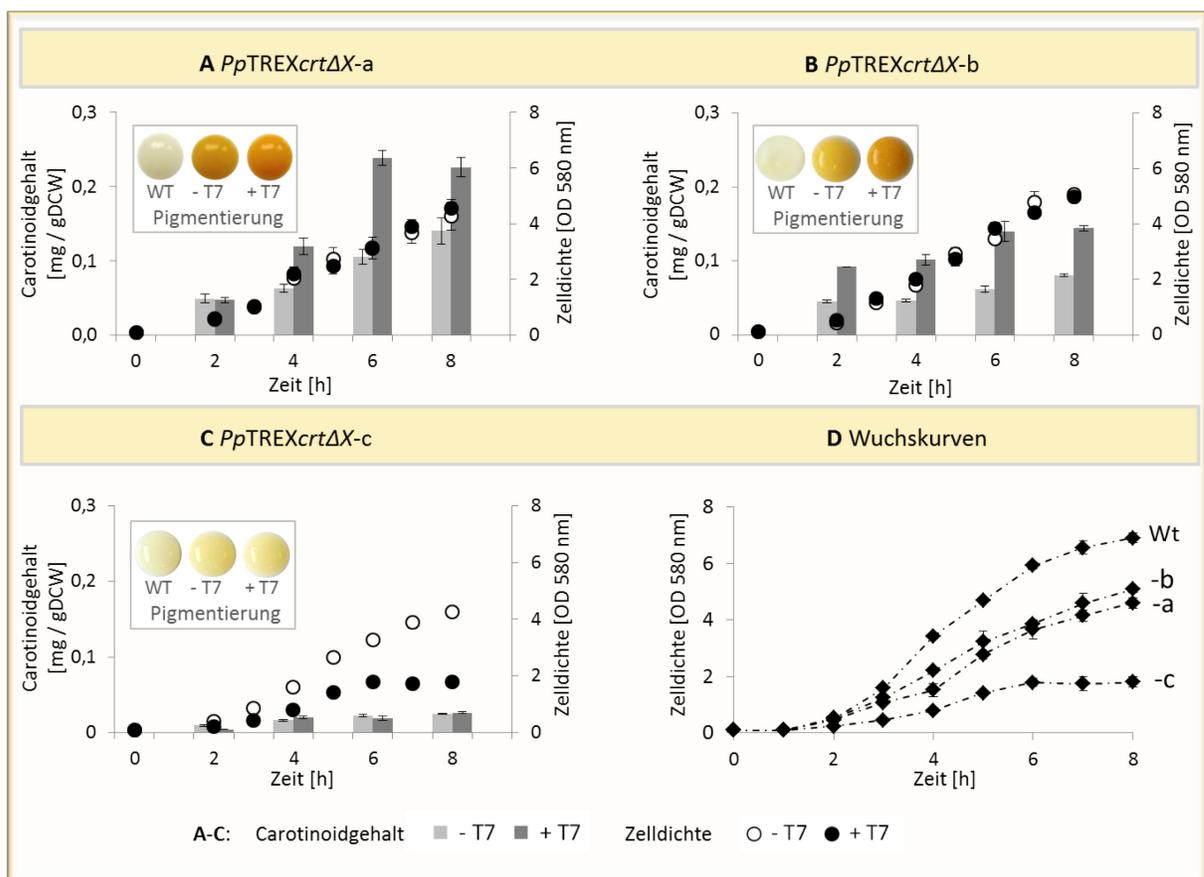


Abb. III-5: Wachstum und Carotinoid-Produktion der Stämme *PpTREXcrtΔX-a*, *-b*, und *-c*

A-C: Wuchskurven und Carotinoid-Gehalt der Stämme *PpTREXcrtΔX-a*, *-b* und *-c*, jeweils mit pML5-*P_{lac}*T7 und 0,5 mM Induktor IPTG (+ T7) und mit Leervektor pML5 (- T7). Die Carotinoid-Akkumulation wurde anhand der Absorption von Ethanol-Extrakten bei 450 nm bestimmt. Die Pigmentierung der Zellen nach acht Stunden ist jeweils im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. **D** Vergleich der Wuchskurven des *P. putida* Wildtyps (Wt) und *PpTREXcrtΔX-a*, *-b* und *-c* unter Carotinoid-produzierenden Bedingungen (+ T7). Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

Wie in **Abb. III-5** dargestellt, zeigen die drei ausgesuchten Stämme *PpTREXcrtΔX-a*, *-b* und *-c* verschiedene Profile bezüglich Pigmentierung, Carotinoid-Produktion und Wachstum:

Die Stämme *PpTREXcrtΔX-a* und *-b* zeigen starke gelb-orange Pigmentierung in Ab- und Anwesenheit der T7RP, während *PpTREXcrtΔX-c* nahezu unpigmentiert ist, ähnlich dem Wildtyp (**Abb. III-5 A-C**, Tropfen von Zellsuspensionen). Die photometrisch in Ethanol-Extrakten bestimmte Carotinoid-Konzentration (**Abb. III-5 A-C**, hell- und dunkelgraue Balken) aller drei Stämme ist unterschiedlich. *PpTREXcrtΔX-a* zeichnet sich durch die stärkste Carotinoid-Akkumulation bis > 0,2 mg/gDCW (*dry cell weight*) aus, wobei die T7RP eine signifikante Steigerung gegenüber der basalen Pigmentsynthese der Kontrolle erbringt. Auch in *PpTREXcrtΔX-b* ist diese T7RP-vermittelte Steigerung zu beobachten, wobei hier weniger Pigment, bis etwa 0,15 mg/gDCW, akkumuliert. Im Stamm *PpTREXcrtΔX-c* ist kaum Pigment zu detektieren und es wird keine Steigerung durch die T7RP erreicht. Daher wurde die Expression der Polymerase in diesem Stamm zusätzlich mittels *Western Blot* immunologisch untersucht (II.9.2) und konnte erfolgreich nachgewiesen werden (**Abb. III-6**).

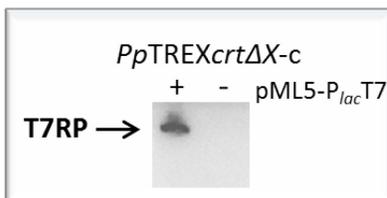


Abb. III-6: Nachweis der T7 RNA Polymerase in *PpTREXcrtΔX-c*

Die Polymerase wurde in *PpTREXcrtΔX-c* mit Vektor pML5-*P_{lac}T7* durch *Western Blot* nachgewiesen. Zellkulturen wurden in LB-Medium angezogen und die *lac*-abhängige Expression der T7RP durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert.

Die Stämme *PpTREXcrtΔX-a* und *PpTREXcrtΔX-b* zeigen das gleiche Wachstumsverhalten mit und ohne T7RP, während *PpTREXcrtΔX-c* deutlich verlangsamt wächst, insbesondere unter T7RP-Expressionsbedingungen (**Abb. III-5 A-C**, schwarze und weiße Datenpunkte). Im Vergleich mit dem Wildtyp ist die Wachstumsrate aller Carotinoid-produzierender Stämme beeinträchtigt, aber nur im Fall von *PpTREXcrtΔX-c* in drastischer Weise (**Abb. III-5 D**).

Die unterschiedlichen Profile der drei untersuchten *P. putida*-TREX-Stämme bezüglich Pigmentierung, Carotinoid-Produktion und Wachstum haben vermutlich mehrere Ursachen. Sie können beispielsweise auf die individuellen Mutationen, die sich durch die Transpositionsinsertion der *crt*-Gene im jeweiligen bakteriellen Genom ergeben, zurückgehen. Dabei sind wiederum mehrere Effekte möglich. Es könnte etwa der Isoprenoid-Haushalt beeinflusst werden, sodass mehr oder weniger Vorstufen für die Carotinoid-Synthese zur Verfügung stehen. Es könnte weiterhin die Toleranz gegenüber den fremden Carotinoid-Verbindungen verändert werden. Beuttler *et al.* (2011) identifizierten mehrere Gene in *P. putida*, die eine solche Rolle spielen. Um etwaige relevante Deletionen zu identifizieren, wurde der *crt*-Insertionsort der drei Stämme durch Plasmid-*Rescue* und Sequenzierung bestimmt (II.7.6.1). Mithilfe der *Pseudomonas Genome Database* (Winsor *et al.*, 2011) konnten die entsprechenden *P. putida*-Gene, in die das *crt*-TREX-Konstrukt jeweils inseriert wurde, ermittelt werden. Die festgestellten Insertionsorte

(Tab. III-1) stehen allerdings nicht in erkennbarem Zusammenhang mit den beobachteten Phänotypen. Auch konnte die Ursache für die Fluoreszenz von *PpTREXcrtΔX-b* (Abb. III-3 A) auf diese Weise nicht eindeutig geklärt werden.

Tab. III-1: *crt*-Insertionsorte und resultierende Deletionen in *PpTREXcrtΔX-a*, *-b* und *-c*

Mithilfe der *Pseudomonas Genome Database* ermittelte Gene und dort angegebene Proteinfunktionen werden aufgeführt. Ähnliche Proteine wurden durch BLINK-Suche in anderen *Pseudomonas*-Stämmen gefunden. Die %-Angabe bezieht sich auf Aminosäure-Identitäten.

Stamm	Insertionsort	Protein	Ähnliche Proteine
<i>PpTREXcrtΔX-a</i>	PP_5236	Protein mit Sel1-Domäne, mit <i>Repeats</i>	Protein mit Sel1-Domäne aus <i>P. putida</i> ND6 (95 %)
<i>PpTREXcrtΔX-b</i>	PP_3797	hypothetisches Protein	Peptidase aus <i>P. putida</i> ND6 (96 %); Eisen-reguliertes Membranprotein aus <i>P. fluorescens</i> F113 (68 %)
<i>PpTREXcrtΔX-c</i>	PP_3618 ^ PP_3619	beide hypothetisch	unbekannte Proteine aus <i>P. putida</i> F1 (97 %) und <i>P. putida</i> BIRD-1 (99 %)

Allerdings könnte die Verwandtschaft des in PP_3797 kodierten Proteins mit dem Eisen-regulierten Membranprotein aus *P. fluorescens* einen Hinweis auf die Funktion des in *PpTREXcrtΔX-b* getroffenen Gens geben, denn die grünliche Fluoreszenz des Stoffes, den *PpTREXcrtΔX-b* abgibt, legt nahe, dass es sich um eine Pyoverdin-Überproduktion handeln könnte. Pyoverdin ist ein Siderophor, das Eisen komplexieren und so dessen Transport in die Zelle ermöglichen kann (Cornelis, 2010). Möglicherweise ist hier das Gen eines regulatorischen Elements des Eisen-Haushaltes deletiert worden, was eine Art Eisen-Mangel-Antwort und die Abgabe großer Mengen Pyoverdin zur Folge hat. Nach den Beobachtungen von Beuttler *et al.* (2011) ist außerdem die Etablierung von Mutationen als Toxizitätsresponse von *P. putida* auf die Carotinoid-Verbindungen denkbar. Möglicherweise spielt dieser Effekt hier ebenfalls eine Rolle. Ähnlich wie von Beuttler *et al.* (2011) beschrieben, konnte eine gewisse Größenvarianz der Klone der TREX-manipulierten *P. putida*-Stämme mit dem Vektor pML5-*P_{lac}*T7 beobachtet werden.

III.2.5 Bestimmung der Carotinoid-Produktionskapazität von TREX-manipulierten *P. putida*-Stämmen

Um eventuell die beobachtete Carotinoid-Akkumulation von rund 0,15 – 0,25 mg/gDCW in den untersuchten Stämmen *PpTREXcrtΔX-a*, *PpTREXcrtΔX-b* und *PpTREXcrtΔX-c* mit Vektor pML5_{*lac*}-T7 zu erhöhen, wurde die Expressionsdauer verlängert. Es wurde der Pigmentgehalt der Zellen in der spät-logarithmischen Wachstumsphase (8 h Inkubation) im Vergleich mit dem der stationären Phase (25 h Inkubation) untersucht (Abb. III-7). Bei Beuttler *et al.* (2011) wurde bei Plasmid-basierter Expression von *P. ananatis-crt*-Genen in *P. putida* eine Zunahme der Carotinoid-Akkumulation bis 48 h beobachtet. Im

Gegensatz dazu konnten die beobachteten Ausbeuten hier durch längere Kultivierung in die stationäre Wachstumsphase nicht erhöht werden, sondern blieben in derselben Größenordnung, wobei Stamm *PpTREXcrtΔX-a* eine Abnahme der Carotinoid-Menge zeigte. Der Stamm *PpTREXcrtΔX-c* zeigte auch nach verlängerter Expressionsdauer nahezu keine Carotinoid-Akkumulation.

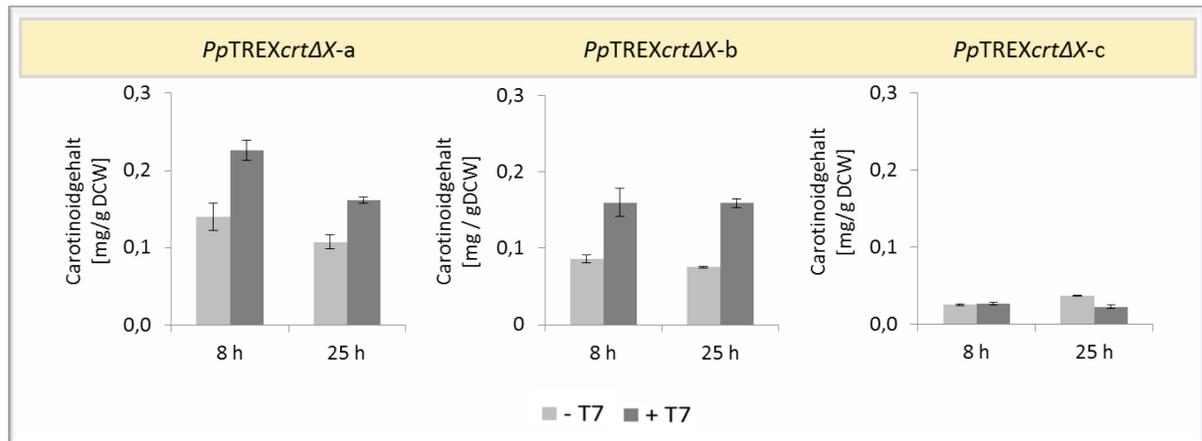


Abb. III-7: Carotinoid-Akkumulation der Stämme *PpTREXcrtΔX-a*, -b und -c bei verlängerter Expressionsdauer

Die Carotinoid-Akkumulation der Stämme *PpTREXcrtΔX-a*, -b und -c wurde nach 8 und 25 Stunden photometrisch in Zellextrakten bestimmt. + T7 = mit $pML5-P_{lac}T7$ und 0,5 mM Induktor IPTG. - T7 = Kontrolle mit Leervektor $pML5$. Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

Um die Carotinoid-Produktionskapazität von TREX-manipulierten *P. putida*-Stämmen umfassender beurteilen zu können, wurden nach TREX-vermittelter, randomisierter *crt*-Integration weitere sieben Klone von *PpTREXcrtΔX* nach starker Pigmentierung ausgewählt. In die mit d, e, f, g, h, i und j gekennzeichneten Stämme wurde der Vektor $pML5P_{lac}T7$ eingebracht und in Expressionsstudien nach 8 Stunden die Carotinoid-Akkumulation bestimmt (**Abb. III-7**).

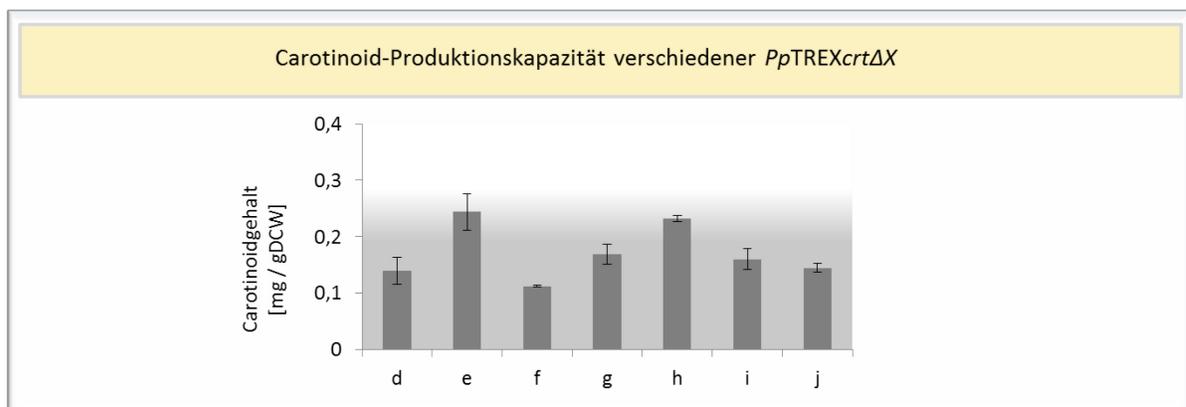


Abb. III-8: Carotinoid-Produktion der Stämme *PpTREXcrtΔX-d* bis -j

Die Carotinoid-Akkumulation der Stämme *PpTREXcrtΔX-d* bis -j mit $pML5-P_{lac}T7$ und 0,5 mM Induktor IPTG wurde nach 8 Stunden photometrisch in Zellextrakten bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

In den *PpTREXcrtΔX*-Stämmen d bis j mit Vektor pML5-*P_{lac}*T7 wurden durch T7RP-vermittelte *crt*-Expression Carotinoid-Ausbeuten im bereits beschriebenen Bereich von rund 0,15 mg – 0,25 mg/gDCW erzielt (**Abb. III-8**, bis zur Maximal-Grenze grau hinterlegt). In diesem Bereich scheint das maximale Produktionsvermögen von *P. putida* unter den hier angelegten Bedingungen zu liegen. Die Varianz der Ergebnisse kann auf die individuellen Insertionsorte des *crt*-TREX-Transposons zurückgeführt werden.

Um zu überprüfen, ob die Ausbeute an Carotinoiden durch ein niedriges Expressionslevel der T7RP vom *low copy* Vektor pML5-*P_{lac}*T7 limitiert ist und somit mit einer erhöhten Expression der T7RP gesteigert werden kann, wurde ein *broad host range mid copy* Vektor, der das T7RP-Gen unter Kontrolle eines *lac*-Promotors trägt, kloniert und zur TREX-vermittelten Carotinoid-Produktion mit *P. putida* verwendet (**Abb. III-9 A**).

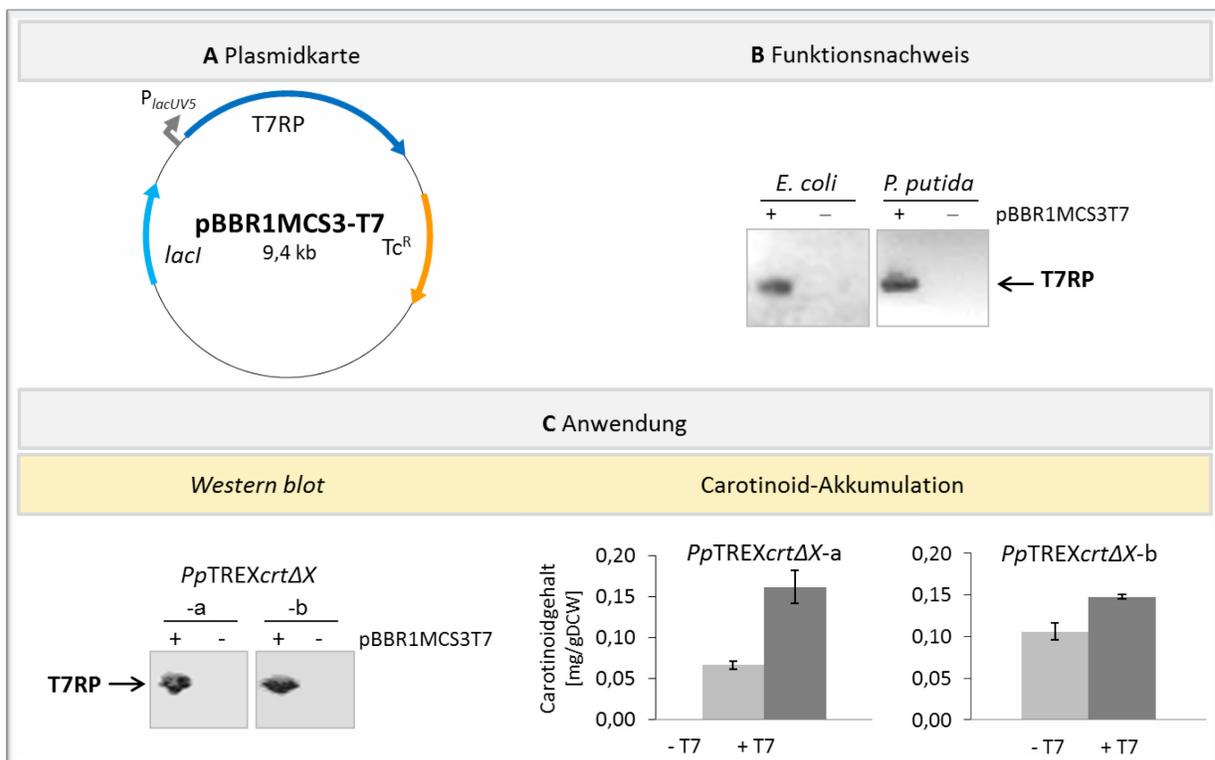


Abb. III-9: Konstruktion und Charakterisierung des *mid copy* T7RP-Expressionsplasmids pBBR1MCS3-T7 für die TREX-vermittelte Carotinoid-Produktion

A Schematische Plasmidkarte. *lacI* = *lac*-Repressor-Gen, T7RP = T7 RNA Polymerase-Gen, *P_{lacUV5}* = *lacUV5*-Promotor, *Tc^R* = Tetrazyklin-Resistenzgen. **B** Nachweis der T7 RNA Polymerase in *E. coli* DH5α und *P. putida* KT2440 mit Vektor pBBR1MCS3-T7 durch *Western Blot*. Es wurden Zellkulturen in LB-Medium angezogen und die *lac*-abhängige Expression der T7RP durch Zugabe von 0,5 mM IPTG bei einer Zelldichte von 0,5 ($OD_{580\text{ nm}}$) induziert. 3 h nach Induktion wurden den Zellkulturen Proben für den immunologischen Nachweis der T7RP entnommen. **C** Verwendung des Vektors für die TREX-vermittelte Carotinoid-Produktion mit den Stämmen *PpTREXcrtΔX*-a und -b. In Expressionskulturen dieser Stämme wurde die T7RP durch *Western blot* nachgewiesen sowie die Carotinoid-Akkumulation nach 8 Stunden photometrisch in Zellextrakten bestimmt. + T7 = mit pBBR1MCS3-T7 und 0,5 mM IPTG. - T7 = Kontrolle mit Leervektor pBBR1MCS3. Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

Dazu wurde vom Vektor pEB1 ein 4478-bp-Fragment, das das T7RP-Gen unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und das *lac*-Repressor-Gen *lacI* enthält, durch *PstI/SmaI*-Restriktion isoliert und in den *PstI/SspI* hydrolysierten Vektor pBBR1MCS3 kloniert. Dabei wurde der T7-Promotor vom Plasmid pBBR1MCS3 deletiert. Die Größe des erzeugten Konstrukts pBBR1MCS3-T7 beträgt 9,4 kb. Um zunächst die Funktionalität des *mid copy* Konstrukts zu überprüfen, wurde der Vektor in *E. coli* DH5 α und *P. putida* KT2440 eingebracht und nach IPTG-induzierter Expression die T7RP immunologisch mittels *Western Blot* (II.9.2) nachgewiesen (**Abb. III-9 B**). In den Kulturen konnte die T7RP mit einem deutlichen Signal spezifisch nachgewiesen werden. Somit kann der neue *broad host range mid copy* Vektor dazu verwendet werden, die T7RP in größeren Mengen für Expressionsstudien in heterologen Wirten zur Verfügung zu stellen, als der bisher verwendete *low copy* Vektor.

Der Expressionsvektor pBBR1MCS3-T7 wurde schließlich durch Konjugation (II.7.2) in *PpTREXcrt Δ X-a* und *PpTREXcrt Δ X-b* eingebracht und in Expressionsstudien die Akkumulation der T7RP sowie die Carotinoid-Akkumulation nach acht Stunden bestimmt (**Abb. III-9 C**). Beide Stämme akkumulierten maximale Pigmentkonzentrationen von etwa 0,15 mg/gDCW.

Die erhöhte T7RP-Expression in den Zellen durch einen Vektor mit höherer Kopienzahl hat folglich keinen verstärkenden Einfluss auf die Carotinoid-Ausbeuten mit *P. putida*. Unter den hier angelegten Bedingungen scheint *P. putida* eine metabolisch bedingte Produktionskapazität bis etwa 0,25 mg/gDCW aufzuweisen. Um den Zell-Metabolismus nicht unnötig mit der Replikation des *mid copy* pBBR1MCS3-Konstruktes zu belasten, wurde für die folgenden Experimente ausschließlich der Vektor pML5-*P_{lac}T7* verwendet.

III.2.6 Untersuchung der bidirektionalen *crt*-Transkription in *PpTREXcrt Δ X*-Stämmen

Um detaillierte Einblicke in die TREX-vermittelten Vorgänge in den Stämmen *PpTREXcrt Δ X-a*, *PpTREXcrt Δ X-b* und *PpTREXcrt Δ X-c* mit Vektor pML5-*P_{lac}T7* zu erhalten, wurde zunächst die simultane, konvergente Transkription der *crt*-Gene durch die T7RP vergleichend untersucht. Dazu wurden Expressionskulturen in der exponentiellen Wachstumsphase Proben entnommen und mittels *2-step* RT-qPCR die mRNA Level der einzelnen *crt*-Gene inklusive dem verkürzten Gen *crtX* in *sense* und *antisense* jeweils in biologischen Triplikaten bestimmt (II.11). **Abbildung III-10** zeigt die in den verschiedenen Stämmen gemessene Anzahl der *crt*-Transkriptkopien, die durch Transkription in beiden Richtungen generiert wurden.

In allen Fällen führt in Abwesenheit der T7RP eine basale Expression zu Transkript-Akkumulation sämtlicher *crt*-Gene (**Abb. III-10**, hellgraue Balken). Dieser Befund geht einher mit der in III.2.2 beschriebenen Pigmentierung der *P. putida*-Stämme, die unmittelbar nach TREX-vermittelter *crt*-

Insertion ins bakterielle Chromosom zu beobachten ist. Diese basale Expression ist einerseits auf die Erkennung der *P. ananatis*-Promotoren in *P. putida* zurückzuführen, kann aber auch von *read-through* von nahe am Insertionsort im Genom lokalisierten *P. putida*-Promotoren herrühren. Die Anwesenheit der T7RP erbringt im Mittel vierfach erhöhte Transkriptlevel sämtlicher *crt*-Gene in allen Stämmen und in beiden Transkriptionsrichtungen (**Abb. III-10**, dunkelgraue Balken). Eine Ausnahme stellt *crtZ* dar, indem lediglich in *PpTREXcrtΔX-b* eine T7RP-abhängige Erhöhung des Transkriptlevels zu beobachten ist. Interessanterweise bleibt das differentielle Muster, das sich in allen Stämmen in ähnlicher Weise über das Cluster in beiden Transkriptionsrichtungen ausbildet, ohne und mit T7RP nahezu erhalten. Von Stamm zu Stamm unterscheiden sich dabei die absoluten Mengen der *crt*-Transkripte. In *PpTREXcrtΔX-b* sind die Mengen rund doppelt so hoch, wie in den Stämmen *PpTREXcrtΔX-a* und *PpTREXcrtΔX-c*.

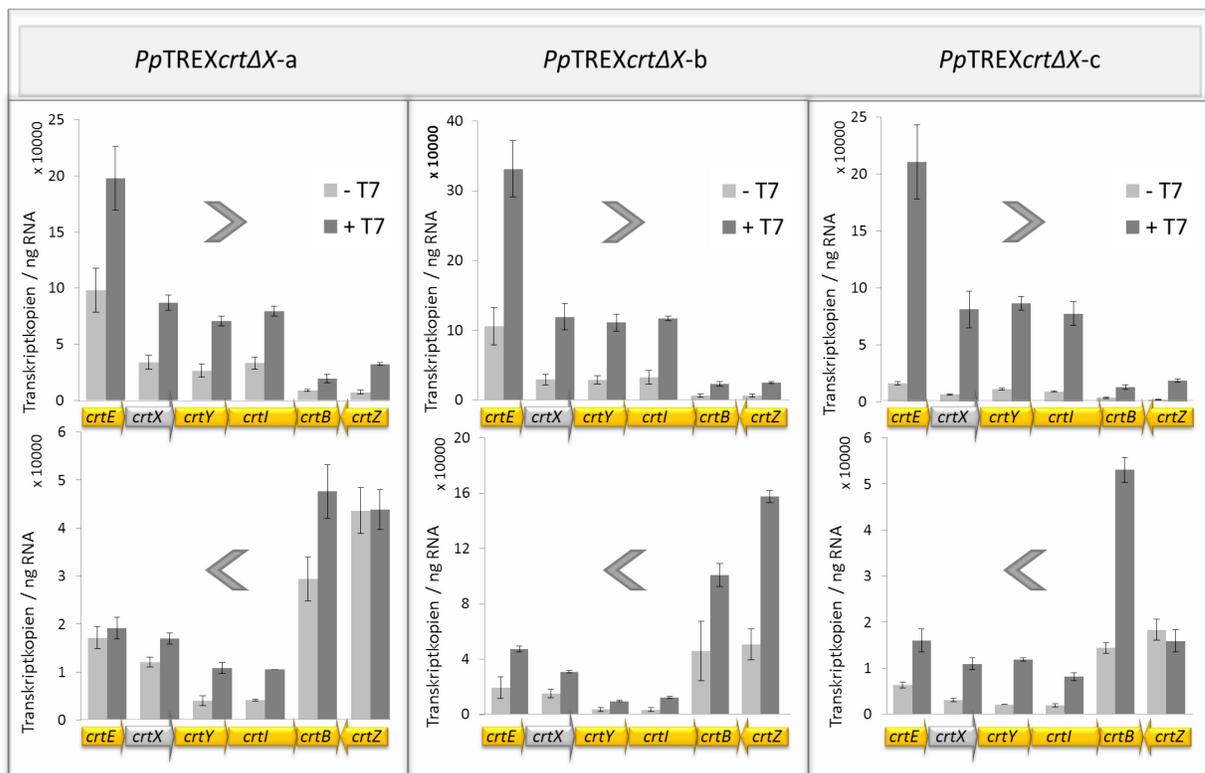


Abb. III-10: Quantitative Analyse der *crt*-Transkripte in *PpTREXcrtΔX-a*, *-b* and *-c*

Die Anzahl der *sense* und *antisense* *crt*-Transkriptkopien wurde in den Stämmen *PpTREXcrtΔX-a*, *-b* und *-c* in Abwesenheit (- T7) und Anwesenheit (+ T7) der T7 RNA Polymerase mit pML5 bzw. pML5-*P_{lac}*T7 und 0,5 mM IPTG mittels RT-qPCR bestimmt. Die Pfeile bezeichnen die untersuchte Transkriptionsrichtung entlang des *crt*-Clusters. Das partiell deletierte Gen *crtX* ist grau markiert. Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

Um den Einsatz gleicher Mengen Gesamt-RNA für die Bestimmung der *crt*-Transkriptkopien zu verifizieren, wurde zusätzlich jeweils die Kopienzahl des Gens *rpoD*, das für einen σ -Faktor (σ^{70}) kodiert (Fujita *et al.*, 1995) und konstitutiv exprimiert wird, in den Expressionskulturen aller Stämme bestimmt

(Abb. III-11). Es wurde keine signifikante Abweichung der Häufigkeit des *rpoD*-Transkripts festgestellt. Demnach scheint die *crt*-Transkriptionseffizienz vom individuellen Insertionsort des Genclusters im bakteriellen Chromosom beeinflusst zu sein. Der im Stamm *PpTREXcrtΔX-b* durch das *crt*-TREX-Transposon getroffene Insertionsort scheint eine besonders günstige Umgebung für die Transkription der *crt*-Gene zu bieten. Interessanterweise spiegelt sich die gegenüber *PpTREXcrtΔX-a* gesteigerte *crt*-Transkriptmenge nicht auf der Carotinoid-Produktebene wieder. Im Gegenteil weist der Stamm *PpTREXcrtΔX-a* eine stärkere Carotinoid-Akkumulation auf (Abb. III-5, -7).

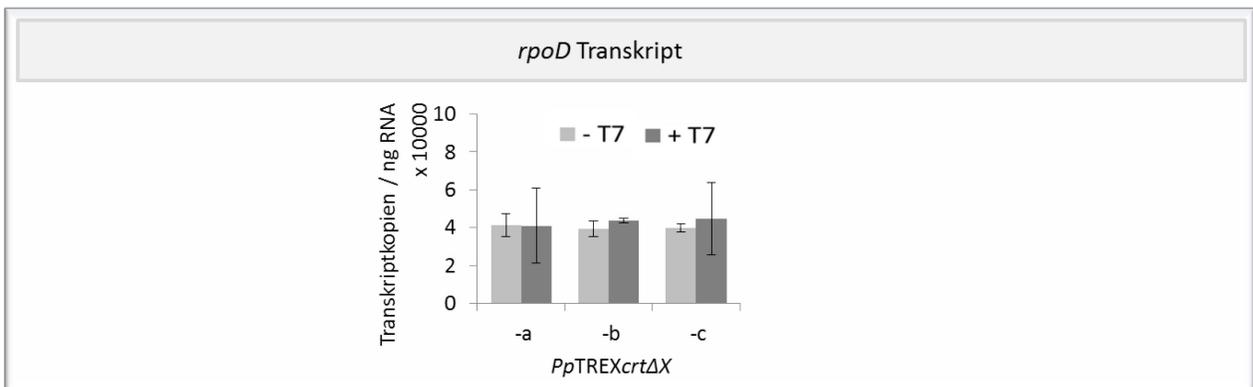


Abb. III-11: *rpoD*-Transkriptanalyse in *PpTREXcrtΔX-a*, *-b* und *-c*

Die Anzahl der *rpoD*-Transkriptkopien in *sense* wurde in den Expressionskulturen der Stämme *PpTREXcrtΔX-a*, *-b* und *-c* in Abwesenheit (- T7) und Anwesenheit (+ T7) der T7 RNA Polymerase mit pML5 bzw. pML5- P_{lac} T7 und 0,5 mM IPTG mittels RT-qPCR bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse der Transkriptanalyse, dass die im TREX-System vorgesehene, simultan-konvergente Transkription eines Genclusters durch die T7 RNA Polymerase funktioniert.

III.2.7 Analyse der Carotinoide in *PpTREXcrtΔX*-Stämmen

Um den Erfolg der Etablierung des Carotinoid-Biosyntheseweges aus *P. ananatis* in den Stämmen *PpTREXcrtΔX-a*, *PpTREXcrtΔX-b* und *PpTREXcrtΔX-c* mit Vektor pML5- P_{lac} T7 zu beurteilen und den Einfluss der individuellen *crt*-Insertionsorte auf die Carotinoid-Synthese zu untersuchen, wurden die akkumulierten Pigmente im Detail untersucht. Dazu wurden Expressionskulturen nach 25 Stunden Proben zur photospektrometrischen Untersuchung (II.10.1) und zur qualitativen HPLC-Analyse entnommen (II.10.3). **Abbildung III-12** zeigt die Absorptionsspektren von Ganzzell-Extrakten sowie die bei der HPLC-Analyse aufgenommenen Chromatogramme zusammen mit relevanten, am *photodiode array* (PDA)-Detektor aufgenommenen Spektren.

Die Absorptionsspektren (**Abb. III-12 A**) von Extrakten aus *PpTREXcrtΔX-a* und *PpTREXcrtΔX-b* deuten ein Carotinoid-typisches Absorptionsspektrum mit den drei charakteristischen Maxima an, lassen aber keine Identifizierung zu. Extrakte aus *PpTREXcrtΔX-c* zeigen erwartungsgemäß keine Carotinoid-Absorption.

Durch die angewendete HPLC-Analyse können mittels Vergleich der gemessenen Retentionszeiten und Absorptionsspektren mit kommerziellen Standards grundsätzlich alle farbigen Carotinoide des Carotinoide-Biosynthesewegs aus *P. ananatis* nachgewiesen werden: Lycopon, β -Carotin, β -Cryptoxanthin sowie Zeaxanthin (II.10.3).

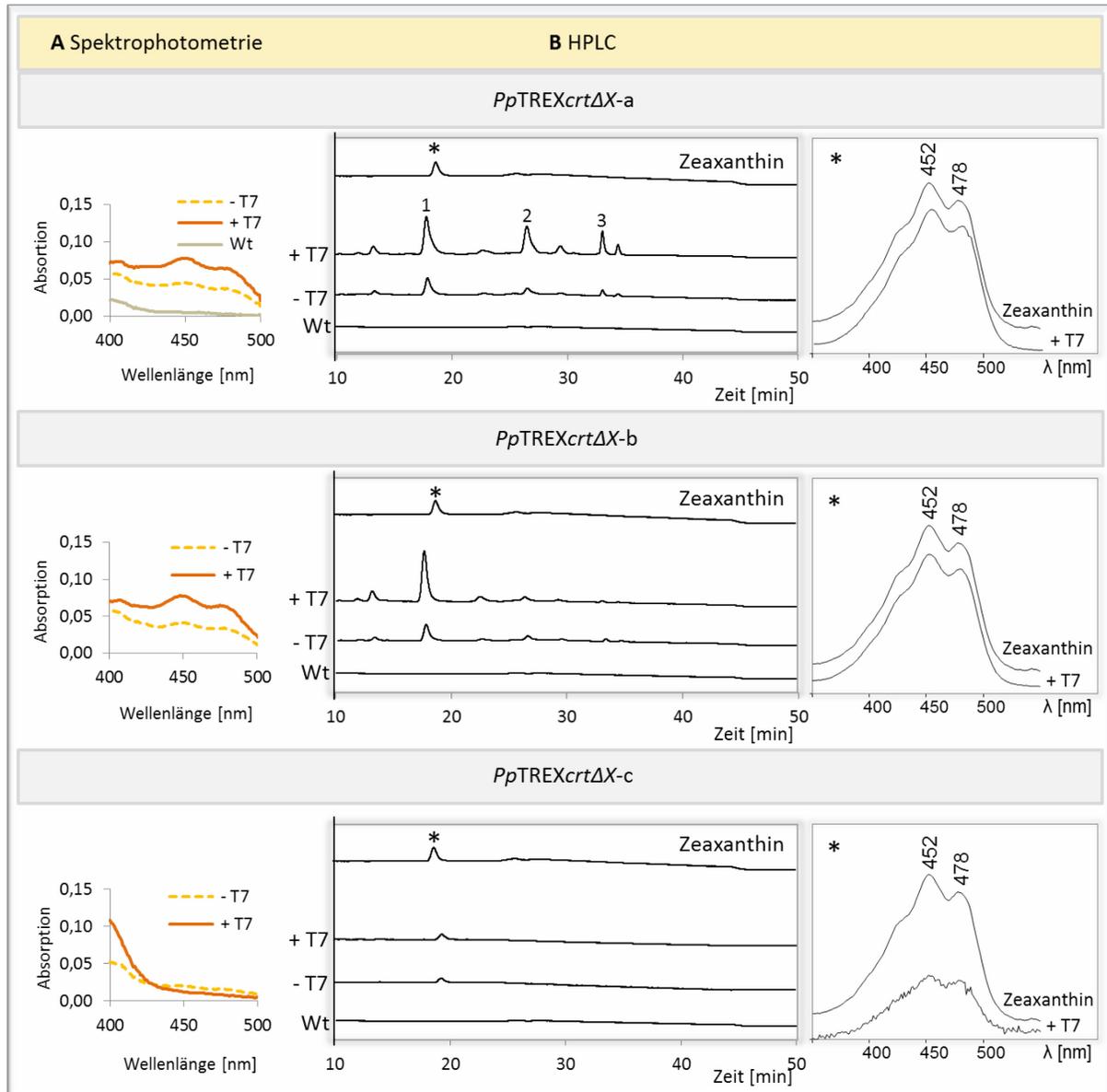


Abb. III-12: Analyse der Carotinoide in *PpTREXcrtΔX-a*, *-b* und *-c*

A Absorptionsspektren von Ethanol-Extrakten aus einer Zellmasse entsprechend $OD_{580\text{ nm}} = 4$. **B** Analyse von Zell-Extrakten mittels HPLC mit angeschlossenen *photodiode array* (PDA)-Detektor. Chromatogramme wurden bei 450 nm aufgenommen. Es wurden die Carotinoide Zeaxanthin (1), β -Cryptoxanthin (2) und β -Carotin (3) identifiziert. Das Chromatogramm sowie das Absorptionsspektrum eines Zeaxanthin-Standards sind in jedem Diagramm gezeigt. Wt = Wildtyp *P. putida* KT2440. Stern * verweist auf das zum jeweiligen *peak* im Chromatogramm aufgenommene Absorptionsspektrum.

+ T7 = mit pML5-*P_{lac}*T7 und 0,5 mM Induktor IPTG. - T7 = Kontrolle mit Leervektor pML5. Sämtliche Messungen wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt und zeigten in allen Fällen die dargestellten und beschriebenen Charakteristika. Jeweils ein repräsentatives Spektrum sowie Chromatogramm ist dargestellt.

Bei der angewendeten Chromatographie-Methode interagieren die Carotinoide unterschiedlich stark mit dem hydrophoben Säulenmaterial und werden mit zunehmend unpolarem Lösungsmittel eluiert. Somit eluieren polarere Verbindungen früher und unpolarere zu späteren Zeiten.

Durch dieses analytische Verfahren konnte gezeigt werden, dass im Stamm *PpTREXcrtΔX-a* das Endprodukt des Biosynthesewegs Zeaxanthin sowie die Intermediate β -Cryptoxanthin und β -Carotin akkumulieren (**Abb. III-12 B, 1, 2 und 3**). Da diese drei Carotinoide nahezu das gleiche Absorptionsspektrum aufweisen, kann diese Mischung nicht in einem Absorptionsspektrum aus einem Ganzzell-Extrakt nachgewiesen werden. Die im PDA gemessenen Absorptionsmaxima von Zeaxanthin liegen bei 452 und 478 nm. Im Gegensatz dazu wurde im Stamm *PpTREXcrtΔX-b* ausschließlich Zeaxanthin nachgewiesen. In beiden Fällen bleibt diese Verteilung ohne und mit T7RP ähnlich erhalten. Die in *PpTREXcrtΔX-c* detektierten, minimalen Pigmentmengen können vermutlich Zeaxanthin zugeordnet werden.

PpTREXcrtΔX-a stellt somit den stärksten Produzenten bezüglich der Carotinoid-Gesamtmenge dar (siehe III.2.4), zeigt aber auch die größte Produkt-Heterogenität. In *PpTREXcrtΔX-b* wurde eine vergleichsweise niedrigere Gesamtmenge (siehe III.2.4) und dabei ein vollständiger Fluss der Metaboliten zum Endprodukt Zeaxanthin hin festgestellt. Über den Fluss der Metabolite in *PpTREXcrtΔX-c* kann keine Aussage gemacht werden, weil die in diesem Stamm gebildeten Carotinoid-Mengen an der Nachweisgrenze liegen. Lykopen wurde in keinem Stamm detektiert.

Die Ergebnisse der Carotinoid-Analyse der drei Stämme *PpTREXcrtΔX-a*, *PpTREXcrtΔX-b* und *PpTREXcrtΔX-c* belegen wiederum die Relevanz des individuellen Insertionsortes des TREX-Transposons für die Carotinoid-Produktion mit *P. putida*. Der Nachweis des Endproduktes der Carotinoid-Biosynthese, Zeaxanthin, belegt die funktionelle, bidirektionale Expression aller *crt*-Gene.

III.2.8 TREX-vermittelte β -Carotin-Produktion mit *P. putida*

Neben Zeaxanthin stellt β -Carotin ein besonders interessantes Carotinoid im Biosyntheseweg von *P. ananatis* dar. Um zu überprüfen, ob auch β -Carotin als Endprodukt des Carotinoid-Biosyntheseweges in *P. putida* produziert werden kann, wurde eine weitere Variante des *crt*-Genclusters mit deletiertem *crtZ* erstellt und in einem analogen Vektor zu pTREX-crtΔX (siehe III.2.1) mit den TREX-Kassetten kombiniert. Dazu wurde das verkürzte, aus nur einem Operon bestehende Gencluster *crtEXYIB* (Δ *crtZ*) in zwei PCRs von genomischer DNA von *P. ananatis* amplifiziert und in den Vektor pUC18 eingefügt, sodass der Vektor pUC18crtΔZ (Loeschcke, 2008) entstand. Die TREX-Kassetten wurden als <L-TREX-R>-Modul in einem Schritt in die *XbaI*-Site dieses Vektors eingebracht. Das entstandene Konstrukt, pTREX-crtΔZ (Loeschcke, 2008), trägt die *crt*-Gene für die Synthese von β -Carotin und die TREX-Kassetten, wobei in

gleicher Weise wie bei pTREX-crtΔX (**Abb. III-2**) die L-TREX-Kassette direkt am Carotinoid-Cluster liegt, während die R-TREX-Kassette durch den Vektor-*backbone* davon getrennt wird.

Um den β-Carotin-Syntheseweg in *P. putida* zu etablieren, wurde der Vektor pTREX-crtΔZ mittels Konjugation (II.7.2) in den Wirt eingebracht und durch Verwendung von Gentamycin-haltigem Medium auf Klone mit chromosomal integrierten *crt*-TREX-Konstrukten selektiert. Ähnlich wie in II.2.2 beschrieben zeigte die Mehrzahl der Klone eine deutliche gelb-orange Pigmentierung, während einzelne Klone weißlich blieben. Ein stark pigmentierter Klon wurde ausgewählt. In diesen Stamm wurde die T7RP durch den Vektor pML5-*P_{lac}T7* per Konjugation (II.7.2) eingeführt. Schließlich wurde in Expressionsstudien (II.6.1) die Carotinoid-Produktion nach 25 Stunden quantitativ photometrisch (II.10.2) und qualitativ mittels HPLC (II.10.3) untersucht (**Abb. III-13**).

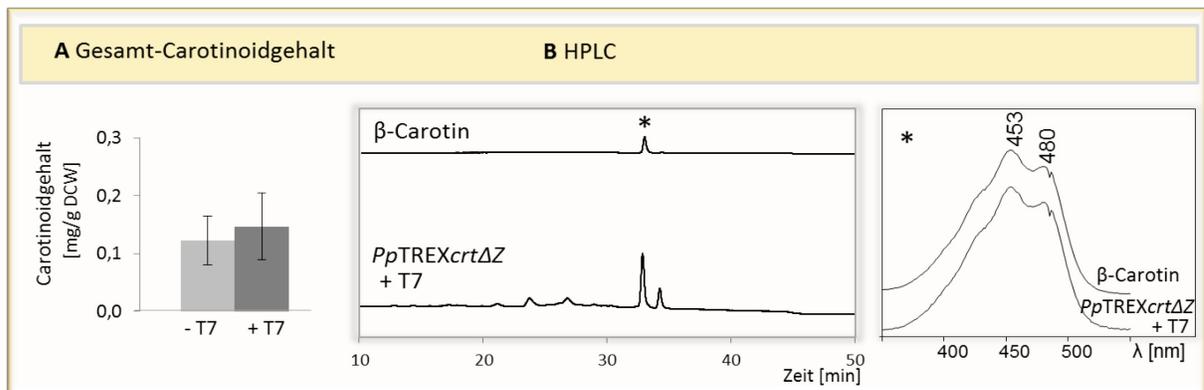


Abb. III-13: Analyse der Carotinoide in *PpTREXcrtΔZ*

A Die Carotinoid-Akkumulation in *PpTREXcrtΔZ* wurde photometrisch in Zellextrakten bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken. **B** Zell-Extrakte wurden mittels HPLC mit angeschlossenen PDA-Detektor analysiert. Chromatogramme wurden bei 450 nm aufgenommen. Es wurde β-Carotin nachgewiesen. Das Chromatogramm sowie das Absorptionsspektrum eines β-Carotin-Standards sind gezeigt. Stern * verweist auf das zum HPLC-peak im Chromatogramm aufgenommene Absorptionsspektrum. Ein repräsentatives Ergebnis einer Messung eines biologischen Triplikates ist dargestellt.

+ T7 = mit pML5-*P_{lac}T7* und 0,5 mM Induktor IPTG. - T7 = Kontrolle mit Leervektor pML5.

In diesem Fall ist die Steigerung der Carotinoid-Menge durch die T7RP nicht signifikant (**Abb. III-13 A**). Offenbar ist hier die Produktionskapazität bereits durch die basale Expression der *crt*-Gene erschöpft. Die spezifische Produktion von β-Carotin wurde mittels HPLC im Stamm *PpTREXcrtΔZ* mit Vektor pML5-*P_{lac}T7* verifiziert. Die im PDA gemessenen Absorptionsmaxima von β-Carotin liegen bei 453 und 478 nm. (**Abb. III-13 B**). Das im Biosyntheseweg vorangehende Lykopen wurde nicht detektiert.

Die Ergebnisse belegen die erfolgreiche Synthese von β-Carotin im Stamm *PpTREXcrtΔZ*. Die akkumulierte Menge von rund 0,15 mg/gDCW im Stamm *PpTREXcrtΔZ* liegt im vorher für den Zeaxanthin-Biosyntheseweg beschriebenen Bereich der maximalen *P. putida*-spezifischen Carotinoid-Produktionskapazität.

Zusammenfassend konnten bei der Verwendung von *P. putida* für die TREX-vermittelte Produktion von Carotinoiden die folgenden Feststellungen gemacht werden:

1. Die bidirektionale Expressionsweise des TREX-Systems führt zur Bildung substantieller *crt*-Transkriptmengen mit *sense* und *antisense* Orientierung.
 2. Die randomisierte TREX-Insertion erzeugt individuelle Produktionsphänotypen mit unterschiedlichen *crt*-Transkriptleveln, Pigmentausbeuten und mit einem variablen metabolischen Fluss.
 3. Die Carotinoid-Produktionskapazität von *P. putida* erlaubt maximale Ausbeuten bis 0,25 mg/gDCW.
-

III.3 TREX-VERMITTELTE CAROTINOID-PRODUKTION MIT *R. CAPSULATUS*

Da für eine effiziente, TREX-vermittelte Etablierung eines Biosyntheseweges in einem heterologen Wirt dessen intrinsischer Metabolismus eine entscheidende Rolle spielen kann, besteht ein Ziel dieser Arbeit darin, die Umsetzbarkeit komparativer Expressionsstudien in verschiedenen Wirten zu demonstrieren. *R. capsulatus* gehört zu den fakultativ anaeroben Nicht-Schwefel-Purpurbakterien. Dieses Gram-negative Bakterium stellt einen besonders interessanten Wirtskandidaten dar, da es selbst zur Photosynthese befähigt ist und einen eigenen Carotinoid-Biosyntheseweg aufweist. Das Genom des Stammes *R. capsulatus* SB 1003 ist vollständig sequenziert (Strnad *et al.*, 2010). Hier wurde der Stamm *R. capsulatus* B10S verwendet.

III.3.1 Die physiologische Carotinoid-Biosynthese in *R. capsulatus*

Die natürliche Carotinoid-Biosynthese von *R. capsulatus* reagiert empfindlich auf die beiden Umweltreize Licht und Sauerstoff. Bei photoautotrophem oder photoheterotrophem Wachstum unter rein anaeroben Bedingungen bildet *R. capsulatus*, von Isoprenoid-Vorstufen ausgehend, über Phytoen und Neurosporin als Haupt-Endprodukt der Carotinoid-Biosynthese Spheroiden. Bei Anwesenheit von Sauerstoff ist die Pigmentsynthese reprimiert bzw. kann vorhandenes Spheroiden zu Spheroidenon oxidiert werden (siehe I.6.1.2, **Abb. I-8**).

Zunächst soll die natürliche Pigmentzusammensetzung von *R. capsulatus* mithilfe verschiedener Analysen dargestellt werden. Dafür wurden Kulturen unter verschiedenen Bedingungen angezogen und Pigment-Proben photospektrometrisch sowie mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC analysiert.

Abbildung III-14 zeigt die beiden Pigment-Phänotypen des *R. capsulatus* B10S Wildtyps in der spät-logarithmischen bzw. früh-stationären Wuchsphase nach 50 h anaerob photoheterotropher Kultivierung im Starklicht sowie nach aerob chemotropher Kultivierung im Dunkeln in verschiedenen Analysen. Die Zellen wurden wie in II.6.2 beschrieben kultiviert.

Zunächst wurden von Ganzzell-Extrakten Absorptionsspektren von 300 bis 900 nm aufgenommen (II.10.1) (**Abb. III-14 A**). Die Absorption im Bereich von 400 bis 500 nm stammt von den Carotinoiden, während die Maxima bei 380, 600 und 780 nm auf das Bakteriochlorophyll a (BChl) zurückzuführen sind. Nach phototropher Anzucht können Carotinoid-Maxima bei 429 nm, 454 nm und 486 nm gemessen werden, die Spheroiden entsprechen. Außerdem akkumuliert BChl. Nach aerober Kultivierung ist im Gegensatz dazu dem Spheroidenon entsprechend ein breiter Carotinoid-*peak* um 480 nm und kaum BChl nachzuweisen. Erwartungsgemäß akkumulieren bei aerober Anzucht deutlich weniger Pigmente. Nach phototropher Anzucht sind die Zellen rotbraun pigmentiert, nach Wachstum unter aeroben Bedingungen

zeigen sie eine leichte rosa Färbung. Da unter diesen Bedingungen kaum BChl entsteht, ist allein die Carotinoidfarbe sichtbar.

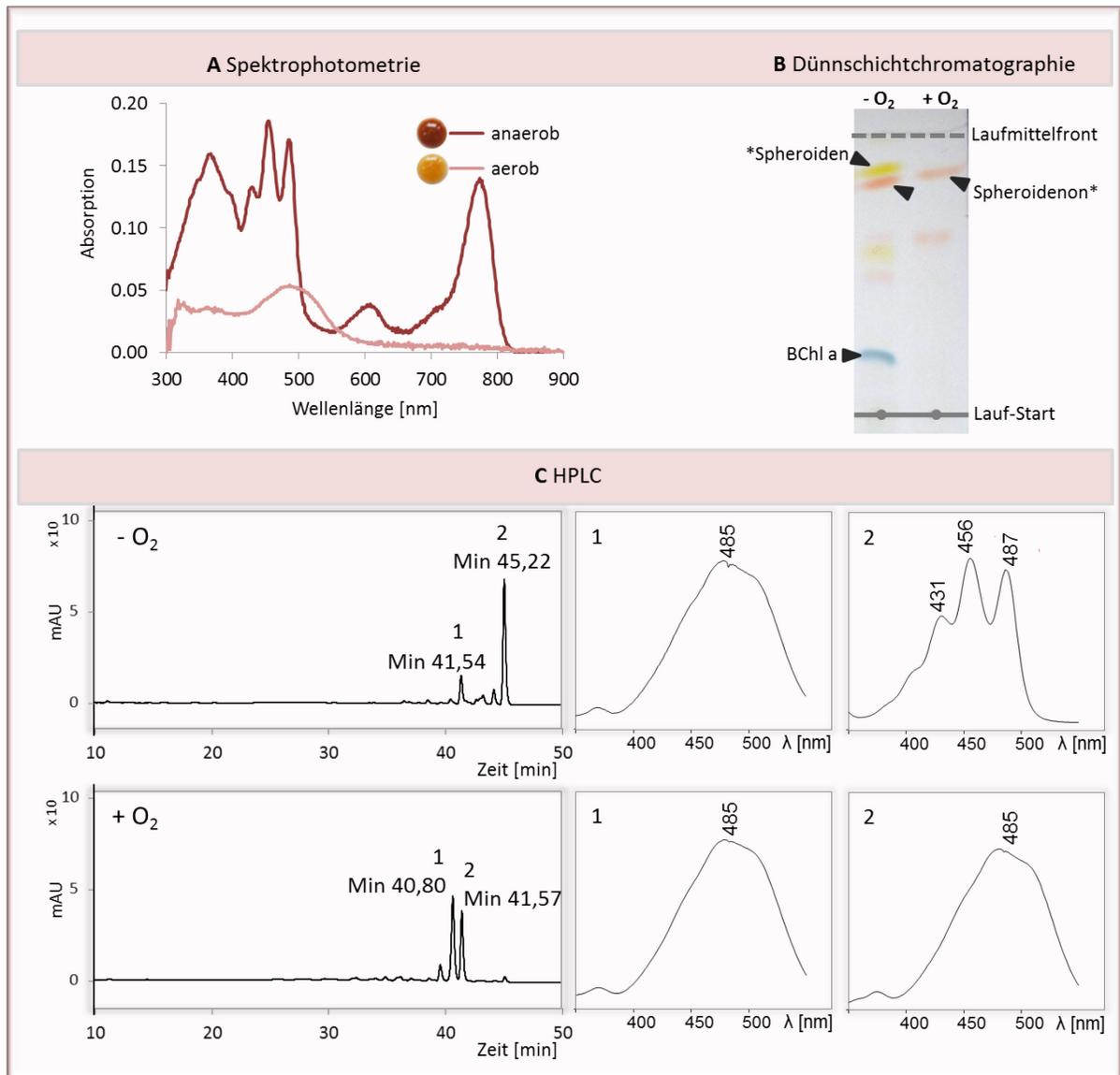


Abb. III-14: Charakterisierung der physiologischen Carotinoid-Biosynthese in *R. capsulatus* B10S

A Absorptionsspektren von Ganzzell-Ethanol-Extrakten aus einer Zellmasse entsprechend $OD_{660\text{ nm}} = 0,2$. Die Pigmentierung der Zellen ist jeweils dargestellt. **B** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Pigmente. BChl a = Bakteriochlorophyll a. * identifiziert anhand zugehöriger HPLC-Daten. **C** HPLC-Profile: Extrakte von Zellkulturen wurden mittels HPLC mit angeschlossenen PDA-Detektor analysiert. Chromatogramme wurden bei 450 nm aufgenommen. Die Absorptionsspektren der jeweiligen Haupt-peaks sind dargestellt. Die Nummern 1 und 2 verweisen jeweils auf das zu einem HPLC-peak im Chromatogramm aufgenommene Absorptionsspektrum. -O₂ = anaerob photoheterotroph, +O₂ = aerob chemotroph. Sämtliche Analysen wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt und zeigten in allen Fällen die dargestellten und beschriebenen Charakteristika. Es ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

Um die Pigmente zunächst optisch aufzutrennen, wurden Extrakte mittels Dünnschichtchromatographie analysiert (**Abb. III-14 B**). Bei der angewendeten Methode interagieren die Analyten unterschiedlich

stark mit der polaren stationären Phase und dem unpolaren Laufmittel (II.10.4). Polarere Verbindungen adsorbieren stärker an der Chromatographie-Platte, während unpolare stärker mit dem Laufmittel wandern. Nach phototropher Anzucht ist hier deutlich das BChl als bläuliche Bande erkennbar. Weiterhin werden zwei Carotinoid-Banden getrennt. Die gelbe Bande, die nur nach phototropher Anzucht auftritt, muss dem unpolaren Spheroiden zugeordnet werden, während die rosa Bande auf das oxidierte Spheroidenon, das etwas stärker retiniert wird, zurückzuführen sein sollte. Diese Bande kann erwartungsgemäß nach aerober Anzucht nachgewiesen werden, kommt aber auch nach anaerob phototropher Anzucht vor. Vermutlich reicht hier der Kontakt der Kultur mit Sauerstoff im Rahmen der Probenaufarbeitung für die Umsetzung eines Teils des anaerob generierten Spheroiden zu Spheroidenon. In beiden Proben sind weitere schwache Banden sichtbar, die vermutlich auf Carotinoid-Zwischenstufen zurückzuführen sind, aber nicht zugeordnet werden können. Durch HPLC-Analyse können die Carotinoide aufgetrennt und spektrometrisch untersucht werden (II.10.3) (**Abb. III-14 C**). Nach phototropher Anzucht wurde bei einer Retentionszeit von 45,22 Min ein Haupt-*peak* mit Spheroiden-typischem Absorptionsspektrum und bei 41,54 Min ein weiterer, vergleichsweise kleiner *peak* mit Spheroidenon-typischem Absorptionsspektrum gefunden. Die Abfolge der Elution dieser Signale in der verwendeten Chromatographie-Methode korreliert mit der unterschiedlichen Polarität (vergleiche **Tab. II-7**) der beiden Carotinoide. Nach aerober Kultivierung wurde ebenfalls bei 41,57 Min ein *peak* im Chromatogramm gemessen, dessen Absorptionsspektrum auf Spheroidenon zurückgeführt werden kann. Ein weiterer Analyt eluiert nach 40,80 Min und zeigt ebenfalls ein Spheroidenon-typisches Spektrum. Dabei könnte es sich um Dimethylspheroidenon handeln, das in Anwesenheit von Sauerstoff durch Katalyse von CrtA aus Dimethylspheroiden gebildet werden kann (siehe I.6.1.2, **Abb. I-8**).

Der Carotinoid-Gehalt im Wildtyp kann nach phototropher Anzucht auf etwa 5 mg/gDCW und nach aerober Anzucht auf etwa 2 mg/gDCW geschätzt werden (II.10.2).

Durch Verwendung der genannten Methoden konnte der Pigment-Phänotyp des *R. capsulatus* Wildtyp-Stamms B10S für die TREX-vermittelte *crt*-Genexpression qualitativ und quantitativ beschrieben werden.

III.3.2 Die Carotinoid-Biosynthese der Mutante *R. capsulatus* Δ *crtC*

Um die natürliche Carotinoid-Biosynthese von *R. capsulatus* (I.6.1.2) in den Biosyntheseweg von *P. ananatis* (I.3.5) effektiv umzuleiten, wurde die Pigmentsynthese des Wildtyp-Stammes unterbrochen, so dass Neurosporin als Endprodukt akkumuliert. Dieses kann als Vorstufe direkt in den *P. ananatis*-Biosyntheseweg einfließen, da die durch *crtI* kodierte Phytoen-Desaturase in der Lage ist, Neurosporin in Lykopen umzuwandeln. Dazu wurde mittels homologer Rekombination das Gen *crtC*, das die Neurosporin-1,2-hydratase kodiert, in *R. capsulatus* deletiert (Loeschcke, 2008). Um die

Pigmentzusammensetzung des so generierten Stammes *R. capsulatus* $\Delta crtC$ zu untersuchen, wurden Kulturen photoheterotroph oder aerob angezogen und nach 50 h Kultivierung Proben photospektrometrisch sowie mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC analysiert. **Abbildung III-15** zeigt den Pigment-Phänotyp des Stammes *R. capsulatus* $\Delta crtC$.

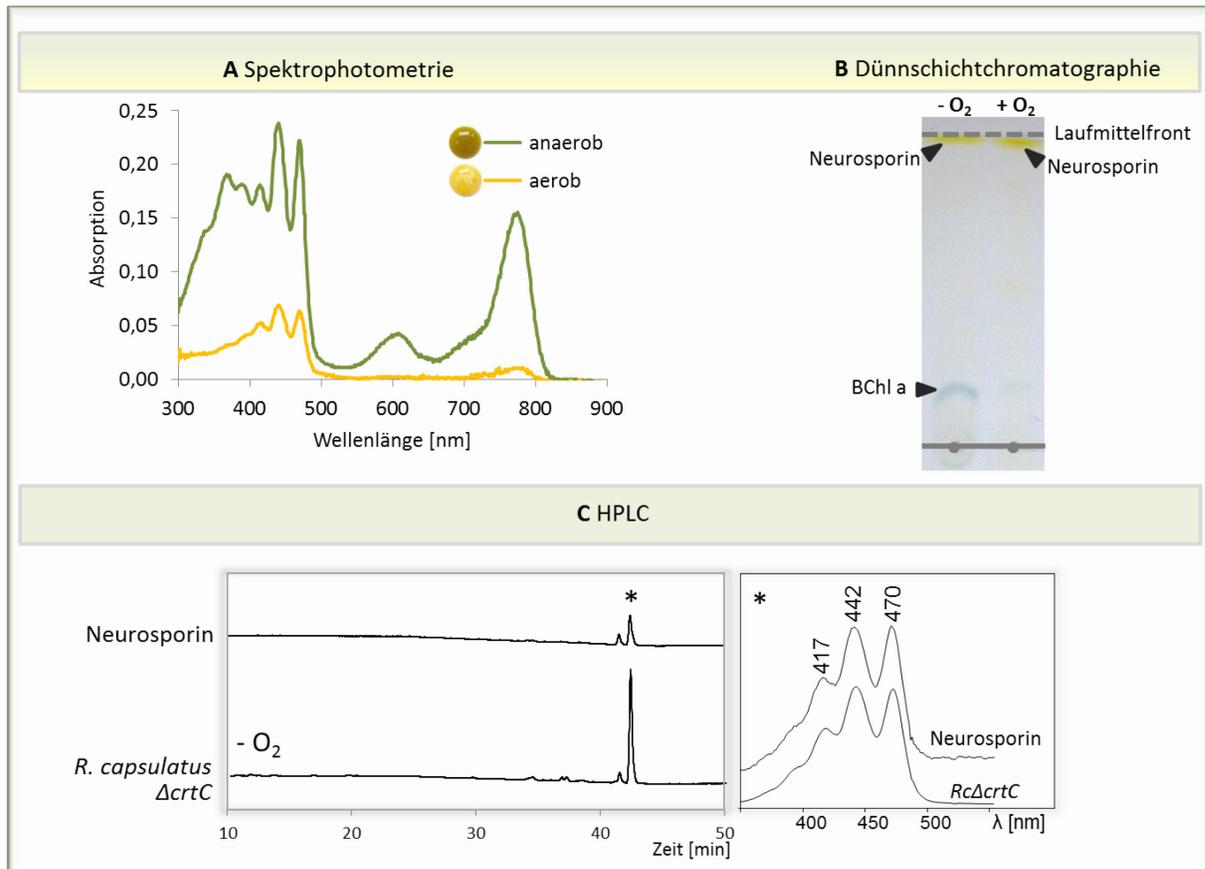


Abb. III-15: Verifizierung der Neurosporin-Akkumulation in *R. capsulatus* $\Delta crtC$

A Absorptionsspektren von Ganzzell-Ethanol-Extrakten aus einer Zellmasse entsprechend $OD_{660\text{ nm}} = 0,2$. Die Pigmentierung der Zellen ist jeweils dargestellt. **B** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Pigmente. BChl a = Bakteriochlorophyll a. **C** Zell-Extrakte wurden mittels HPLC mit angeschlossenen PDA-Detektor analysiert. Chromatogramme wurden bei 450 nm aufgenommen. Es wurde Neurosporin nachgewiesen. Das Chromatogramm sowie das Absorptionsspektrum eines Neurosporin-Standards sind gezeigt. Stern * verweist auf das zum HPLC-peak im Chromatogramm aufgenommene Absorptionsspektrum. -O₂ = anaerob photoheterotroph, +O₂ = aerob chemotroph. Sämtliche Analysen wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt und zeigten in allen Fällen die dargestellten und beschriebenen Charakteristika. Es ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

Die von Ganzzell-Extrakten aufgenommenen Absorptionsspektren zeigen sowohl nach phototropher wie aerober Anzucht Maxima bei 416 nm, 440 nm und 469 nm, die Neurosporin entsprechen, während analog zum Wildtyp-Stamm (III.3.1) lediglich nach phototropher Anzucht deutlich BChl akkumuliert (**Abb. III-15 A**). Die Zellen zeigen dementsprechend eine grüne beziehungsweise gelbe Färbung. Die Auftrennung der Pigmente mittels Dünnschichtchromatographie zeigt (neben BChl nach phototropher Anzucht) eine gelbe Bande an der Laufmittelfront. Da in *R. capsulatus* nur Neurosporin als reine

Kohlenwasserstoff-Verbindung ein solches Laufverhalten zeigen kann, bekräftigt die Messung, dass nun Neurosporin an Stelle von Spheroiden oder Spheroidenon akkumuliert (**Abb. III-15 B**). Die HPLC-Analyse von Extrakten aus phototroph angezogenen Zellen konnte durch Vergleich der gemessenen Retentionszeit und des Absorptionsspektrums mit einem kommerziellen Standard eindeutig Neurosporin als einziges Carotinoid in *R. capsulatus ΔcrtC* identifizieren (**Abb. III-15 C**). Die im PDA gemessenen Absorptionsmaxima von Neurosporin liegen bei 417, 442 und 470 nm.

Anhand der photometrisch in Ethanol-Extrakten gemessenen Absorption bei 440 nm wurden Neurosporin-Ausbeuten von etwa 6 mg/gDCW nach phototropher Anzucht und etwa 1,6 mg/gDCW nach aerober Anzucht geschätzt (II.10.2).

Somit konnte gezeigt werden, dass mit dem Stamm *R. capsulatus ΔcrtC* ein aussichtsreicher Wirtskandidat für die Expression von *crt*-Genen aus *P. ananatis* zur Verfügung steht, der den *Precursor* Neurosporin in ansprechenden Mengen herstellt.

III.3.3 Etablierung des *crt*-Genclusters aus *P. ananatis* in *R. capsulatus ΔcrtC*

Nach eingehender Charakterisierung der ursprünglich physiologischen und der durch Gendeletion gezielt veränderten Carotinoid-Biosynthese von *R. capsulatus* bzw. *R. capsulatus ΔcrtC*, wurde anschließend das *P. ananatis-crt*-Gencluster in der Variante *crtΔX* mittels Konjugation (II.7.3) auf dem Vektor pTREX-*crtΔX* in den Wirtstamm *R. capsulatus ΔcrtC* eingebracht. Da das pUC18-Derivat in *R. capsulatus* wie in *P. putida* nicht repliziert werden kann, konnte durch Verwendung von Gentamycin-haltigem Medium direkt auf *crt*-Transpositions-Mutanten selektiert werden. Konjugation und anschließende Transposition erbrachten Gentamycin-resistente Klone mit einer Häufigkeit von 10^{-6} bis 10^{-8} pro eingesetzter Zelle *R. capsulatus ΔcrtC* (II.7.4). Im Gegensatz zu *P. putida* zeigte nur ein Klon eine veränderte Pigmentierung, die wiederum eine basale *crt*-Genexpression anzeigt. Allerdings ist die Beurteilung eines Farbunterschiedes im natürlich pigmentierten *R. capsulatus* schwieriger. Dieser Klon *RcTREXcrtΔX*, der die Variante des *crt*-Genclusters für die Synthese von Zeaxanthin trägt, wurde für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Die Etablierung der *crt*-Gene im heterologen Wirt wurde durch PCR mit *crt*-spezifischen Primern und genomischer DNA als Template verifiziert (II.7.6). Der Insertionsort der *crt*-Gene und TREX-Elemente wurde durch Plasmid-Rescue (II.7.6.1) als der *Rhodobacter*-Phage RcapNL identifiziert. Somit kann wohl eine Beeinträchtigung der üblichen *Rhodobacter*-Physiologie durch Deletion relevanter Gene ausgeschlossen werden.

III.3.4 Charakterisierung der Carotinoid-Produktion mit *RcTREXcrtΔX*

Um T7RP-abhängige Expressionsstudien mit *RcTREXcrtΔX* durchführen zu können, wurde der Vektor pML5-*P_{fru}*T7 (Katzke *et al.*, 2010), der das T7RP-Gen unter Kontrolle eines *Rhodobacter*-spezifischen,

Fruktose-induzierbaren Promotors trägt, mittels Konjugation in den Stamm eingebracht. Um sowohl die Carotinoid-Biosynthese in *R. capsulatus* zu induzieren, als auch die O₂-abhängige zweifache Hydroxylierung von β -Carotin zu Zeaxanthin durch CrtZ am Ende des Carotinoid-Biosynthesewegs von *P. ananatis* zu ermöglichen, wurden die Zellen zunächst semiaerob kultiviert (II.6.3). Die so eingestellte Sauerstoffkonzentration sollte niedrig genug sein, um nicht die Carotinoid-Biosynthese von *R. capsulatus* vollständig zu reprimieren und gleichzeitig ausreichend für die Aktivität von CrtZ sein.

Während dieser Expressionsstudien wurde die TREX-vermittelte Carotinoid-Produktion eingehend untersucht. Es wurde das Wachstum, die Transkription der *crt*-Gene sowie die Carotinoid-Produktion nach 50 Stunden quantitativ und qualitativ untersucht (**Abb. III-16**).

Der Stamm *RcTREXcrt Δ X* zeigt mit Vektor pML5-P_{fru}T7 und Induktor Fruktose stark eingeschränktes Wachstum (**Abb. III-16 A**). Nach 50 Stunden wurde die Carotinoid-Akkumulation bestimmt. Diese wird deutlich weniger durch die Anwesenheit der T7RP beeinflusst, als das Wachstum der Zellen. Der Gesamt-Carotinoidgehalt wird von 3,2 auf 4,0 mg/gDCW gesteigert (**Abb. III-16 B**). Im Absorptionsspektrum von Ganzzell-Extrakten (**Abb. III-16 C**) ist ein deutlich gegenüber dem Ausgangsstamm *R. capsulatus Δ crtC* verändertes Carotinoid-Absorptionsprofil zwischen 400 und 500 nm zu beobachten (vergleiche **Abb. III-15 A**), das in der Form und mit Absorptionsmaxima bei etwa 452 nm und 476 nm für die Carotinoide β -Carotin, β -Cryptoxanthin oder Zeaxanthin aus *P. ananatis* typisch ist. Die Dünnschichtchromatographie zeigt eine einzelne Bande an der Laufmittelfront (**Abb. III-16 D**). Da nur reine Kohlenwasserstoffe dieses Retentionsverhalten zeigen, scheint ausschließlich das Intermediat β -Carotin im Stamm *RcTREXcrt Δ X* zu akkumulieren. Die quantitative Analyse der *crt*-Gen-Transkripte (II.11) (**Abb. III-16 E**) zeigt nichtsdestotrotz in Anwesenheit der T7RP die substantielle Transkription sämtlicher *crt*-Gene inklusive *crtZ*, dessen Genprodukt die zweifache Hydroxylierung von β -Carotin zu Zeaxanthin katalysiert. Wie in *P. putida* wurde eine basale Expression aller *crt*-Gene festgestellt (in der Abbildung aufgrund der Skalierung nicht für alle Gene zu erkennen), die im Mittel rund 60-fach durch die Induktion der T7RP erhöht wurde. Dennoch bestätigt die HPLC-Analyse die Akkumulation von β -Carotin, sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit der T7RP (**Abb. III-16 F**). Vom im Ausgangsstamm *R. capsulatus Δ crtC* gebildeten Carotinoid Neurosporin werden mit und ohne T7RP nur geringe Mengen detektiert. Offensichtlich ist die basale Expression der *crt*-Gene in *RcTREXcrt Δ X* bereits ausreichend, Neurosporin nahezu quantitativ als Vorstufe in den Carotinoid-Biosyntheseweg von *P. ananatis* einzubringen.

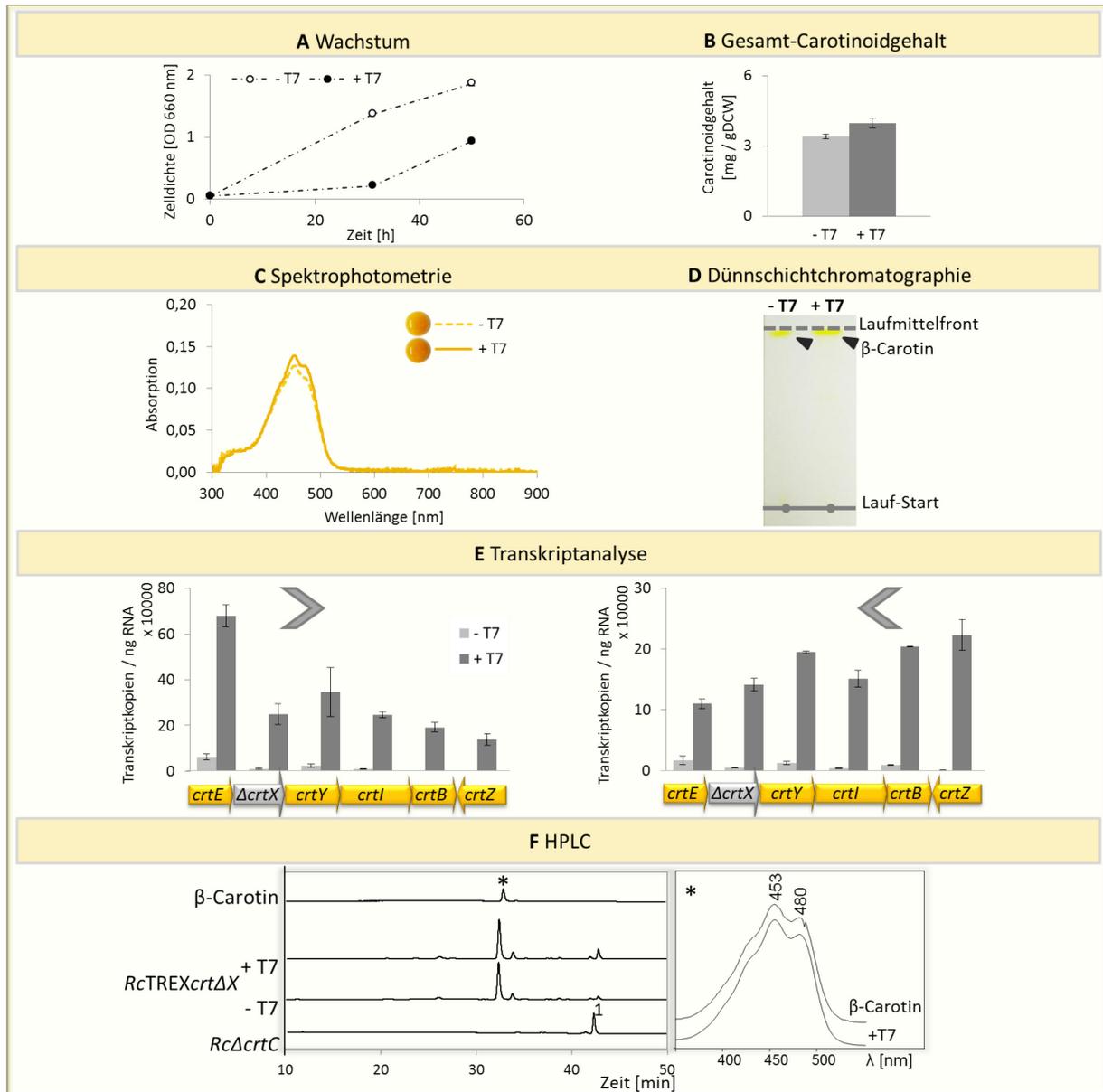


Abb. III-16: Analyse der Carotinoide-Biosynthese in *RcTREXcrtΔX* bei aerober Anzucht

A Wachstum der Expressionskulturen. **B** Photometrisch in Zellextrakten bestimmter Gesamt-Carotinoidgehalt nach 50 h Kultivierung. **C** Absorptionsspektren von Ganzzell-Ethanol-Extrakten aus einer Zellmasse entsprechend $OD_{660\text{ nm}} = 0,2$. Die Pigmentierung der Zellen nach 2 Tagen Wachstum ist jeweils dargestellt. **D** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Pigmente. **E** Die Anzahl der *crt*-Transkriptkopien wurde in *sense* und *antisense* mittels RT-qPCR bestimmt. Die Pfeile bezeichnen die untersuchte Transkriptionsrichtung entlang des *crt*-Clusters. Das deletierte Gen *crtX* ist grau markiert. **F** Extrakte von Zellkulturen wurden mittels HPLC mit angeschlossenenem PDA-Detektor analysiert. Chromatogramme wurden bei 450 nm aufgenommen. Es wurde β-Carotin nachgewiesen. Das Chromatogramm sowie das Absorptionsspektrum eines β-Carotin-Standards sind gezeigt. Stern * verweist auf das zum HPLC-peak im Chromatogramm aufgenommene Absorptionsspektrum. Das Chromatogramm des Neurosporin-produzierenden Ausgangsstammes *R. capsulatus ΔcrtC* ist gezeigt. 1 = Neurosporin. + T7 = mit pML5- P_{fru} T7 und 8 mM Induktor Fruktose. - T7 = Kontrolle mit Leervektor pML5. **A,B,E**: Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken. **C,D,F**: Es werden repräsentative Ergebnisse einer Analyse von biologischen Triplikaten dargestellt.

Um festzustellen, weshalb β -Carotin nicht weiter umgesetzt wurde, wurde die Sequenz des Gens *crtZ* im Genom von *RcTREXcrt Δ X* überprüft (II.7.3.1) und eine Punktmutation gefunden, die den Austausch von Threonin¹³ zu Alanin zur Folge hat und somit wohl das Enzym inaktiviert.

Obwohl aufgrund der Punktmutation in *crtZ* nicht der vollständige Carotinoid-Biosyntheseweg von *P. ananatis* bis Zeaxanthin auf Produktebene etabliert werden konnte, zeigen die Ergebnisse der TREX-vermittelten Carotinoid-Produktion mit *R. capsulatus* dennoch deutlich die Leistungsfähigkeit des Expressionssystems: Die *crt*-Gene aus *P. ananatis* können zuverlässig in den heterologen Wirt eingebracht und dort durch die T7RP mit hoher Effizienz exprimiert werden. Im hier beschriebenen Fall hat die effiziente Überexpression der *crt*-Gene durch die T7RP allerdings keinen deutlich positiven Effekt auf die Carotinoid-Produktion, sondern verlangsamt im Grunde lediglich das Wachstum der Zellen.

In *R. capsulatus* ist unter photosynthetischen Wuchsbedingungen die Pigmentsynthese voll induziert sowie außerdem die Bildung des intrazytoplasmatischen Membransystems, in das die Lichtsammelkomplexe eingelagert werden (siehe I.6.1.2 und III.3.1).

Um eventuell die Ausbeute an β -Carotin zu erhöhen, wurde die Carotinoid-Produktion des Stammes *RcTREXcrt Δ X* bei photoheterotropher Kultivierung nach 50 h untersucht (**Abb. III-17**).

Das Absorptionsspektrum von Ganzzell-Extrakten aus *RcTREXcrt Δ X* nach 50 h phototropher Anzucht (**Abb. III-17 A**) zeigt sowohl in An- wie auch in Abwesenheit der T7RP ein in der Form ähnliches Carotinoid-Absorptionsprofil (zwischen 400 und 500 nm), wie nach aerober Anzucht (vergleiche **Abb. III-16 C** und **F**). Allerdings deuten die Absorptionsmaxima von etwa 440 nm und 468 nm auf Neurosporin hin (vergleiche **Abb. III-15 A** und **C**). Die Dünnschichtchromatographie zeigt neben der erwarteten Bande vom Bakteriochlorophyll a wie nach aerober Anzucht eine einzelne Carotinoid-Bande nahe der Laufmittelfront (**Abb. III-17 B**), was die Akkumulation eines reinen Kohlenwasserstoff-Carotinoids anzeigt. Eine Mischung von Neurosporin mit β -Carotin kann auf diese Weise nicht aufgetrennt werden. Der Gesamt-Carotinoidgehalt liegt unabhängig von der T7RP bei etwa 5,7 mg/gDCW (**Abb. III-17 C**). Die HPLC-Analyse bestätigt die Akkumulation von β -Carotin (**Abb. III-17 D, 1**) und Neurosporin (**Abb. III-17 D, 4**), das den größeren Anteil ausmacht. Der HPLC-*peak* von β -Carotin weist im Gegensatz zu der Messung nach aerober Anzucht einen *Tail* mit einem Absorptionsspektrum, das nicht β -Carotin entspricht, auf (**Abb. III-17 D, 2**). Außerdem tritt ein weiterer *peak* bei 33,83 Min auf, dessen Spektrum auf Dihydro- β -Carotin hinweist (Britton *et al.*, 2004) (**Abb. III-17 D, 3**). Der Anteil von β -Carotin an der Carotinoid-Gesamtheit kann auf < 20 % geschätzt werden.

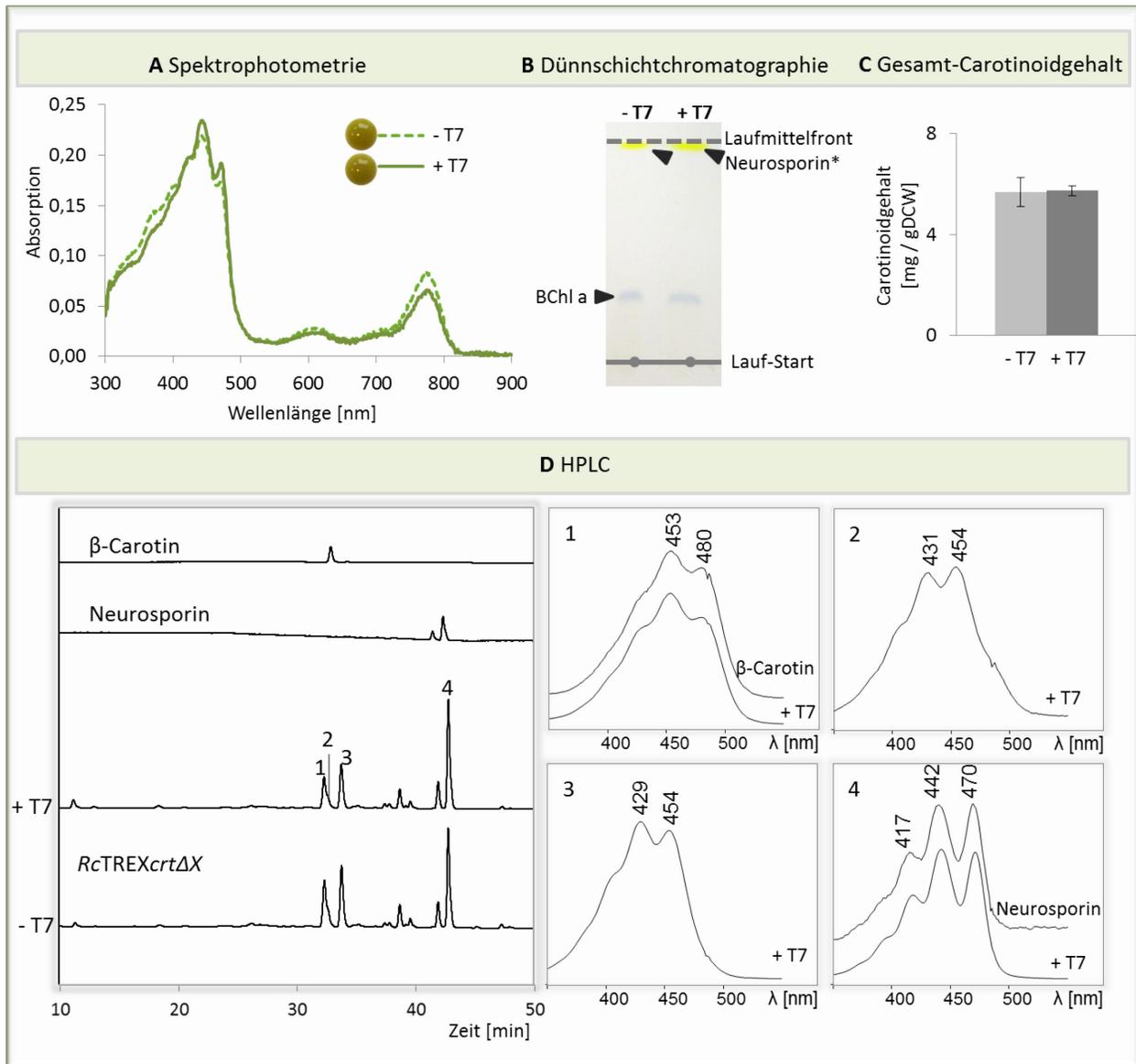


Abb. III-17: Analyse der Carotinoid-Biosynthese in *RcTREXcrtΔX* bei photoheterotropher Anzucht

A Absorptionsspektren von Ganzzell-Ethanol-Extrakten aus einer Zellmasse entsprechend $OD_{660\text{ nm}} = 0,2$. Die Pigmentierung der Zellen nach 2 Tagen Wachstum ist jeweils dargestellt. **B** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Pigmente. BChl a = Bakteriochlorophyll a. * anhand zugehöriger HPLC-Daten als Haupt-Carotinoide identifiziert. **C** Photometrisch in Zellextrakten bestimmter Gesamt-Carotinoidgehalt nach 50 h Kultivierung. Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken. **D** HPLC-Profil: Extrakte von Zellkulturen wurden mittels HPLC mit angeschlossenen PDA-Detektor analysiert. Chromatogramme wurden bei 450 nm aufgenommen. Die Absorptionsspektren der jeweiligen Haupt-peaks sind dargestellt. Die Nummern 1 bis 4 verweisen auf das zu einem HPLC-peak im Chromatogramm aufgenommene Absorptionsspektrum. Es wurden β -Carotin und Neurosporin nachgewiesen. Das Chromatogramm sowie das Absorptionsspektrum eines β -Carotin- und Neurosporin-Standards sind gezeigt. Repräsentative Ergebnisse einer Messung von biologischen Triplikaten sind dargestellt. + T7 = mit $pML5-P_{fru}T7$ und 8 mM Induktor Fruktose. - T7 = Kontrolle mit Leervektor $pML5$. **A,B,C**: Es werden repräsentative Ergebnisse einer Analyse von biologischen Triplikaten dargestellt.

Offenbar führt die durch phototrophe Kultivierung volle Induktion des *R. capsulatus*-Carotinoid-Syntheseapparats zur Akkumulation von Neurosporin und zur Bildung weiterer Nebenprodukte. Eine

mögliche Ursache ist die nicht ausreichende Leistungsfähigkeit des Genproduktes von *crtI*, das Neurosporin in den *P. ananatis*-Biosyntheseweg einbringt und zu Lykopen umsetzt. Außerdem ist denkbar, dass die Zugänglichkeit des intrinsisch synthetisierten Neurosporins für das heterolog exprimierte Enzym bei anaeroben, also photosynthetischen Wuchsbedingungen, eingeschränkt ist. Unter diesen Bedingungen werden die Lichtsammelkomplexe assembliert, in die die Carotinoide vermutlich eingelagert und somit möglicherweise dem Zugriff der Enzyme entzogen werden.

Zusammenfassend konnten bei der Verwendung von *R. capsulatus* für die TREX-vermittelte Produktion von Carotinoiden die folgenden Feststellungen gemacht werden:

1. Die bidirektionale Expressionsweise des TREX-Systems führt zur Bildung substantieller *crt*-Transkriptmengen.
 2. Bei aerober Anzucht wurde eine Ausbeute von *P. ananatis*-Carotinoiden bis 4,0 mg/gDCW festgestellt.
 3. Bei phototropher Anzucht erhöhen sich zwar die Carotinoid-Mengen durch den photosynthetischen *lifestyle*, allerdings sinkt der Anteil spezifischen Produkts auf < 20 %.
-

III.4 TREX-VERMITTELTE CAROTINOID-PRODUKTION MIT *E. COLI*

Nach der Verwendung von *P. putida* und *R. capsulatus* wurde die Verwendbarkeit des Standard-Expressionswirtes *E. coli* für die TREX-vermittelte Carotinoid-Produktion untersucht. Seit Jahrzehnten stellt dieses Gram-negative Enterobakterium einen der ersten Wirte der Wahl zur Synthese von Proteinen und Metaboliten dar. Auch die Carotinoid-Synthese mit *E. coli* wurde von zahlreichen Gruppen in verschiedenen Ansätzen bearbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Stamm BL21(DE3) verwendet, in dessen Genom das T7RP-Gen unter Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors integriert ist (Studier & Moffat, 1986). Die vollständige Genomsequenz dieses Stammes ist bekannt (Jeong *et al.*, 2009).

III.4.1 Etablierung des *P. ananatis*-*crt*-Clusters in *E. coli*

Im Vorangehenden wurde die Frage nach der Umsetzbarkeit der bidirektionalen und funktionellen Expression durch die T7RP eingehend bearbeitet (III.2.6, III.2.7). Dabei wurde die Variante *crtΔX* des *crt*-Genclusters aus *P. ananatis*, die aus zwei konvergent orientierten Operons zusammengesetzt ist, verwendet.

Im Hinblick auf komparative Expressions- bzw. Produktionsstudien wurde für die TREX-vermittelte Carotinoid-Produktion in *E. coli* nun die unidirektional aus einem Operon bestehende Variante *crtΔZ* für die Synthese von β -Carotin gewählt, da die Produktion dieses Carotinoids sowohl mit *P. putida* als auch mit *R. capsulatus* gezeigt werden konnte (III.2.8, III.3.4).

Um das TREX-System in *E. coli* umsetzen zu können, wurde zunächst ein *suicide* Vektor erstellt, auf dessen Basis ein Konstrukt erzeugt werden konnte, das analog zu den bisher verwendeten pTREX-*crtΔX* (III.2.1) und pTREX-*crtΔZ* (III.2.8) das TREX-markierte *crt*-Gencluster trägt und im verwendeten Zielwirt nicht repliziert.

Dazu wurde eine Temperatur-sensitive Variante des pUC18 erzeugt, indem Teile der Vektoren pUC18 und pKD46 kombiniert wurden. Die *multiple cloning site* und das Ampicillin-Resistenzgen von pUC18 sowie der Temperatur-sensitive *origin of replication* ori101 und das *rep*-Gen von pKD46 wurden mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden durch die eingesetzten Primer *NcoI*-Sites am *rep*-Gen von pDK46 sowie an der *multiple cloning site* von pUC18 und *BstBI*-Sites am ori101 von pKD46 und am Ampicillin-Resistenzgen von pUC18 angefügt, sodass beide Fragmente zu einem Vektor ligiert werden konnten, der pUC18ts genannt wurde. Die Variante *crtΔZ* des *crt*-Genclusters wurde vom Vektor pTREX-*crtΔZ* (III.2.8) isoliert und *XbaI*/*EcoRI* in pUC18ts inkloniert. Schließlich wurden die TREX-Kassetten wie bereits bei pTREX-*crtΔX* (III.2.1) und pTREX-*crtΔZ* (III.2.8) in die *XbaI*-Site des Konstrukts eingebracht. Das entstandene Konstrukt, ptsTREX-*crtΔZ*, trägt die *crt*-Gene für die Synthese von β -Carotin und die TREX-

Kassetten, wobei in gleicher Weise wie bei pTREX-crtΔX (**Abb. III-2**) die L-TREX-Kassette direkt am Carotinoid-Cluster liegt, während die R-TREX-Kassette durch den Vektor-*backbone* davon getrennt wird. Um die *crt*-Gene in *E. coli* zu etablieren, wurde der Wirt mit dem Vektor ptsTREX-crtΔZ transformiert (II.7.1). Nach einstündiger Vorinkubation bei 30°C wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Da der Vektor bei dieser Temperatur nicht repliziert wird, konnte durch Verwendung von Gentamycin-haltigem Medium direkt auf *crt*-Transpositions-Mutanten selektiert werden (II.7.5). Ein gelb-orange pigmentierter Klon *EcTREXcrtΔZ* wurde für die folgende Arbeit ausgewählt und auf den Verlust der Vektor-Resistenz gegen Tetrazyklin geprüft. Die Etablierung der *crt*-Gene wurde zusätzlich durch PCR mit *crt*-spezifischen Primern und genomischer DNA als Template verifiziert (II.7.6).

III.4.2 Charakterisierung der Carotinoid-Produktion mit *EcTREXcrtΔZ*

Da der *E. coli* Stamm *EcTREXcrtΔZ* als Derivat von BL21(DE3) das Gen für die T7RP im Genom trägt, können mit diesem Stamm ohne einen weiteren Zwischenschritt Expressionsstudien (II.6.1) durchgeführt werden. Durch Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die Expression der T7RP bei einer Zelldichte von etwa 0,5 (OD_{580 nm}) induziert. Als Kontrolle wurde der Stamm ohne Induktor kultiviert. **Abbildung III-18** zeigt die Untersuchung der TREX-vermittelten β-Carotin-Produktion mit *EcTREXcrtΔZ* in Bezug auf das Wachstum der Zellen, die Transkription der *crt*-Gene sowie die quantitative und qualitative Carotinoid-Produktion.

Der Stamm *EcTREXcrtΔZ* zeigt mit 0,5 mM Induktor IPTG moderat eingeschränktes Wachstum (**Abb. III-18 A**). In der Mitte und am Ende der logarithmischen Wuchsphase (nach 6 bzw. 20 h Inkubation) wurde der Gesamt-Carotinoidgehalt bestimmt (II.10.2). Hier bewirkt die T7RP vermittelte *crt*-Genexpression eine 2- bis 3-fache Verstärkung von 0,17 mg auf 0,52 mg /gDCW nach 6 h sowie von 0,33 mg auf 0,70 mg /gDCW nach 20 h (**Abb. III-18 B**). Im Absorptionsspektrum von Ganzzell-Extrakten (II.10.1) ist nach 20 h ein typisches Carotinoid-Absorptionsprofil zwischen 400 und 500 nm festzustellen (**Abb. III-18 C**). Absorptionsmaxima bei etwa 450 nm und 475 nm deuten auf β-Carotin hin, lassen aber keine Identifizierung zu. Die Zellen zeigen den Messungen entsprechend eine deutlich erkennbare Pigmentierung (**Abb. III-18 D**). Um die Leistung des TREX-Systems in *E. coli* vollständig bewerten zu können, wurde die *crt*-mRNA quantitativ mittels qPCR analysiert (II.11). Wie bereits in *P. putida* und *R. capsulatus* beobachtet, wurde auch hier eine basale Expression der *crt*-Gene detektiert. In *E. coli* BL21(DE3) kann diese einerseits, wie für die anderen Wirte besprochen, auf die Erkennung der Promotoren des *crt*-Genclusters oder *read-through* von genomischen Promotoren außerhalb des Transposons zurückzuführen sein, aber auch von einer nicht induzierten *leaky* Expression der T7RP, die im Genom des Expressionsstammes vorliegt, herrühren.

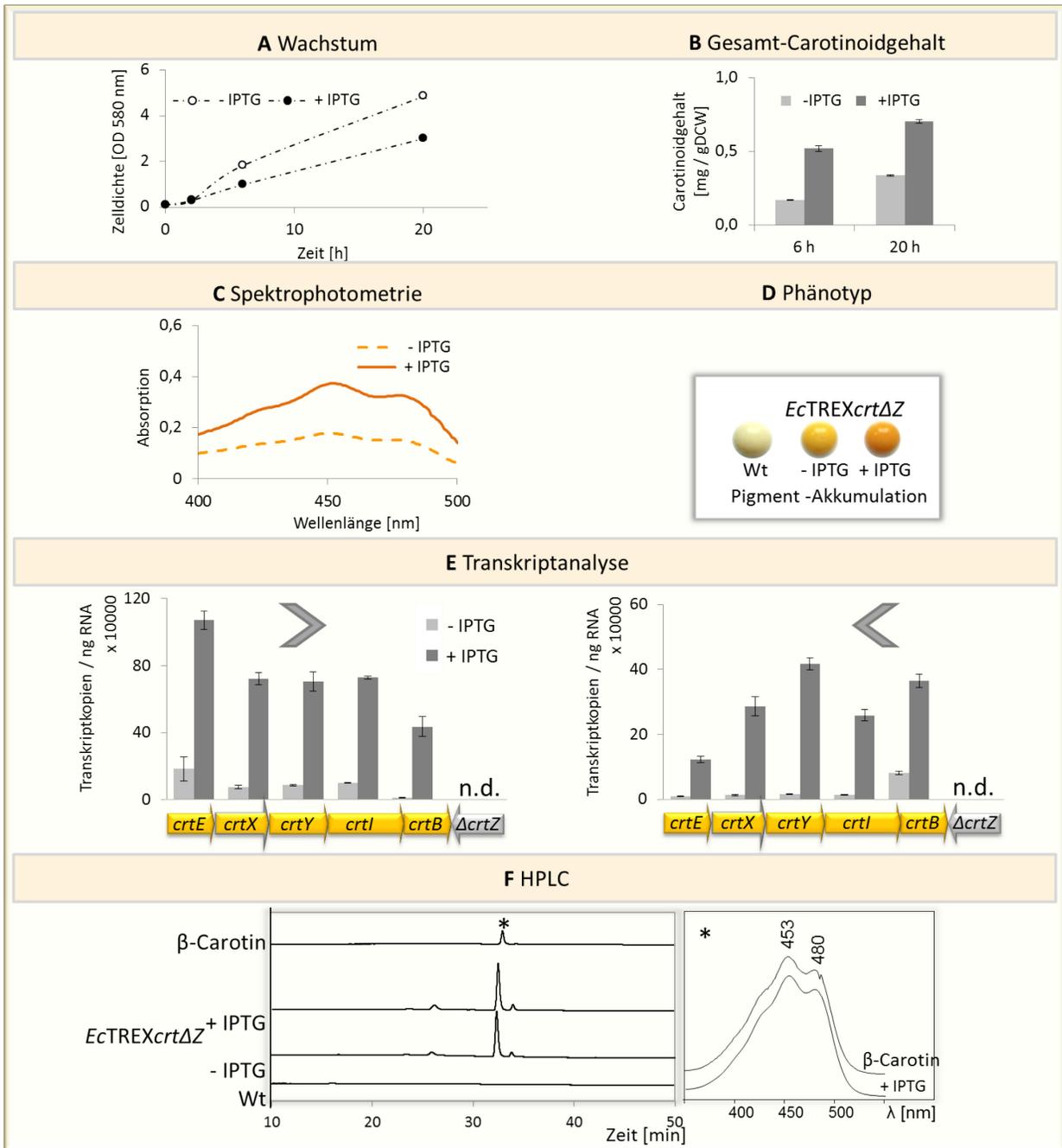


Abb. III-18: Analyse der Carotinoid-Biosynthese in *EcTREXcrtΔZ*

A Wachstum der Expressionskulturen. **B** Photometrisch in Zellextrakten bestimmter Gesamt-Carotinoidgehalt nach 6 bzw. 20 h Kultivierung. **C** Absorptionsspektren von Ganzzell-Ethanol-Extrakten aus einer Zellmasse entsprechend $OD_{580\text{ nm}} = 4$, nach 20 h Kultivierung. **D** Pigment-Phänotyp nach 20 h. **E** Die Anzahl der *crt*-Transkriptkopien wurde in *sense* und *antisense* mittels RT-qPCR bestimmt. Die Pfeile bezeichnen die untersuchte Transkriptionsrichtung entlang des *crt*-Clusters. Das deletierte Gen *crtZ* ist grau markiert. n.d. = nicht detektiert. **F** Extrakte von Zellkulturen wurden mittels HPLC mit angeschlossenen PDA-Detektor analysiert. Chromatogramme wurden bei 450 nm aufgenommen. Es wurde β -Carotin nachgewiesen. Das Chromatogramm sowie das Absorptionsspektrum eines β -Carotin-Standards sind gezeigt. Stern * verweist auf das zum HPLC-peak im Chromatogramm aufgenommene Absorptionsspektrum. Wt = *E. coli* BL21(DE3) Wildtyp

A,B,E: Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken. **C,D,F:** Repräsentative Ergebnisse einer Analyse von biologischen Triplikaten sind dargestellt.

Eine deutliche gelbe Pigmentierung nach Einbringen des *crt*-Genclusters auch in *E. coli* DH5 α (keine Abbildung) bestätigt den erstgenannten Effekt, da dieser Stamm kein T7RP-Gen trägt. Im Mittel wurde die Anzahl der *crt*-Transkriptkopien 15-fach durch die Induktion der T7RP erhöht (**Abb. III-18 E**). Der Induktionsfaktor auf Transkriptebene übersteigt hier also wiederum den auf Produktebene. Die qualitative Analyse der produzierten Pigmente durch HPLC (II.10.3) bestätigte die Akkumulation von β -Carotin, sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit der T7RP (**Abb. III-18 F**). Das im Biosyntheseweg von *P. ananatis* dem β -Carotin vorangehende Lykopen wurde nicht nachgewiesen.

Zusammenfassend konnten bei der Verwendung von *E. coli* für die T7RP-vermittelte Produktion von Carotinoiden die folgenden Feststellungen gemacht werden:

1. Die bidirektionale Expressionsweise des T7RP-Systems führt zur Bildung substantieller *crt*-Transkriptmengen.
 2. Es wurde eine Ausbeute von *P. ananatis*-Carotinoiden bis 0,7 mg/gDCW festgestellt.
-

III.5 VERGLEICHENDE ANALYSE DER TREX-VERMITTELTEN CAROTINOID-PRODUKTION MIT VERSCHIEDENEN WIRTEN

Mithilfe des TREX-Systems konnte der Carotinoid-Biosyntheseweg von *P. ananatis* in die Wirte *P. putida*, *R. capsulatus* und *E. coli* übertragen werden. Dabei konnten mehrere Leistungsmerkmale des TREX-Systems festgestellt sowie sehr unterschiedliche Reaktionen der verschiedenen Organismen auf die TREX-Anwendung beobachtet werden.

Das TREX-System zeigte eine robuste Anwendbarkeit, indem es sowohl Insertionsmutanten mit großer Effizienz generierte, als auch eine zuverlässige Überexpression der heterologen *crt*-Gene aus *P. ananatis* in den verschiedenen Wirten vermittelte. Diese allerdings zeigten im Einzelnen sehr unterschiedliche Reaktionen darauf. **Tabelle III-2** fasst diese Unterschiede zusammen.

Tab. III-2: Vergleich der TREX-vermittelten Carotinoid-Produktion mit verschiedenen Wirten

Anzahl • zeigt die Stärke der Einschränkung des Wachstums von Produktionsstämmen bei Expression der T7RP an.

Organismus	Eingeschränktes Wachstum +/- T7RP	T7RP Effekt auf Transkript	T7RP Effekt auf Produkt	Max. Carotinoid-Ausbeute [mg/gDCW]	Max. volumetr. Produktivität [mg L ⁻¹ h ⁻¹]
<i>P. putida</i>	=	4x	bis 2x	0,2	0,06
<i>R. capsulatus</i>	••	60x	=	4,0	0,09
<i>E. coli</i>	•	15x	2x	0,7	0,10

P. putida zeigte in An- und Abwesenheit der T7RP bei zwei von drei untersuchten Stämmen *PpTREXcrtΔX* kaum unterschiedliches Wachstum (**Abb. III-5**), wohingegen sich *R. capsulatus RcTREXcrtΔX* unter diesen Bedingungen stark beeinträchtigt zeigte (**Abb. III-16**). Das Wachstum von *E. coli EcTREXcrtΔZ* war bei Induktion der T7RP moderat beeinträchtigt (**Abb. III-18**).

Die basale Expression der *crt*-Gene lag in allen untersuchten Wirten in einer ähnlichen Größenordnung (< 100.000 Transkriptkopien). Durch die T7RP wurden sehr unterschiedliche Induktionsfaktoren erreicht: Im Mittel etwa 4-fach bei *P. putida*, etwa 60-fach bei *R. capsulatus* und etwa 15-fach bei *E. coli* (**Abb. III-10, -16, -18**).

Auf Produktebene ergaben sich deutlich geringere Steigerungsfaktoren von etwa 2-fach bei den untersuchten *P. putida*-Stämmen *PpTREXcrtΔX* (**Abb. III-5, -7**); im Falle von *PpTREXcrtΔZ* wurde keine signifikante Steigerung der β -Carotin-Akkumulation durch die T7RP beobachtet (**Abb. III-13**). *E. coli*

EcTREXcrtΔZ zeigte ebenfalls eine T7RP-abhängige Steigerung der β -Carotin-Ausbeute um etwa 2-fach (**Abb. III-18**). Bei *R. capsulatus* hatte die T7RP kaum Effekt auf die Carotinoid-Ausbeute (**Abb. III-16**).

Die maximale Ausbeute lag bei *P. putida* mit 0,22 mg Carotinoid-Gemisch / gDCW (**Abb. III-5, -12, PpTREXcrtΔX-a**), bzw. 0,15 mg Zeaxanthin/gDCW (**Abb. III-5, -12, PpTREXcrtΔX-b**) und 0,15 mg β -Carotin/gDCW (**Abb. III-13**) am niedrigsten und bei *R. capsulatus* mit 4,00 mg β -Carotin/gDCW am höchsten (**Abb. III-16**). *E. coli* produzierte maximal 0,70 mg β -Carotin / gDCW (**Abb. III-18**).

Bei der Beurteilung dieser Angaben ist zu beachten, dass i) nicht alle Organismen zu gleichen Zelldichten wachsen und ii) nicht gleiche Wachstumsraten zeigen. Somit ergibt sich ein anderes Bild bei Berücksichtigung des Produktionsvolumens und der Produktionszeit. *R. capsulatus* und *E. coli* zeigen eine ähnliche volumetrische Carotinoid-Produktivität, beide im Bereich von 90 bis 100 $\mu\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$, während *P. putida* bis etwa 60 $\mu\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ produziert. Außerdem muss bei der Bewertung der Eignung der hier verwendeten Wirte zur TREX-vermittelten Carotinoid-Produktion beachtet werden, dass nur im Falle von *P. putida* der Versuch unternommen wurde, eine generalisierte Aussage über die grundsätzliche Produktionskapazität des Organismus zu treffen, während für *R. capsulatus* und *E. coli* lediglich einzelne Klone untersucht wurden, um Charakteristika der TREX-Anwendung aufzuzeigen.

Die unterschiedlichen Reaktionen der verschiedenen Wirte auf die Anwendung des TREX-Systems zur Carotinoid-Produktion können schwer vorhergesagt werden und unterstreichen die Bedeutung der *broad host range*-Anwendbarkeit des Expressionssystems.

Zusammenfassend konnten bei der vergleichenden Analyse der TREX-vermittelten Carotinoidproduktion mit verschiedenen Wirten die folgenden Feststellungen gemacht werden:

1. Das TREX-System ist in den getesteten Wirten *P. putida*, *R. capsulatus* und *E. coli* verwendbar.
2. Die bidirektionale Expressionsweise des TREX Systems führt zur Bildung substantieller *crt*-Transkriptmengen in sämtlichen Wirten.
3. Die gewählten Wirte zeigen äußerst unterschiedliche Carotinoid-Produktionsprofile.

Im Allgemeinen sind die individuellen, wirtsspezifischen Resultate bei heterologer Expression von Biosynthesegenen schwierig vorherzusagen. Das TREX-System ermöglicht komparative Expressionsstudien zur experimentellen Überprüfung der Eignung verschiedener Wirte für bestimmte Biosynthesewege.

III.6 KONTROLLE VON GENEXPRESSION DURCH LICHT

Für einen optimierten Fluss in Gencluster-kodierten Biosynthesewegen werden in der synthetischen Biologie derzeit Bemühungen unternommen, die Expression individueller Gene oder Gengruppen einzeln zu kontrollieren, um ausgewählte Bestandteile des Biosyntheseweges individuell zeitlich und räumlich anzusteuern (Medema *et al.*, 2011b). Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher sowohl im Hinblick auf eine verbesserte TREX-vermittelte bidirektionale Expression, als auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer steuerbarer Expressionssysteme damit begonnen, Licht-regulierte Systeme zur kontrollierten Genexpression in Bakterien zu etablieren.

Für eine Weiterentwicklung des TREX-Systems ist eine getrennte Ansteuerung der beiden konvergenten T7-Promotoren denkbar. Da bekannt ist, dass die simultane Expression von beiden Promotoren in entgegengesetzter Richtung die Transkriptionseffizienz herabsetzt (siehe I.7, **Abb. I-9**), könnte sich eine zeitliche Trennung der Transkription in beiden Richtungen positiv auf die Effizienz der TREX-vermittelten Transkript- und schließlich Produktbildung auswirken. Allerdings scheint die bidirektionale Expression des *crt*-Genclusters im Rahmen der hier vorgelegten Studien keinen einschränkenden Effekt auf die Carotinoid-Ausbeuten zu haben, da die T7RP-vermittelte Erhöhung der Transkriptlevel in allen Wirten die T7RP-vermittelte Ausbeuten-Erhöhung bereits übersteigt. Somit ist in diesem Fall durch eine weitere Verbesserung der Transkriptionseffizienz keine Erhöhung der Produktausbeuten zu erwarten. Nichtsdestotrotz mag sich das System in anderen Anwendungen anders verhalten, weshalb die getrennte Regulation der beiden T7-Promotoren ein interessantes Ziel ist. Einen weiteren Nutzen könnte die getrennte Ansteuerung der beiden T7-Promotoren außerdem bei der Expression von Genclustern bieten, die für die Biosynthese toxischer Produkte kodieren. Es könnten etwa bei der synthetischen Erzeugung eines solchen Genclusters für die TREX-Anwendung die Gene so assembliert werden, dass frühe, unkritische Biosyntheseschritte durch Ansteuerung des einen Promotors aktiviert werden und die späteren, zu toxischen Produkten führenden Schritte erst durch Ansteuerung des zweiten Promotors kontrolliert eingeleitet werden (siehe auch I.7).

In Reaktion auf unterschiedliche Reize nutzen Bakterien natürlicherweise verschiedenste Aktivierungs- und Repressions-Mechanismen zur Kontrolle von Genexpression, die für eine Weiterentwicklung des TREX-Systems adaptiert werden könnten. Einen besonders interessanten Reiz für die Kontrolle von Genexpression stellt Licht dar. Die Regulation von Genexpression durch Licht ist in der Natur weit verbreitet. Es sind verschiedene Photorezeptor-Systeme bekannt, die unterschiedliche Lichtqualität und -quantität detektieren. In den letzten Jahren entwickelte sich das Gebiet der sogenannten *optogenetics* rasch und es wurden mehrere rekombinante Systeme erstellt, die eine gezielte Regulation von

Genexpression durch Licht ermöglichen (siehe I.7.1). Da Licht eine nicht-invasive und gleichzeitig vielschichtig regelbare Induktionsquelle darstellt, bietet sich hier eine elegante Möglichkeit der gezielten Steuerung einzelner Promotoren innerhalb eines Systems. So wäre durch individuelle Licht-Regulation eine zeitlich getrennte Expression von den T7-Promotoren im TREX-System denkbar.

Außerdem erlaubt die Möglichkeit der nicht-invasiven, differentiellen Regulation von Genexpression durch Licht prinzipiell die Etablierung komplexer synthetischer Expressions-Netzwerke. Dies ist grundsätzlich im Sinne der Erforschung Licht-regulierter Systeme reizvoll und weiterhin im Hinblick auf die Entwicklung neuer Expressionssysteme unabhängig vom TREX-System von Interesse.

III.6.1 Etablierung eines geeigneten Systems für Licht-regulierte Genexpression in *E. coli*

Die meisten natürlich vorkommenden Regulationssysteme zeigen nicht absolute An- und Aus-Zustände, sondern vielmehr die Verschiebung eines Gleichgewichts in die eine oder andere Richtung (Eldar & Elowitz, 2010). Ein solches Phänomen wird auch für das im Folgenden untersuchte Photorezeptor-System erwartet. Die von jenem Photorezeptor abhängige Genexpression soll *in vivo* in einem *E. coli*-T7-Expressionssystem untersucht werden, das in seiner natürlichen Form selbst ein hohes Hintergrund-Rauschen aufweist und so die Detektion einer Licht-induzierten Veränderung erschweren könnte. Es wurde deshalb zunächst ein angemessen robustes Testsystem etabliert, das in sich definierte Zustände aufweist und damit die Untersuchung der Licht-regulierten Expression eines Zielgens erlaubt. Im Rahmen der während dieser Doktorarbeit betreuten Bachelorarbeit von Dennis Binder wurden verschiedene *E. coli*-Stämme als potentielle Wirtskandidaten für solche Experimente evaluiert. Es wurden die *E. coli*-Stämme BL21(DE3), Tuner(DE3) und JM109(DE3) untersucht, die alle das T7RP-Gen unter Kontrolle des *lac*-Promotors P_{lacUV5} im Genom tragen, sich aber genetisch in Bezug auf die Komponenten des *lac*-Netzwerkes unterscheiden. Die von den Herstellern angegebenen genotypischen Unterschiede sind in **Tabelle III-3** zusammengefasst.

Tab. III-3: Relevante Eigenschaften für *lac*-abhängige, T7RP-vermittelte Genexpression in *E. coli*

Anzahl • zeigt die in der Zelle vorhandenen Kopien des jeweiligen Gens an.

Stamm	<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>	<i>lacI</i>	Firma
BL21(DE3)	•	•	••	Novagen
Tuner(DE3)	-	-	••	Novagen
JM109(DE3)	•	-	•••	Promega

Die Genprodukte des Operons *lacZYA* sind in den Laktosemetabolismus involviert, während *lacI* den Repressor für die P_{lac} -abhängige Expression von *lacZYA* kodiert. Das Gen *lacZ* kodiert für die

β -Galaktosidase; *lacY* kodiert die Laktose-Permease, die Induktor in die Zelle transportiert und damit einen positiven *feedback loop* bei Induktor-Anwesenheit hervorruft; *lacA* kodiert die Galaktosid-Acetyltransferase.

Aufgrund der unterschiedlichen Genotypen müssen die Stämme verschiedene Expressionseigenschaften bei *lac*-abhängiger, T7RP-vermittelter Genexpression aufweisen. Diese Unterschiede wurden in Expressionsstudien charakterisiert. Als Reporter wurde das *yellow fluorescence protein* (YFP) ausgewählt, weil dessen Fluoreszenz als Maß für die Expressionsstärke bereits *in vivo* zu detektieren ist. Es wurde der *low copy* Vektor pRhotHi-2-YFP verwendet, der das *yfp*-Gen unter Kontrolle eines T7-Promotors trägt. Als Kontrolle dienen die jeweiligen Stämme mit pRhotHi-2 Leervektor. Die Kultivierung wurde wie in II.6.4 beschrieben durchgeführt. Bei einer Zelldichte von etwa $OD_{580\text{ nm}} = 0,5$ wurde die Expression der T7RP durch Zugabe verschiedener Mengen IPTG induziert. Nach 3,5 Stunden wurden die *in vivo* Fluoreszenz (II.12) (**Abb. III-19 A**) sowie die Proteinakkumulation (II.9.2) (**Abb. III-19 B**) bestimmt.

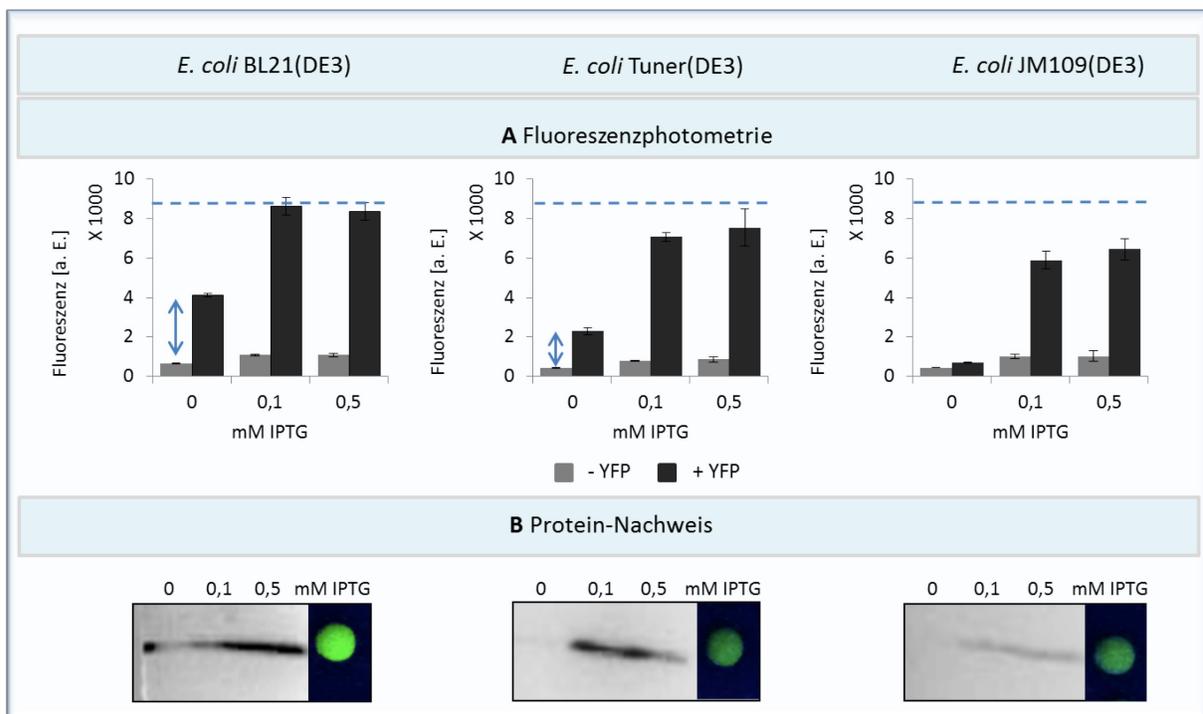


Abb. III-19: Expressionsprofile von *E. coli* BL21(DE3), Tuner(DE3) und JM109(DE3)

A Die Bestimmung der *in vivo* Fluoreszenz erfolgte 3,5 h nach Induktion und wurde auf eine Zelldichte von $OD_{580\text{ nm}} = 1$ normiert. - YFP = pRhotHi-2 Leervektor, + YFP = pRhotHi-2-YFP. Die blaue gestrichelte Linie deutet die maximale, in BL21(DE3) erreichte Fluoreszenz an. Die blauen Doppelpfeile verdeutlichen den Grad der Dichtigkeit der verschiedenen Systeme in Abwesenheit von Induktor. **B** Nachweis von YFP_{His6} durch *Western Blot*. Die Fluoreszenz ganzer Zellen unter Anregung bei 365 nm nach Induktion mit 0,1 mM IPTG ist jeweils dargestellt.

Nach Dennis Binder, Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2011).

Besonders in Bezug auf die absolute Expressionsstärke bei bestimmten Induktor-Konzentrationen und auf die Dichtigkeit des Systems in Abwesenheit von Induktor unterscheiden sich die Stämme deutlich.

E. coli BL21(DE3) ist gekennzeichnet durch hohe Expression mit Induktor und dabei geringe Dichtigkeit ohne Induktor, die sich in relativ stark gegenüber der Hintergrund-Fluoreszenz der Leervektor-Kontrolle erhöhter Fluoreszenz zeigt (**Abb. III-19 A** Doppelpfeil). In *E. coli* JM109(DE3) dagegen werden mit Induktor nicht die absoluten Fluoreszenzwerte wie in *E. coli* BL21(DE3) (**Abb. III-19 A** gestrichelte Linie) erreicht, während das System ohne Induktor nahezu vollständig dicht scheint. Die Ergebnisse können im immunologischen Protein-Nachweis nachvollzogen werden (**Abb. III-19 B**). *E. coli* Tuner(DE3) stellt sowohl in Bezug auf die Dichtigkeit, als auch auf die Maximal-Expression ein Intermediat dar.

Aufgrund der strikten Kontrolle über die Reporter-Expression, die JM109(DE3) ermöglicht, scheint dieser *E. coli*-Stamm besonders geeignet für die Untersuchung von Licht-regulierter Expression eines Zielgens. Die beobachtete Dichtigkeit der Reporter-Expression ohne Induktor ist auf einen zusätzlich auf einem F-Plasmid kodierten *lac*-Repressor zurückzuführen (**Tab. III-3**).

Daher wurde im nächsten Schritt überprüft, ob das Expressionsprofil von *E. coli* JM109(DE3) in Tuner(DE3) durch Einbringen einer zusätzlichen Kopie von *lacI* hergestellt werden kann. Dazu wurde ein Expressionsvektor analog zu pRhoHi-2-YFP konstruiert, der zusätzlich das Repressor-Gen *lacI* trägt. *E. coli* Tuner(DE3) wurde mit diesem als pRcExpII-2-YFP bezeichneten Konstrukt (Binder, 2011) transformiert. Als Kontrolle diente der Stamm mit pRcExpII-2 Leervektor. Die Kultivierung wurde wie in II.6.4 beschrieben durchgeführt. Nach Induktion mit unterschiedlichen Konzentrationen IPTG wurde die *in vivo* Fluoreszenz bestimmt (**Abb. III-20**).

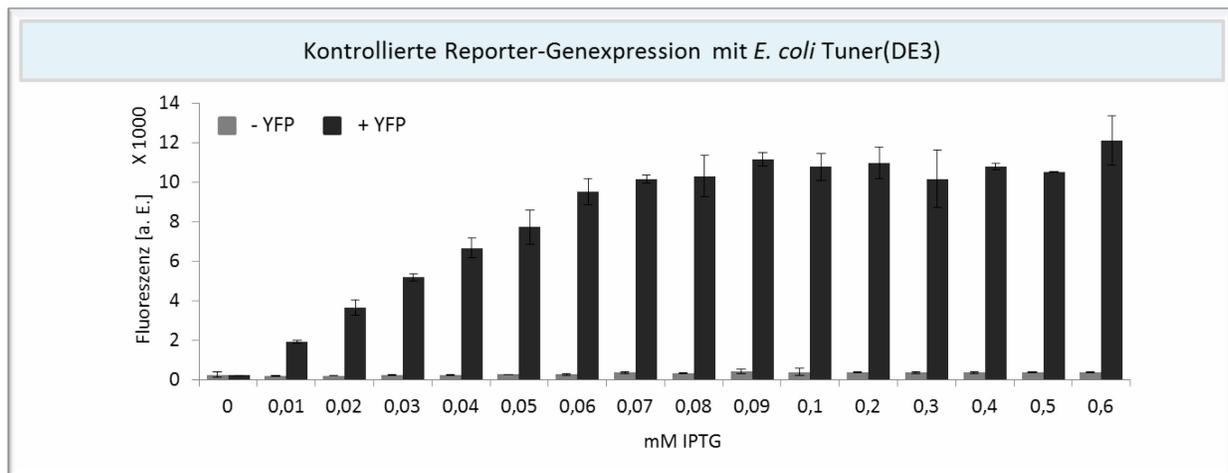


Abb. III-20: Expressionsprofil von *E. coli* Tuner(DE3) mit *lacI*-tragendem Expressionsvektor

Die Bestimmung der *in vivo* Fluoreszenz erfolgte 3,5 h nach Induktion und wurde auf eine Zelldichte von $OD_{580\text{ nm}} = 1$ normiert. - YFP = pRcExpII-2 Leervektor, + YFP = pRcExpII-2-YFP.

Nach Dennis Binder, Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2011).

Durch zusätzliche Expression von auf dem Expressionsvektor kodiertem Repressor konnte das System in Abwesenheit von Induktor auf vollständige Dichtigkeit eingestellt werden (**Abb. III-20**). Außerdem ist eine

graduell mit der Induktor-Konzentration steigende Expressionsantwort zu messen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass kein Induktor-Transporter vorhanden ist (siehe **Tab. III-3**, *lacY*) und somit kein positiver *feedback loop* zustande kommt.

Es konnte also ein geeignetes, robustes Testsystem etabliert werden, das eine definiert kontrollierbare Expressionsantwort aufweist und damit die Detektion einer Licht-abhängigen Veränderung eines Photorezeptor-Systems erlaubt.

Neben Photorezeptor-Systemen werden derzeit *photocaged* Biokomponenten wie z. B. *photocaged* IPTG entwickelt (siehe I.7.1). Das etablierte System kann aufgrund der vollständigen Dichtheit und der graduellen Induktionsantwort verwendet werden, um den Grad der Freisetzung eines solchen *photocaged* Induktors zu bestimmen. *E. coli* Tuner(DE3) bietet weiterhin den Vorteil, dass hier *lacZ* vollständig deletiert ist und somit die β -Galaktosidase als Reporter für die Untersuchung von Licht-regulierter Genexpression verwendet werden kann. Deren Expression kann sofort hervorragend quantifiziert werden, während die YFP-Fluoreszenz zeitverzögert nach O₂-abhängiger Reifung (Zimmer, 2002) zu detektieren ist.

III.6.2 Untersuchung von Licht-regulierter Genexpression in *E. coli*

Um eine Möglichkeit der Licht-regulierten Genexpression in *E. coli* zu untersuchen, wurde ein artifizielles Zwei-Komponenten-System nach Möglich *et al.* (2009) in das mit Tuner(DE3) etablierte Testsystem integriert. Die Licht-Regulation der Genexpression in diesem System beruht auf dem chimären Photorezeptor YF1, der aus einer Blaulicht-Sensor-Domäne der LOV-Familie (*light oxygen voltage*) und einer Histidin-Kinase besteht (siehe I.7.1). Bei Dunkelheit kann die Kinase eine Autophosphorylierung vollziehen und darauf wiederum den *response regulator* FixJ durch Phosphorylierung aktivieren. Dieser kann in diesem Zustand den Promotor P_{fixK2} aktivieren. Blaulicht reprimiert diese Prozesse (siehe auch I.7.1, **Abb. 1-10**). Als Reporter gen wurde *lacZ* gewählt.

Um das Zwei-Komponenten-System zusammen mit dem Reporter gen *lacZ* in das mit *E. coli* Tuner(DE3) etablierte Testsystem zu integrieren, wurden alle benötigten Elemente auf einem Vektor kombiniert. Dazu wurden die Gene *yf1* und *fixJ* aus dem Vektor pET28c-YF1-FixJ (Möglich *et al.*, 2009) durch *NdeI/XhoI*-Restriktion isoliert und in den entsprechend linearisierten Vektor pRcExpII-2, der das *lac*-Repressor-Gen *lacI* trägt, eingebracht. Auf diese Weise liegt die Expression des Zwei-Komponenten-Systems unter Kontrolle des T7-Promotors des Vektors. Das Reporter gen *lacZ* wurde zusammen mit der P_{fixK2}-Promotor-Region mittels PCR vom Vektor pFKlac (Möglich *et al.*, 2009) als Template amplifiziert, wobei *Sites* für *NheI* beidseits durch die Primer angehängt wurden. So konnte das Gen in die *NheI*-Site

des Konstrukts eingebracht werden, sodass der Vektor pRcExpII-2-YF1-FixJ-P_{fixK2}-LacZ erzeugt wurde (Abb. III-21).

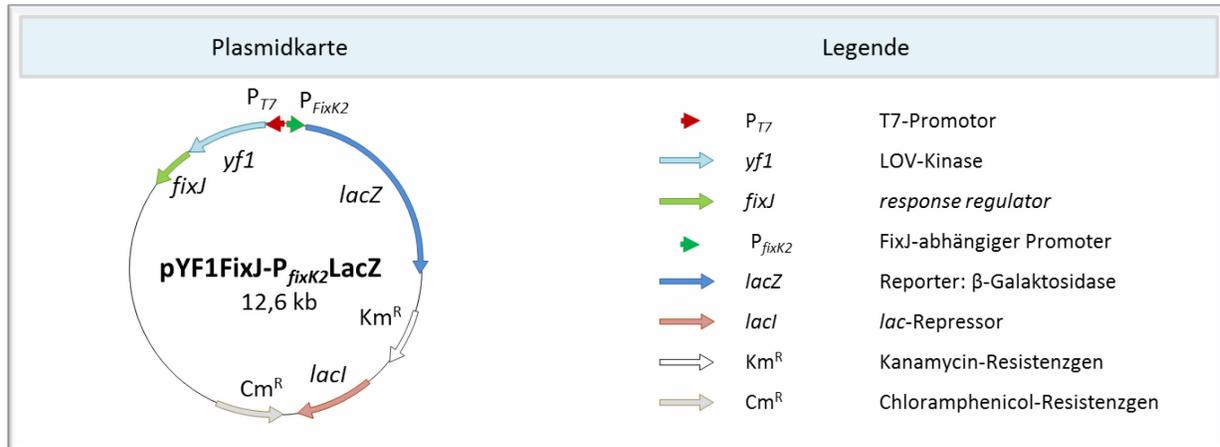


Abb. III-21: Vektor pRcExpII-2-YF1-FixJ-P_{fixK2}-LacZ für Licht-abhängige Genexpression

Der Vektor pRcExpII-2-YF1-FixJ-P_{fixK2}-LacZ enthält alle Gene für die Licht-abhängige Expression der β-Galaktosidase (*lacZ*) als Reporter. Die Gene für die LOV-Kinase YF1 und den *response regulator* FixJ werden durch die T7RP vom Promotor P_{T7} exprimiert. Im Dunkeln erfolgt die Autophosphorylierung von YF1, woraufhin die Kinase wiederum FixJ phosphorylieren kann. Der so aktivierte *response regulator* kann schließlich die Expression von *lacZ* durch Aktivierung des Promotors P_{fixK2} bewirken. Siehe auch I.7.1, Abb. I-10.

Nach Dennis Binder, Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2011).

In Expressionsstudien wurde die Licht-abhängige Expression der β-Galaktosidase in *E. coli* Tuner(DE3) mit pRcExpII-2-YF1-FixJ-P_{fixK2}-LacZ untersucht. Die Kultivierung wurde wie in II.6.5 beschrieben im Dunkeln bzw. unter Blaulicht durchgeführt, um den Effekt der Blaulicht-regulierten Kinase-Aktivität von YF1 auf den FixJ-abhängig exprimierten Reporter zu untersuchen. Bei einer Zelldichte entsprechend einer OD_{580 nm} = 0,5 wurde die Expression des Zwei-Komponenten-Systems durch Zugabe von 0,04 mM IPTG induziert. Als Kontrolle wurden nicht induzierte Kulturen verwendet. Nach drei Stunden Expression wurde die β-Galaktosidase-Aktivität bestimmt (II.13) und die Akkumulation von YF1 immunologisch nachgewiesen (II.9.2) (Abb. III-22).

Bei Proben von dunkel inkubierten Kulturen ist im Vergleich zu solchen von beleuchteten eine signifikant gesteigerte β-Galaktosidase-Aktivität um einen Faktor von 1,6 zu messen. Die bei beleuchteten Kulturen gemessene Aktivität entspricht der in uninduzierten Kulturen, die mit und ohne Beleuchtung gleichermaßen Aktivität zeigen. Der immunologische Nachweis von YF1 bestätigt, dass die *lac*-abhängige, T7RP-vermittelte Expression des Zwei-Komponenten-Systems erwartungsgemäß ausschließlich durch IPTG-Zugabe induziert wird. Die starke Hintergrund-Aktivität (Abb. III-22, blau hinterlegter Bereich) kann somit auf den Promotor P_{fixK2} zurückgeführt werden, der offenbar unabhängig von YF1/FixJ Aktivität zeigt. Möglich *et al.* (2009) beschrieben wesentlich geringere P_{fixK2}-abhängige Hintergrundaktivitäten, als

die hier beobachteten, sodass eine Optimierung dieses Aspekts durch Änderung des experimentellen *Set-ups* möglich scheint.

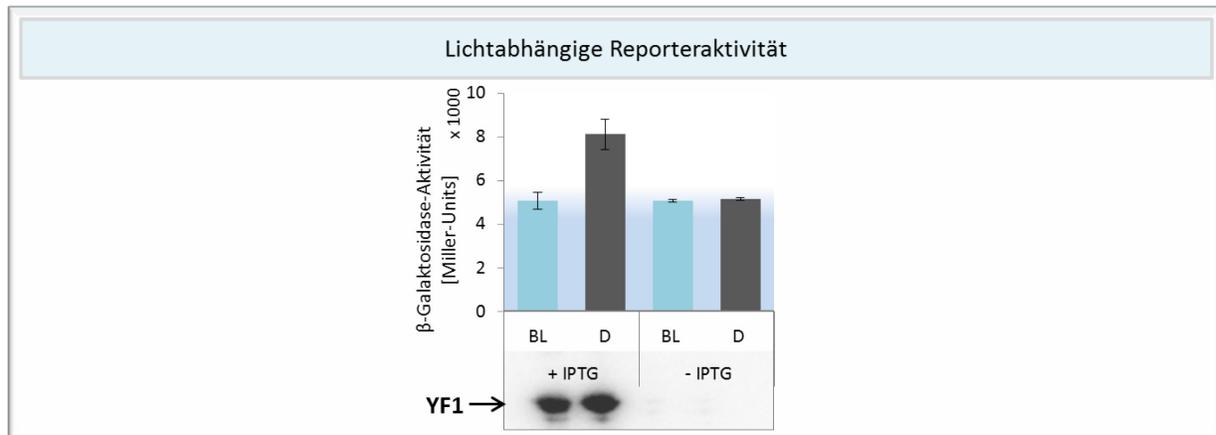


Abb. III-22: Durch ein Zwei-Komponenten-System Licht-abhängig gesteuerte Reporteraktivität

Zellkulturen von Tuner(DE3) mit pRcExpII-2-YF1-FixJ-P_{fixK2}-LacZ wurden im Dunkeln bzw. unter Blaulicht inkubiert. Die Aktivität der β-Galaktosidase wurde drei Stunden nach Induktion bestimmt. Die Akkumulation des artifizierten Photorezeptors YF1 wurde unter Verwendung von YtvA-Antikörpern immunologisch nachgewiesen. + IPTG = 0,04 mM, BL = Blaulicht, D = Dunkel.

Es konnte das mit Tuner(DE3) und einem Expressionsvektor mit zusätzlichem *lac*-Repressor-Gen etablierte Testsystem (III.6.1) erfolgreich eingesetzt werden, um die durch Verwendung eines Photorezeptor-Systems erreichte Licht-Abhängigkeit der Expression des Reportergens *lacZ* nachzuweisen.

Die hier demonstrierte Licht-abhängige Regulation von Genexpression könnte eine Komponente in einem komplexeren Expressionssystem darstellen, das weitere Möglichkeiten der Photoperzeption mit anderen Licht-Farben oder auch *photocaged* Biokomponenten nutzt.

Zusammenfassend konnten bei der Untersuchung von Licht-regulierter Genexpression in *E. coli* die folgenden Feststellungen gemacht werden:

1. Es konnte ein strikt kontrollierbares Testsystem, bestehend in *E. coli* Tuner(DE3) mit einem Expressionsvektor mit zusätzlichem *lac*-Repressor-Gen, etabliert werden.
2. Innerhalb dieses Systems wurde die YF1/FixJ-basierte Licht-Abhängigkeit der Expression des Reporters *lacZ* gezeigt.

IV DISKUSSION

Um den Zugang zu wertvollen mikrobiellen Naturstoffen zu verbessern, wurde das TREX (*transfer and expression*)-System entwickelt, das den Transfer von unmanipulierten Biosynthese-Genclustern in bakterielle Expressionswirte vereinfachen sowie die vollständige heterologe Expression aller Biosynthesegene ermöglichen soll. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das TREX-Verfahren evaluiert. Dabei standen besonders die Fragen nach der Effizienz des bidirektionalen Expressionsmodus des TREX-Verfahrens sowie der Anwendbarkeit des Systems in einem weiten Wirtsbereich im Vordergrund. Um dies zu untersuchen, wurde das Carotinoidbiosynthese-Gencluster aus *Pantoea ananatis* mittels TREX in *Pseudomonas putida*, *Rhodobacter capsulatus* und *Escherichia coli* zur Expression gebracht. Im Folgenden werden zunächst die einzelnen Schritte des TREX-Vorgehens beschrieben und hinsichtlich Aufwand und Erfolg in Bezug auf die hier behandelte *crt*-Genexpression sowie in Bezug auf die grundsätzliche Verwendbarkeit des Systems beurteilt. Dabei werden aktuelle *tools* der synthetischen Biologie vorgestellt, die in Kombination mit TREX mikrobielle Naturstoff-Synthese ermöglichen oder vereinfachen. Außerdem werden die Limitierungen der TREX-Anwendung zusammengefasst. Weiterhin werden die mittels TREX erzielten Carotinoid-Ausbeuten mit denen anderer Arbeiten auf diesem Gebiet verglichen. Schließlich werden zukünftige Perspektiven im Gebiet der Naturstoff-Erschließung aufgezeigt.

IV.1 EVALUATION DER TREX-ANWENDUNG

Die TREX-Anwendung funktioniert in vier aufeinanderfolgenden Schritten (**Abb. I-5**). Zunächst muss ein isoliertes Gencluster mit den TREX-Kassetten (I.5.1, **Abb. I-6**) markiert werden. Auf diese Weise werden alle für die folgenden Schritte notwendigen genetischen Elemente in direkte Nähe des Genclusters gebracht. Im zweiten Schritt kann nun das Konstrukt durch Konjugation in einen heterologen bakteriellen Expressionswirt transferiert werden (I.5.2). Im dritten Schritt inseriert dort das Gencluster zusammen mit bestimmten TREX-Elementen durch Transposition in das bakterielle Chromosom (I.5.3). Im vierten Schritt kann das Gencluster vollständig durch die T7 RNA Polymerase (T7RP) exprimiert werden (I.5.4). In Abhängigkeit von den physiologischen Eigenschaften des jeweiligen Wirtes sowie von den Ansprüchen, den die jeweilig kodierte Biosynthese an den Wirt stellt, kann so der im Gencluster kodierte Biosyntheseweg in verschiedenen Wirten aktiviert werden.

IV.1.1 Markierung des *crt*-Genclusters

Um einen Biosyntheseweg für TREX zu aktivieren, muss zunächst die Markierung des Genclusters durch die TREX-Kassetten erfolgen (I.5.1). Das Carotinoidbiosynthese-Gencluster aus *P. ananatis* wurde hier mittels klassischer Klonierung durch enzymatische Restriktion und Ligation mit den TREX-Kassetten markiert. Ein solches Verfahren war in diesem Fall aufgrund der relativ kleinen Größe (6,9 kb) des Genclusters und der günstigen Lage singulärer Schnittstellen unproblematisch umzusetzen. Es wurden mehrere *crt*-TREX-Konstrukte erzeugt, die unterschiedliche Varianten des *crt*-Genclusters für die Synthese verschiedener Carotinoide tragen und sich außerdem hinsichtlich des Replikationsursprungs unterscheiden, so dass sie in allen verwendeten Wirten als *suicide* Vektoren eingesetzt werden konnten (III.2.1, III.2.8, III.4.1; Loeschcke, 2008).

Bei größeren Genclustern ist diese Vorgehensweise häufig nicht möglich, da sich bei zufälliger Basenverteilung eine 6 bp-Schnittstelle statistisch bereits nach 4096 bp wiederholt und demnach häufig keine singulären Schnittstellen zur Verfügung stehen. Das TREX-System selbst stellt keine Lösung für die Klonierungsarbeiten, die notwendig sind, um ein Gencluster zu isolieren und mit den TREX-Kassetten zu markieren. Allerdings stehen mittlerweile verschiedene Klonierungstechniken zur Verfügung, die auf den Gebrauch von Restriktionsendonukleasen verzichten. Dabei handelt es sich um PCR-basierte oder Rekombinase-basierte Methoden.

Die PCR-basierten Methoden funktionieren grundsätzlich nach folgendem Prinzip: Zunächst werden mittels PCR Vektor- und Insert-Fragmente amplifiziert. Dabei werden Primer verwendet, die spätere 6-12 bp lange, komplementäre Überhänge beinhalten. Im folgenden Schritt werden mit

unterschiedlichen Methoden Basen am 5' oder 3'-Ende der erzeugten Fragmente entfernt, um einzelsträngige Überhänge zu generieren. Da die Überhänge der Fragmente komplementär zueinander sind, können diese hybridisieren und nach Transformation in *E. coli* zu vollständigen Plasmiden repariert werden. Die sogenannte LIC (*ligation independent cloning*)-PCR-Methode (Aslanidis & de Jong, 1990) nutzt dabei die 3'→5'-Exonukleaseaktivität der T4-Polymerase. Die durch PCR erzeugten Fragmente werden mit T4-Polymerase in Anwesenheit eines Nukleotid-Triphosphats inkubiert. Die Polymerase entfernt dabei am 3'-Ende Basen, bis das im Reaktionsansatz vorhandene Nukleotid erreicht ist. Hier heben sich 3'→5'-Exonuklease- und 5'→3'-Polymerase-Aktivität auf. So können durch Wahl entsprechender Primer-Sequenzen gezielt 6-12 bp-Überhänge des 5'-Endes generiert werden. Beim sogenannten PLICing (*phosphorothioate-based ligase-independent cloning*) nach Blanus *et al.* (2010) (**Abb. IV-1**) werden in der PCR Primer mit Phosphorothioat-haltigen Nukleotiden am 5'-Ende eingesetzt. Diese können nach erfolgter PCR chemisch abgespalten werden, um 3'-Überhänge zu erzeugen. Kuzuya *et al.* (2011) stellten außerdem die LACE (*light-assisted cohesive-ending*)-PCR vor. Hier werden Primer verwendet, die ein Nukleotid enthalten, das eine photolabile Schutzgruppe trägt (*caged nucleotide*). Während der PCR fungiert dieses Nukleotid als Terminator der Elongation. Nach erfolgter PCR kann die Schutzgruppe durch UVA-Beleuchtung entfernt werden, wodurch PCR-Produkte mit freien 5'-Überhängen entstehen.

Diese Methoden funktionieren mit großer Effizienz für die Klonierung einzelner Gene. Die Klonierung großer Fragmente und damit die Eignung der Methode für die Assemblierung großer Gencluster und Markierung solcher mit den TREC-Kassetten ist noch nicht beschrieben.

Für Rekombinase-basierte Methoden konnte dies bereits gezeigt werden. Das sogenannte *Recombineering* ermöglicht grundsätzlich die *in vivo* Kombination von DNA-Fragmenten, die zueinander homologe Bereiche von 30-500 bp enthalten (Ma *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1998; Gibson, 2009; Fu *et al.*, 2012). Dazu werden in *E. coli* Rekombinasen des P1-, Rac- oder λ -Phagen genutzt oder Hefen verwendet, die über ein effizientes Rekombinationssystem verfügen. Fu *et al.* (2008, 2012) konnten zeigen, dass mithilfe von Phagen-Rekombinasen Gencluster bis > 50 kb in einem oder mehreren Schritten in ein Plasmid eingebracht werden können. Dabei können sowohl lineare mit linearen DNA-Fragmenten, als auch lineare Fragmente mit zirkulären Elementen rekombiniert werden. Die Rekombinasen können dabei beispielsweise von einem Temperatur-sensitiven Plasmid exprimiert werden, sodass nach erfolgter Rekombination dieses Plasmid durch Temperatur-*shift* entfernt werden kann. Fu *et al.* (2012) nutzten die linear-lineare Rekombination, um Gencluster direkt aus Restriktionsendonuklease-verdauter genomische DNA zu ‚fischen‘ (**Abb. IV-1**). Dazu wurde ein Plasmid PCR-amplifiziert, wobei mit den Primern zur genomischen Zielsequenz homologe Bereiche angefügt wurden, sodass die genomische DNA in das

Plasmid rekombiniert werden konnte. Auf diese Weise kann auf die Erzeugung von umfangreichen Genom-Bibliotheken, die einzelne Fragmente genomischer DNA auf Vektoren enthalten, verzichtet und direkt mit komplexen DNA-Gemischen gearbeitet werden.

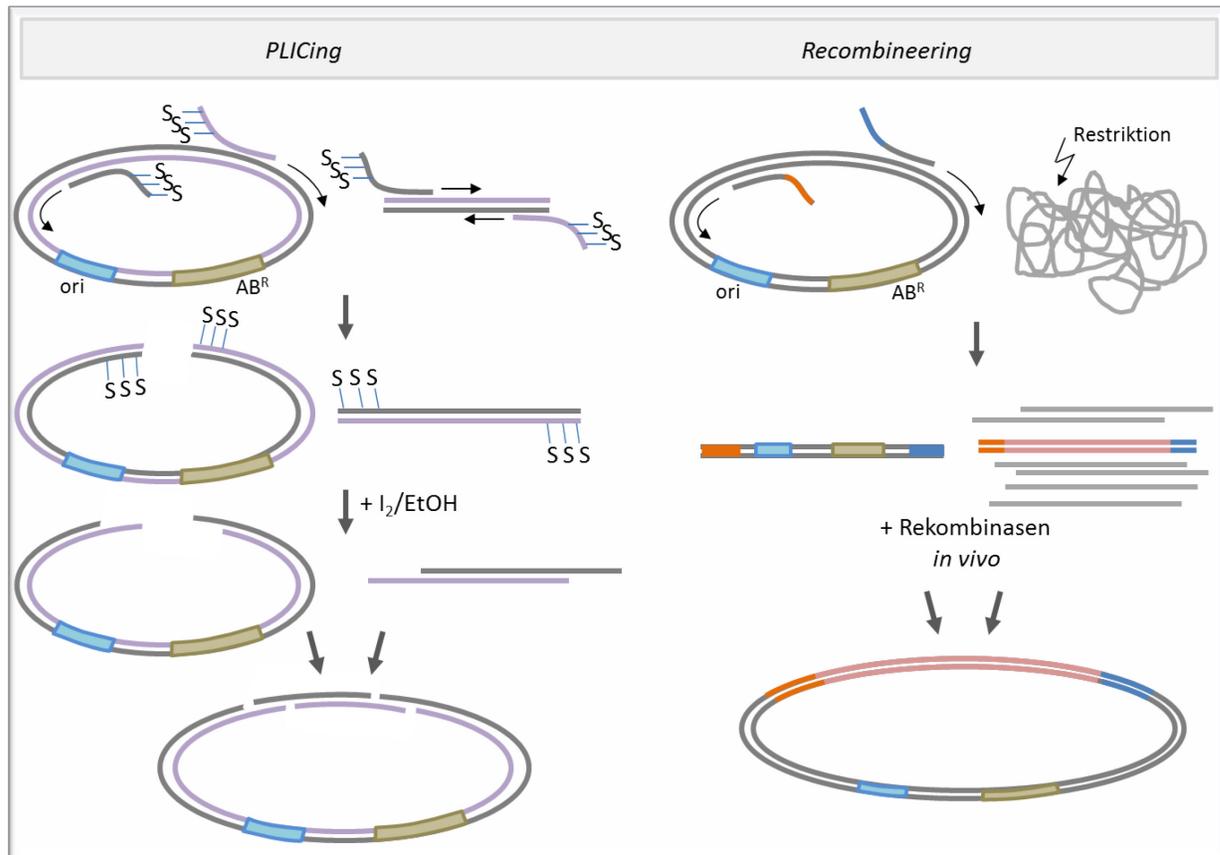


Abb. IV-1: Restriktionsendonuklease-unabhängige Klonierungsmethoden

Das von Blanus *et al.* (2010) vorgestellte PLICing beginnt mit der PCR-Amplifizierung von Vektor und Insert mit phosphorothioylierten Nucleotiden in den Primern (durch –S markiert). Nach der PCR können von den Produkten die Schwefel-haltigen Nucleotide chemisch abgespalten werden, wodurch Überhänge entstehen, die hybridisieren können. Damit wird *E. coli* anschließend transformiert, wo die Fragmente zu einem intakten Plasmid repariert werden. Fu *et al.* (2012) zeigten eine Anwendungsvariante des *Recombineering*, die mit einer PCR des Vektors, bei der homologe Bereiche zu einer bekannter Zielsequenz angefügt werden, sowie dem Verdau genomischer DNA durch Restriktionsendonukleasen beginnt. Die Fragmente genomischer DNA und der Vektor werden in *E. coli* transformiert und durch Rekombinasen zu einem Plasmid zusammengefügt. *ori* = *origin of replication*, *AB^R* = Antibiotikum-Resistenzgen.

Die beschriebenen Methoden können die Klonierung großer DNA-Fragmente in effizienter Weise umsetzen und tragen so maßgeblich zur Verbesserung des Zugangs zu wertvollen Naturstoffen bei.

IV.1.2 (Konjugativer) Transfer des *crt*-TREX-Konstruktes zu Expressionswirten

Der Transfer von Vektoren mit TREX-markierten Genclustern zu heterologen bakteriellen Wirten kann durch gängige Transformationsmethoden wie chemische Transformation oder Elektroporation sowie auch durch Konjugation erreicht werden (I.5.2). Um die Carotinoid-Biosynthesegene aus *P. ananatis* in

den gewählten heterologen Wirten zu etablieren, wurden *crt*-TREG-Konstrukte durch Konjugation in *P. putida* und *R. capsulatus* transferiert, während *E. coli* chemisch transformiert wurde (III.1, **Abb. III-1**). Die Konjugation erlaubt den Transfer großer DNA-Moleküle in Gram-negative Bakterien mit hoher Effizienz (Brigulla & Wackernagel, 2010). Sie ist weiterhin eine natürliche Methode des DNA-Transfers und infolgedessen Wirt-schonend. Allerdings ist die Konjugation ein zeitintensiveres Verfahren als beispielsweise die Elektroporation (siehe auch I.4.2.1). Mithilfe des hier eingesetzten Prinzips des oriT-abhängigen Transfers von Plasmiden von *E. coli* S17-1 aus zum Rezipienten konnten auch manche Gram-positive Bakterienstämme erreicht werden (Teng *et al.*, 1998). Somit kann ein breites Wirtsspektrum abgedeckt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten auf diese Weise zuverlässig DNA-Konstrukte transferiert werden. Da auf die Konjugation die Transposition folgt und somit die Effizienz nur in Kombination beurteilt werden kann, wird die Effizienz des Transfers unter IV.1.3 besprochen.

IV.1.3 Transposition des rekombinanten *crt*-TREG-Transposon in das Wirtschromosom

Nach Transfer der Gene in den heterologen Wirt inseriert dort durch Wirkung von Elementen des Transposon Tn5 das Gencluster zusammen mit dem Großteil der TREG-Kassetten in das bakterielle Chromosom (I.5.3). Für die synthetische Biologie gewinnt die chromosomale Integration grundsätzlich an Bedeutung, da sie gegenüber Plasmid-basierten Methoden Vorteile hinsichtlich Reduktion von metabolischem Stress sowie Verbesserung von Gen-Stabilität und in manchen Fällen auch der Ausbeute an Genprodukt aufweist (Striedner *et al.*, 2010; Tyo *et al.*, 2009; siehe auch I.4.2.2). Das Transposon Tn5 hat eine geringe Sequenz-Spezifität. Es integriert präferentiell in Stellen mit 9 bp, die eine bestimmte Basenzusammensetzung aufweisen (Schulz & Reznikoff, 1991; Shevchenko *et al.*, 2002). Somit kann mittels TREG ein Biosynthese-Gencluster in verschiedensten Wirten an zufälligen Stellen im Genom inseriert werden. Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich im jeweiligen Wirt nicht-replizierende *suicide crt*-TREG-Konstrukte transferiert wurden, konnte nach dem Transfer der Konstrukte direkt auf Transpositions-Mutanten selektiert werden. Diese wurden mit Häufigkeiten von etwa 10^{-5} bis 10^{-6} (*P. putida*) bzw. 10^{-6} bis 10^{-8} (*R. capsulatus*) pro eingesetzter Rezipientenzelle erhalten. Dies liegt in der Größenordnung nahe der von Naumann & Reznikoff (2002) bestimmten Transpositionsrate des ursprünglichen Tn5-Transposon ($6,5 \times 10^{-5}$). Dies zeigt, dass die Größen-Differenz des hier verwendeten rekombinanten Transposon (13,5 kb) zum natürlichen Tn5 (5,8 kb) keinen relevanten Einfluss auf die Effizienz der Transposition hat. Die unterschiedliche Effizienz, mit der Transpositions-Mutanten von *P. putida* bzw. von *R. capsulatus* erhalten werden, geht vermutlich auf die unterschiedliche Effizienz der

Konjugation zurück. Diese liegt nach den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Erfahrungen mit *R. capsulatus* als Rezipient deutlich unter der mit *P. putida*.

Im Rahmen weiterer Arbeiten mit dem TREX-System wurde das Prodigiosin-Gencluster aus *Serratia marcescens* in *P. putida* transferiert und Transpositionsmutanten mit derselben Effizienz erhalten (Markert, 2008). In jenem Fall umfasste das rekombinante Transposon fast 30 kb. Außerdem zeigten Fu *et al.* (2008) unter Verwendung eines *mariner*-Transposon die effiziente chromosomale Insertion eines fast 60 kb umfassenden rekombinanten Transposon. Dieses funktioniert ebenfalls nach dem *cut and paste*-Mechanismus. Möglicherweise können Gencluster bis >100 kb auf diese Weise in einem heterologen Wirt etabliert werden.

Nach erfolgter Transposition weist das Transposon Tn5 eine hohe Stabilität auf (de Lorenzo *et al.*, 1990; Herrero *et al.*, 1990; Reznikoff, 2008). Dies ist auf mehrere komplexe Regulationsmechanismen, die die Transpositionshäufigkeit *down*-regulieren, zurückzuführen. **Abbildung IV-2** zeigt den Aufbau des Transposon Tn5.

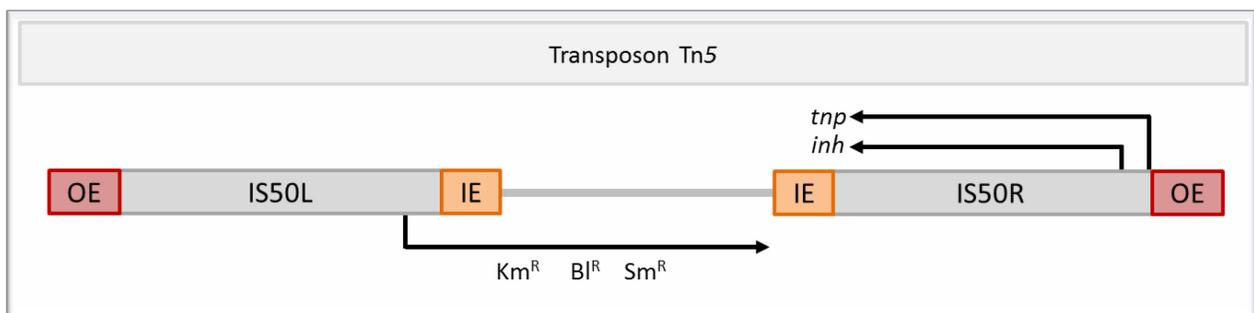


Abb. IV-2: Schematische Darstellung der Struktur des Transposon Tn5

Das Transposon besteht aus zwei nahezu identischen, spiegelverkehrten Bereichen (IS50L, IS50R = *left/right insertion sequence*), die durch die IE- (*inside end*) und OE- (*outside end*) Sequenzen begrenzt sind und mehrere Resistenzgene umschließen. Inwärts orientiert werden sowohl die Transposase (*tnp*), als auch der zugehörige Inhibitor (*inh*) in IS50R kodiert, während in IS50L keine funktionalen Proteine kodiert sind. Km^R = Kanamycin-Resistenzgen, Bl^R = Bleomycin-Resistenzgen, Sm^R = Streptomycin-Resistenzgen. Nach Reznikoff (2008).

Innerhalb des *open reading frame* des Transposase-Gens (*tnp*) wird ein Inhibitor (*inh*) kodiert. Vermutlich wird so die *tnp*-Transkription beeinträchtigt, weil die Promotoren der beiden Gene überlappen und die Polymerase-Bindestellen nur kompetitiv besetzt werden können. Der exprimierte Inhibitor beeinträchtigt weiterhin die effektive Ausführung eines Transpositionsereignisses. Zudem wird eine effektive Expression der Transposase durch *read-through*-Transkription von außerhalb des Transposons durch Sequenzen verhindert, die Sekundärstrukturen in der mRNA ausbilden, welche eine *tnp*-Translation von einem solchen Transkript verhindern, gleichzeitig aber eine *inh*-Translation zulassen (Krebs & Reznikoff, 1986; Schulz & Reznikoff, 1991). Da dieses Transposon auf möglichst seltene Transpositionsereignisse

evolviert ist, wurde es extensiv für die Erstellung von Mutanten-Banken verwendet und konnte im Kontext solcher Fragestellungen stabile Insertionsmutanten erzeugen (Choi & Kim, 2009).

Im TREX-Ablauf geht bei der Transposition der nicht mehr benötigte *oriT* (*origin of transfer*) verloren, sodass eine Mobilisierung der chromosomalen DNA zur Konjugation ausgeschlossen werden kann. Auf diese Weise konnte eine hinreichende genetische Stabilität der in dieser Arbeit erzeugten Stämme sichergestellt werden.

Die Kombination von Konjugation und anschließender genomischer Integration durch Transposition wird die Methode der Wahl für die Transplantation von Biosynthese-Genclustern in heterologe Wirte zur Entdeckung und Charakterisierung bakterieller Naturstoffe sein, weil auf diese Weise große DNA-Fragmente zuverlässig transferiert und im Wirt etabliert werden können.

Bei der Untersuchung der *crt*-Transkriptlevel und des Carotinoid-Gehalts in *P. putida*-Stämmen mit *crt*-TREX-Transposons wurden an individuellen Insertionsorten deutliche Mengen-Unterschiede festgestellt. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Arbeiten mit *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* gemacht, wo die Transkriptlevel von in das Genom integrierten Genen in Abhängigkeit des spezifischen Insertionsortes deutlich variierten (Sousa *et al.*, 1997; Flagfeldt *et al.*, 2009). Möglicherweise spielen Effekte der lokalen Organisation der DNA in bestimmten Sekundärstrukturen eine Rolle für dieses Phänomen. Sousa *et al.* (1997) diskutierten außerdem die Nähe des Insertionsortes zum chromosomalen Replikationsursprung als Transkriptlevel-steigernd, weil es hier durch die Replikation zu einer vorübergehenden Steigerung der Anzahl der Genkopien im Verhältnis zu anderen Bereichen des Genoms kommt (Miller & Simons, 1993). Im hier beobachteten Fall konnte ein solcher Zusammenhang nicht festgestellt werden.

IV.1.4 Vollständige Expression des *crt*-Genclusters durch die T7 RNA Polymerase

Nach erfolgreicher Erzeugung TREX-manipulierter Expressionsstämme, können sämtliche Gene des transferierten Genclusters von den T7-Promotoren der TREX-Kassetten ausgehend durch die T7 RNA Polymerase (T7RP) exprimiert werden (I.5.4). Die T7RP wurde für diese Anwendung ausgewählt, weil sie bekanntermaßen besonders lange Transkripte mit großer Effizienz erzeugen kann und dabei bakterielle Transkriptionsterminatoren ignoriert (McAllister *et al.*, 1981; Iost *et al.*, 1992; Arvani *et al.*, 2012) (siehe I.4.2.3). Dabei wird die Transkription durch die T7RP ausschließlich am T7-Promotor initiiert (Dunn & Studier, 1983; Tabor & Richardson, 1985), so dass die Polymerase in verschiedenen bakteriellen Expressionswirten für die hochspezifische Expression gewünschter Zielgene eingesetzt werden kann. Die bidirektionale Transkription stellt die Schlüsselinnovation des TREX-Verfahrens dar, da so sämtliche Gene eines komplexen Genclusters unabhängig von ihrer Orientierung exprimiert werden können. Somit können natürliche Gencluster ohne weitere Manipulation eingesetzt werden. Die T7RP kann entweder

durch einen entsprechenden Expressionsstamm zur Verfügung gestellt werden oder auch auf einem Vektor wie den hier verwendeten pML5-P_{lac}T7 oder pML5-P_{fru}T7 in den Expressionswirt eingeführt werden. Außerdem wurde für eine schnelle Erzeugung neuer T7-Expressionsstämme ein T7-Expressionstransposon zur Integration des T7RP-Gens in Gram-negativen Bakterien konstruiert (Kang *et al.*, 2007).

IV.1.4.1 Wie effizient ist die bidirektionale Expression eines Genclusters durch die T7RP?

In dieser Arbeit wurde zunächst eine basale, T7RP-unabhängige Expression der *crt*-Gene aus *P. ananatis* in allen gewählten Expressionswirten beobachtet. Diese Situation ist nicht grundsätzlich zu erwarten, da heterologe Promotoren in einem Expressionswirt häufig nicht erkannt werden (Galm & Shen, 2006). Die T7RP konnte in *P. putida* und *R. capsulatus* auf geeigneten Vektoren durch Konjugation eingebracht und durch Induktion exprimiert werden. Im verwendeten *E. coli*-Stamm BL21(DE3) konnte sie direkt durch Induktion zur Expression gebracht werden. Es konnte eine durch die T7RP deutlich gesteigerte Expression der *crt*-Gene gezeigt werden. Dies wurde durch den qPCR-Nachweis des *sense*- und *antisense*-Transkripts aller Gene sowie durch den HPLC-Nachweis von Zeaxanthin, das nur durch Wirkung aller bidirektional kodierter Genprodukte gebildet werden kann, in *P. putida* belegt. So wurde die Anwendbarkeit des konzertiert bidirektionalen Transkriptionsmodus des TREX-Systems demonstriert. Ma & McAllister (2009) zeigten, dass eine T7 Polymerase und eine am selben Template bindende T3 Polymerase *in vitro* in der Lage sind, einander zu passieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass die T7 RNA Polymerasen einander offenbar *in vivo* ebenfalls grundsätzlich passieren und dabei die Transkription fortsetzen können. Da das Enzym durch IPTG-abhängige Überexpression in *P. putida* und *E. coli* in substantiellen Mengen akkumuliert (siehe **Abb. III-4**, **Abb. III-6**, **Abb. III-9**) und nur ein Template pro Zelle vorliegt, ist der zwingende Abbruch der Transkription bei Kollision und das Entstehen durchgehender Transkripte durch ein zufällig zeitlich getrenntes Lesen in beiden Richtungen unwahrscheinlich. Allerdings ist eine verminderte Akkumulation von Transkript bei gegenläufiger im Vergleich mit unidirektionaler Transkription bekannt (siehe I.7, **Abb. I-9**; Markert, 2008). Dies kann auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein und ist möglicherweise das Ergebnis kombinierter Effekte. Möglicherweise destabilisiert die Passage von zwei Polymerasen die Bindung derselben an das DNA-Template, weil für die Dauer der Passage jeweils nur der Template-Strang mit der Polymerase assoziiert bleiben kann, während der nicht-Template-Strang von der gegenläufig lesenden Polymerase besetzt ist (Ma & McAllister, 2009). So könnte eine Kollision nicht zwingend die Transkription stoppen, aber dazu führen, dass es häufiger als üblich zum Lösen dieser Polymerase-DNA-Bindung kommt. Weiterhin ist die Hybridisierung komplementärer mRNAs denkbar, die somit zum Ziel der mRNA-Degradation durch

RNase III (Blomberg *et al.*, 1990; Case *et al.*, 1990) oder RNase E werden (Deana & Belasco, 2005). Für die Expression des *crt*-Genclusters wurde die Beeinträchtigung durch den bidirektionalen Transkriptionsmodus nicht in komparativen Studien mit dem unidirektionalen Modus bestimmt. Die Ergebnisse der Quantifizierung von *crt*-Transkripten und produzierten Carotinoid-Mengen ohne und mit induzierter Wirkung der T7RP zeigten aber, dass hier die Transkriptlevel wohl nicht die Produktausbeute limitiert haben, da der Induktionsfaktor auf Transkriptionsebene den auf Produktebene bereits deutlich überstieg (siehe auch III.5, **Tab. III-2**). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Transkriptionseffizienz bei der funktionellen Expression anderer Biosynthese-Gencluster in anderen Wirten als limitierend erweist.

IV.1.4.2 Ist die Expression größerer Gencluster durch die T7RP möglich?

Die Fähigkeit der T7 Polymerase auch größere Gencluster als das 6,9 kb große *crt*-Gencluster effizient bidirektional zu transkribieren konnte im Rahmen weiterer Arbeiten mit dem TREX-System gezeigt werden (Markert, 2008). Es konnte für das in *P. putida* eingebrachte Prodigiosin-Gencluster aus *S. marcescens* (siehe IV.1.3) die vollständige Transkription aller Gene durch die T7RP in *sense* nachgewiesen werden (**Abb. IV-3 A**). Der Nachweis der *sense*-Transkripte der auswärts orientierten, distalen Gene *cueR* und *pigN* des 21,8 kb großen Genclusters belegt das vollständige Durchlesen der T7RP in beiden Orientierungen. T7RP-Transkripte dieser Größe sind bereits bekannt (Golomb & Chamberlin, 1974; McAllister *et al.*, 1981; Leng *et al.*, 2004; Arvani *et al.*, 2012). Das RiboMAX™ Large Scale RNA Production System von Promega (Schelle & Thiel, 2002) liefert unter Verwendung der T7RP *in vitro* Transkripte bis 27 kb.

In Bakterien können natürlicherweise sehr lange Gene mit > 25 kb und gar > 40 kb Länge vorkommen (Reva & Tümmler, 2008), deren Transkription durch bakterielle Polymerasen verschiedener Spezies offenbar bewältigt wird. Da beschrieben ist, dass die T7RP verglichen mit der *E. coli* RNA Polymerase eine hohe Prozessivität aufweist (Iost *et al.*, 1992), ist zu vermuten, dass die Phagen-Polymerase die Transkription von Genregionen mit deutlich mehr als 20 kb bewerkstelligen kann. Allerdings weist speziell *E. coli* keine größeren Gene als ca. 7 kb auf (Blattner *et al.*, 1997) und die längsten Transkriptionseinheiten sind mit < 18 kb beschrieben (Cho *et al.*, 2009). Bei einer TREX-Anwendung für sehr große Gencluster könnte eventuell ab einer gewissen Größe die Beeinträchtigung der Transkriptionseffizienz durch den bidirektionalen Expressionsmodus eine Rolle spielen und die vollständige und hinreichende Expression eines Genclusters verhindern. Dies bleibt in weiterführenden Untersuchungen zu evaluieren.

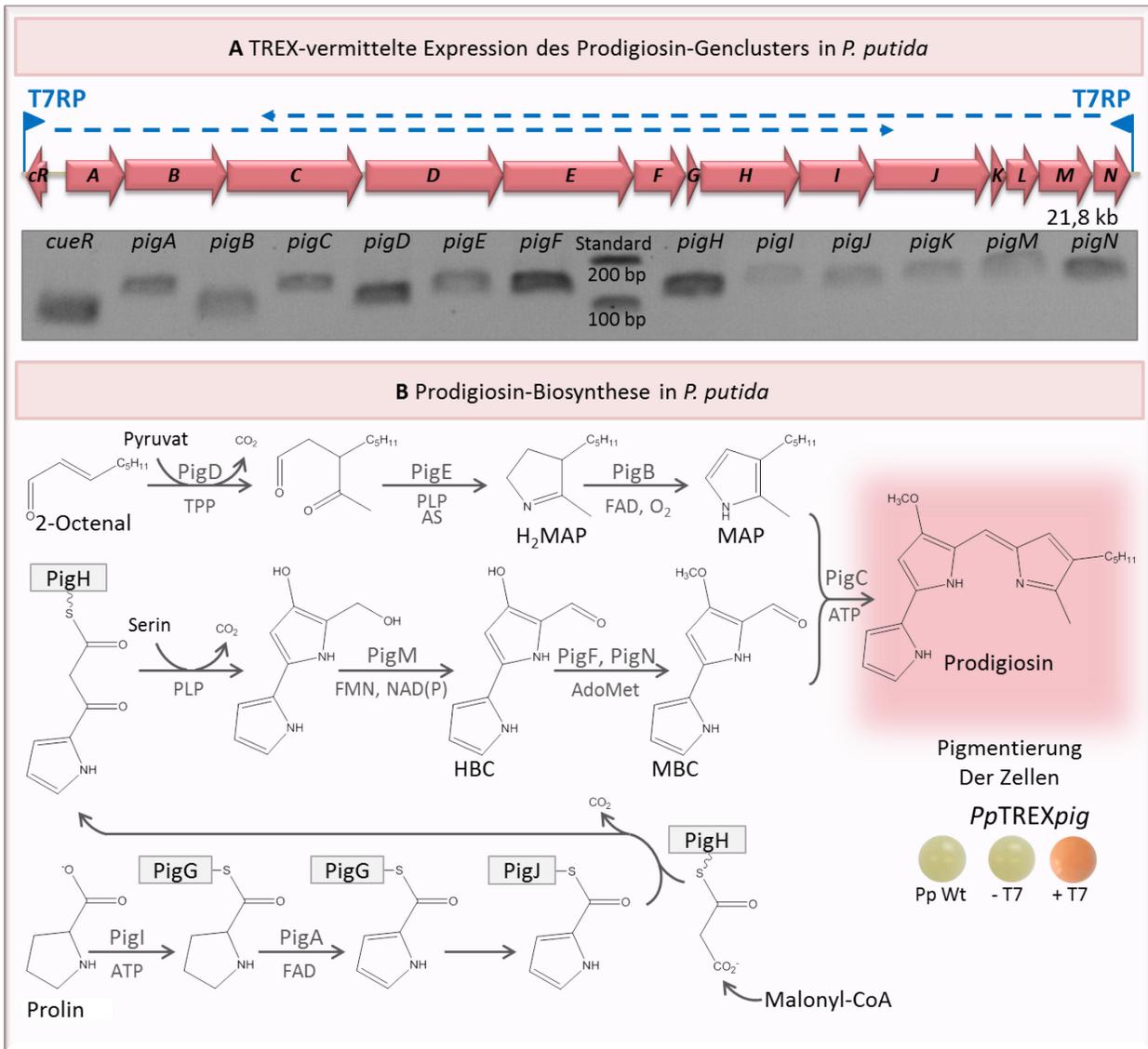


Abb. IV-3: TREX-vermittelte Prodigiosin-Synthese in *P. putida*

A Das Gencluster, das den Biosyntheseweg des roten Pigments Prodigiosin kodiert (schematisch in rot gezeigt, *cR* = *cueR*, *A-N* = *pigA-N*), wurde nach Integration in der genomischen DNA von *P. putida* mittels TREX bidirektional durch die T7 RNA Polymerase (T7RP) exprimiert (blaue Pfeile markieren T7-Promotoren der TREX-Kassetten, gestrichelte blaue Pfeile zeigen bidirektionale Transkription durch die T7RP an). Durch analytische PCR mit revers transkribierter *sense* mRNA als Template wurde das Transkript des Prodigiosin-Genclusters ausschließlich spezifisch in Anwesenheit der T7RP nachgewiesen (das Agarosegel zeigt die spezifischen PCR-Produkte mit Größen von ca. 100 bis 200 bp). **B** Die ersten Schritte der Synthese von Prodigiosin erfolgen ausgehend von 2-Octenal und Prolin in zwei getrennten Wegen, deren Endprodukte schließlich zum farbigen Prodigiosin kondensieren (durch farbige Hinterlegung markiert). Es wurde der vollständige Prodigiosin-Biosyntheseweg in strikter Abhängigkeit von der T7RP in *P. putida* etabliert, sodass die Zellen des TREX-manipulierten Stammes mit dem Prodigiosin-Gencluster (*PpTREXpig*) nur in Anwesenheit der T7RP (+ T7) eine rote Pigmentierung zeigten (siehe Pigmentierung der Zellen). Pp Wt = *P. putida* Wildtyp, TPP = Thiamin-Pyrophosphat, PLP = Pyridoxal-Phosphat, FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid, FMN = Flavin-Mononukleotid, NAD = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, AdoMet = S-Adenosylmethionin, ATP = Adenosin-Triphosphat, MAP = 2-Methyl-3-n-Amyl-Pyrrol, HBC = 4-Hydroxy-2,2'-Bipyrrrol-5-Carbaldehyd, MBC = 4-Methoxy-2,2'-Bipyrrrol-5-Carbaldehyd. Nach Markert (2008).

Die funktionelle Expression des Prodigiosin-Genclusters in *P. putida* demonstriert den Nutzen der T7RP besonders deutlich. Anders als bei der *crt*-Genexpression im Rahmen dieser Arbeit ist dort ohne die T7RP keine basale Expression durch ein Erkennen von natürlichen Promotoren des Genclusters im heterologen Wirt zu beobachten (**Abb. IV-3 B**, Pigmentierung der Zellen), sodass die Synthese des gewünschten Naturstoffes einzig durch die T7RP möglich ist.

IV.1.4.3 Wie entstehen Transkriptmuster?

Die Transkriptlevel der einzelnen Gene eines Genclusters unterscheiden sich häufig und weisen bestimmte Muster auf (Lee *et al.*, 2011). Dies kann auf regulatorische Prozesse die Transkription oder die mRNA-Stabilität betreffend zurückzuführen sein.

In *P. putida* wurde bei T7RP-abhängiger *crt*-Expression interessanterweise in drei phänotypisch völlig verschiedenen TREX-manipulierten Stämmen *PpTREXcrtΔX* nahezu das gleiche *crt*-Transkriptmuster detektiert (vergleiche **Abb. III-5**, **Abb. III-10** und **Abb. III-12**). Wiederum bemerkenswerterweise unterschied sich dies kaum von dem durch eine basale Expression hervorgerufenen Muster, das in Abwesenheit der T7RP entstand. Die Transkriptlevel der *crt*-Gene im rekombinanten *R. capsulatus* und *E. coli* zeigen ein geringfügig anderes Muster (**Abb. III-16** und **-18**). Da hier nur je ein Stamm untersucht wurde, kann allerdings kein Spezies-spezifisches Muster beschrieben werden. In sämtlichen Fällen wurde als grundlegendes Muster in der Tendenz eine Abnahme der detektierten Transkriptmenge mit steigendem Abstand vom Promotor beobachtet.

Bei der TREX-vermittelten heterologen Expression von Genclustern wie dem hier verwendeten *crt*-Gencluster entstehen Transkriptmuster durch ein Zusammenspiel verschiedenster Effekte. Dabei ist zu beachten, dass hier Transkriptionsprozesse ausgehend von drei unterschiedlichen Promotor-Typen eine Rolle spielen. Es befinden sich an beiden Enden des Genclusters Promotoren aus *P. ananatis*, die inwärts zum Gencluster orientiert liegen und erwiesenermaßen in *P. putida* und *E. coli* und möglicherweise auch in *R. capsulatus* durch die jeweilige bakterielle RNA Polymerase erkannt werden (III.2.2, III.3.4, III.4.2). Zudem liegen außerhalb davon die T7-Promotoren der TREX-Kassetten, die ebenfalls konvergent zum Gencluster orientiert sind. Außerdem können zusätzlich Promotoren im bakteriellen Wirtschromosom in der Nähe des TREX-Insertionsortes liegen, von denen ausgehend *read-through*-Transkripte bis in das *crt*-Gencluster erzeugt werden können.

Üblicherweise wird mit steigendem Abstand von einem Promotor weniger Transkript gebildet (Nishizaki *et al.*, 2007), weil sich die RNA Polymerase statistisch häufiger vom Template löst. Dieser Effekt sollte bei relativ kurzen Distanzen im Fall der hochprozessiven T7RP deutlich weniger zum Tragen kommen, als bei bakteriellen Polymerasen. Allerdings wird er bei einer TREX-Expression wahrscheinlich durch Kollisionen

gegenläufig lesender T7 RNA Polymerasen, die die Polymerase-DNA-Bindung destabilisieren, verstärkt (siehe IV.1.4.1). In ähnlicher Weise wirkt sich die Kollision entgegengesetzt lesender bakterieller RNA Polymerasen aus. So könnte der deutliche Abfall der Transkriptlevel der *crt*-Gene mit steigendem Promotor-Abstand sowohl ohne als auch mit T7RP zustande kommen. Weiterhin ist denkbar, dass in Anwesenheit der T7RP Promotor-nah vermehrt kurze Transkripte durch bakterielle RNA Polymerasen entstehen, die durch in gleicher Richtung schneller oder auch in gegenläufiger Richtung transkribierende T7RP vom Template entfernt werden. Schließlich können *read-through*-Transkripte von Promotoren außerhalb des Transposons erzeugt werden, die möglicherweise zusätzliche Transkripte der äußeren Gene generieren.

Nach der Synthese verschieden langer Transkripte, werden diese den Translations- und Degradationsprozessen unterworfen. Ein durch die Synthese entstandenes primäres Transkriptmuster kann nun durch die differentielle Stabilität verschiedener mRNA-Abschnitte in ein sekundäres Muster überführt werden, das durch gleichzeitige Synthese und Degradation von mRNA entsteht. Dieses ist die Situation, die hier durch RT-qPCR charakterisiert wurde. Dabei ist bekannt, dass sich die Degradationsmechanismen verschiedener Organismen wie *R. capsulatus*, *E. coli* und *Pseudomonas syringae* (Evguenieva-Hackenberg & Klug, 2009) unterscheiden, sodass unterschiedliche Transkriptmuster produziert werden können. Insofern ist bei komparativen Expressionsstudien von Genclustern in verschiedenen bakteriellen Wirten die Ausbildung Wirts-spezifischer Signaturen im Transkriptmuster denkbar. Es ist bekannt, dass die Mechanismen der posttranskriptionalen mRNA-Prozessierung eine maßgebliche Rolle bei der Kontrolle von Genexpression spielen. So ändern sich in *R. capsulatus* beispielsweise in Reaktion auf Umweltreize wie Sauerstoffkonzentration und Temperatur bestimmte mRNA-Degradationsprozesse, die eine adaptive Genexpression steuern (Jäger *et al.*, 2004a; Jäger *et al.*, 2004b). Aufgrund dieser hocheffizienten natürlichen Mechanismen beobachteten Arvani *et al.* (2012) bei homologer T7RP-Überexpression des Hydrogenase-Genclusters in *R. capsulatus* neben einem deutlichen Anstieg der Transkriptlevel die Ausbildung praktisch desselben Transkriptmusters über die Länge des 16 kb-Genclusters, wie es natürlicherweise der Wildtyp zeigt (**Abb. IV-4**).

Bei der Untersuchung von Transkripten, die durch die T7RP generiert wurden, wurde im Zuge anderer Arbeiten ein spezielles Phänomen der mRNA-Instabilität beobachtet. Durch die T7RP produzierte Transkripte entstehen schneller als bei Synthese durch bakterielle Polymerasen, sodass die Ribosomen während der Synthese nicht bis zum 5'-Bereich der mRNA aufschließen können. Solche Transkripte mit Bereichen ohne schützend abschirmende Ribosomen sind sensitiver für den Abbau durch RNase E (Iost & Dreyfus, 1995; Makarova *et al.*, 1995; Deana & Belasco, 2005). Somit liefert die T7RP möglicherweise

primäre Transkripte in Mengen, die noch deutlich über den durch RT-qPCR quantifizierten sekundären Leveln liegen.

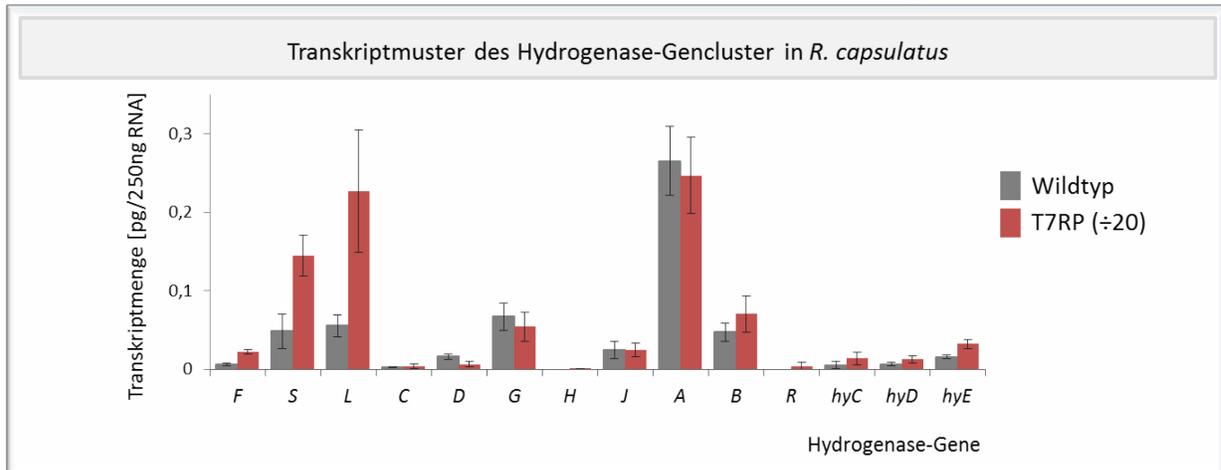


Abb. IV-4: Etablierung eines Transkriptmusters über das Hydrogenase-Gencluster in *R. capsulatus*

Gezeigt ist das im Wildtyp bestehende Muster sowie das durch T7RP-vermittelte Expression der Gene etablierte Muster. Arvani *et al.* (2012) markierten die chromosomale Region mit einem T7-Promotor und brachten die T7RP auf einem Vektor in *R. capsulatus* ein. Um die Ähnlichkeit der Muster trotz 8- bis 82-facher Überexpression darzustellen, sind 1/20 der in diesem Stamm bestimmten Transkriptmengen gezeigt. Nach Arvani *et al.* (2012).

Die hier beschriebenen *crt*-Transkriptmuster kommen vermutlich durch eine Kombination der genannten Phänomene zustande. Durch Gebrauch der T7RP wurde im Rahmen dieser Arbeit die Synthese substantieller *crt*-Transkriptmengen in allen getesteten Wirten sichergestellt. Es wurde erstmals die effektive bidirektionale Expression eines Biosynthese-Genclusters durch die T7RP gezeigt.

IV.1.5 TREX-vermittelte Carotinoid-Biosynthese in verschiedenen heterologen Wirten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach erfolgreicher Isolierung und TREX-Markierung eines Biosynthese-Genclusters dessen Transfer zu verschiedenen Expressionswirten, sowie dessen Etablierung im jeweiligen Wirtschromosom und schließlich die vollständige Transkription aller Biosynthesegene mittels TREX effizient umgesetzt werden kann. Die darauf folgende Synthese funktioneller Proteine und besonders die effektive Etablierung des zugehörigen Biosyntheseweges sind nicht durch TREX zu kontrollieren und werden in Abhängigkeit des jeweiligen Biosyntheseweges und der gewählten Expressionswirte mit unterschiedlicher Effizienz ablaufen.

IV.1.5.1 Translation heterologer mRNA

Im hier behandelten Fall sollte nach der erfolgreichen Transkription der Biosynthesegene die Translation von fünf (*crtEYIB*) bzw. sechs Carotinoid-Biosynthesegenen (*crtEYIBZ*) aus *P. ananatis* in den Wirten *P. putida*, *R. capsulatus* und *E. coli* erfolgen. Für die effiziente Translation der mRNA in Proteine soll der Gebrauch der Aminosäure-kodierenden DNA-Codons mit dem des ursprünglichen Produzenten

kompatibel sein. Der GC-Gehalt der fraglichen Organismen (**Tab. IV-1**) kann als Indikator dienen, ob dies zu erwarten ist (Sueoka, 1961; Ermolaeva, 2001). Da der GC-Gehalt von *E. coli* (51 %) dem von *P. ananatis* (53 %) nahe kommt, würde hier grundsätzlich eine unproblematische Translation erwartet. Im Gegensatz dazu weisen *P. putida* (62 %) und besonders *R. capsulatus* (67 %) einen deutlich höheren GC-Gehalt auf. Der GC-Gehalt kann sich in Abschnitten eines bakteriellen Genoms unterscheiden, sodass sich die spezielle Betrachtung des GC-Gehaltes der zu exprimierenden Gene empfiehlt. Der GC-Gehalt der *crt*-Gene aus *P. ananatis* liegt sehr ähnlich dem genomischen Durchschnitt bei 54 %.

Tab. IV-1: GC-Gehalt der Genome der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Bakterium	GC-Gehalt
<i>Pantoea ananatis</i>	53 %
<i>Escherichia coli</i>	51 %
<i>Pseudomonas putida</i>	62 %
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	67 %

In der kodierenden Sequenz der Gene *crtEYIBZ* werden 1556 Codons verwendet. Dabei kommen nicht alle 64 möglichen Codons (61 Aminosäure-Codons und 3 Stop-Codons) in derselben Frequenz vor, sondern in einer spezifischen Verteilung. Diese unterscheidet sich von der Verteilung der Codon-Häufigkeiten in den Genomen der Expressionswirte. **Abbildung IV-5** zeigt die Abweichung des Codon-Gebrauchs der Expressionswirte im Verhältnis zu dem im *crt*-Gencluster.

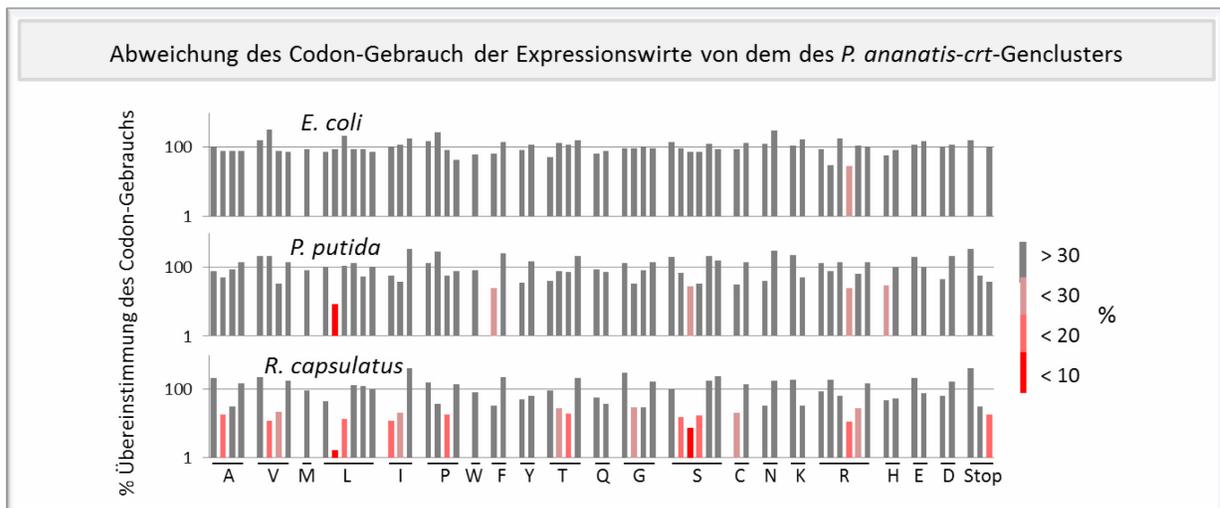


Abb. IV-5: Abweichung des Codon-Gebrauchs der Expressionswirte im Vergleich zum Codon-Gebrauch im *crt*-Gencluster aus *P. ananatis*

Dargestellt ist die prozentuale Übereinstimmung der Häufigkeit sämtlicher Codons in den Expressionswirten im Verhältnis zu dem im *crt*-Gencluster. Die Skalierung ist logarithmisch. In den Expressionswirten deutlich unterrepräsentierte Codons sind farblich markiert (siehe Skala rechts). Die kodierten Aminosäuren sind nach dem *single letter code* gekennzeichnet. Erstellt mithilfe der *Kazusa Codon Usage Database* und *Mobyle@Pasteur*.

Der Codon-Gebrauch von *E. coli* zeigt eine hohe Übereinstimmung mit dem im *crt*-Gencluster vorliegenden, wohingegen *P. putida* mit einigen unterrepräsentierten Codons und besonders *R. capsulatus* mit rund 1/3 unterrepräsentierten Codons deutliche Abweichungen aufweisen. Der Vergleich des Codon-Gebrauchs der Wirte mit dem des gesamten Genoms von *P. ananatis* fällt sehr ähnlich aus. Bei im Wirt deutlich seltener verwendeten Codons ist zu erwarten, dass die zugehörigen tRNAs dementsprechend selten vorkommen (Bulmer, 1987; Dong *et al.*, 1996) und somit die Translation an diesen Stellen pausiert. Es ist bekannt, dass die DNA bzw. mRNA-Sequenz zusammen mit der tRNA-Häufigkeit über die Regulation der Translationsgeschwindigkeit die Proteinfaltung spezifisch beeinflussen kann (Komar *et al.*, 1999; Saunders & Deane, 2010; Tuller *et al.*, 2010). Daher ist eine quantitative und qualitative Beeinträchtigung der Synthese korrekter Proteine von einer heterologen mRNA mit fremdem Codon-Gebrauch möglich. Nichtsdestotrotz konnten funktionelle Genprodukte in sämtlichen Wirten generiert werden. Allerdings kann eine geminderte Translationseffizienz aufgrund von tRNA-Verknappung nicht ausgeschlossen werden.

IV.1.5.2 Generierung aktiver Enzyme

Die Funktionalität von Enzymen hängt im nächsten Schritt nach der korrekten Translation und Faltung von weiteren Parametern ab. Mithilfe von Datenbanken wie BRENDA, EXPASY oder ExplorEnz kann ermittelt werden, ob für die Funktionalität der Enzyme beispielsweise spezielle Kofaktoren benötigt werden, sofern dies bekannt ist. Häufig sind jedoch nicht alle Informationen verfügbar. Im hier bearbeiteten Fall werden übliche organische Kofaktoren wie ATP oder NADH sowie im Medium enthaltene zweiwertige Kationen für die Funktionalität der *crt*-Genprodukte benötigt (Neudert *et al.*, 1998; Hornero-Méndez & Britton, 2002). Diese werden bei der Expression in allen Wirten gleichermaßen zur Verfügung gestellt. Weiterhin werden die Enzyme CrtE, CrtY, CrtI und CrtB aufgrund hydrophober Bereiche, der Membran-Assoziation homologer Proteine oder aufgrund von Beobachtungen bei heterologer Expression als Membran-ständig eingeordnet (Fraser *et al.*, 1992; Schnurr *et al.*, 1996). Im Fall von CrtZ wurde trotz hydrophober Bereiche zytosolisches Vorkommen postuliert (Hundle *et al.*, 1993). Für die Expression von Membran-Proteinen wird die *Rhodobacter*-Spezies aufgrund ihrer besonderen Membran-Physiologie als potentiell besonders geeignet beschrieben (Laible *et al.*, 2004). Für die Umsetzung von β -Carotin zu β -Cryptoxanthin und schließlich Zeaxanthin durch die β -Carotin-Hydroxylase (CrtZ) ist die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff nötig (Fraser *et al.*, 1997). Dementsprechend wurden die Wuchsbedingungen des fakultativ anaeroben *R. capsulatus* angepasst (III.3.4). Grundsätzlich werden bei der TREX-vermittelten Expression von Biosynthese-Genclustern nicht

unbedingt vollständige Informationen zur Verfügung stehen, sodass die Expressionswirte und -bedingungen nicht rein rational auszuwählen sind.

IV.1.5.3 Etablierung des Carotinoid-Biosyntheseweges in den heterologen Wirten

Nach der Generierung aktiver Enzyme ist die effektive Etablierung eines Biosyntheseweges von mehreren Faktoren abhängig. Die Bereitstellung ausreichender Mengen von Vorstufen ist die erste Grundvoraussetzung. Weiterhin sollte der Fluss hin zum Endprodukt möglichst effektiv sein. In der Zelle muss diesem Endprodukt schließlich ein Speicherraum zur Verfügung gestellt werden. Außerdem sollte möglichst die Toxizität des End- oder eines Zwischenproduktes für den Wirt ausgeschlossen sein. Schließlich sollen möglichst keine Kreuzreaktionen zwischen dem heterologen Biosyntheseweg und dem wirtseigenen Stoffwechsel auftreten. Diese könnten den Abbau oder der Modifikation des End- oder eines Zwischenproduktes bewirken.

Im hier bearbeiteten Fall konnte ein Teil dieser Faktoren eingeschränkt vorausgesagt werden. Die für die Synthese von Carotinoiden benötigten Isoprenoide werden in allen Wirten über den MEP-Weg hergestellt (siehe I.6.1). Da *R. capsulatus* selbst über einen Carotinoid-Biosyntheseapparat verfügt (siehe I.6.1.2), sind hier die größten Mengen der entsprechenden Vorstufen zu erwarten. Weiterhin wird in diesem Wirt den lipophilen Carotinoiden ein physiologischer Speicherraum in Form des intrazytoplasmatischen Membransystems geboten. Zudem ist denkbar, dass die Wirts-fremden Pigmente in einem natürlicherweise carotinogenen Organismus keine Toxizitätsantwort hervorrufen. Um Kreuzreaktionen des heterologen Biosyntheseweges mit der intrinsischen Carotinoid-Synthese in *R. capsulatus* zu vermeiden, wurde ein Stamm mit angepasstem Carotinoid-Stoffwechsel verwendet. Dessen Carotinoid-Synthese ist durch Deletion des Gens *crtC* unterbrochen, so dass Neurosporin anstelle der natürlichen Carotinoide akkumuliert (siehe III.3.2). Neurosporin kann direkt in den heterologen Biosyntheseweg einfließen. Daher konnten für *R. capsulatus* die höchsten Produktausbeuten prognostiziert werden.

Tatsächlich führte die TREX-vermittelte Carotinoid-Genexpression zu unterschiedlichen Ergebnissen auf der Ebene der Carotinoid-Biosynthese in den Wirten *P. putida*, *R. capsulatus* und *E. coli*. In allen Wirten konnte die Carotinoid-Biosynthese von *P. ananatis* etabliert werden, wobei *R. capsulatus* mit 4,0 mg/gDCW (siehe III.3.4) die höchste Ausbeute lieferte (**Abb. IV-6**). *P. putida* zeigte dabei möglicherweise Anzeichen einer Toxizitätsantwort (siehe III.2.4), ähnlich wie bei Beuttler *et al.* (2011) beschrieben.

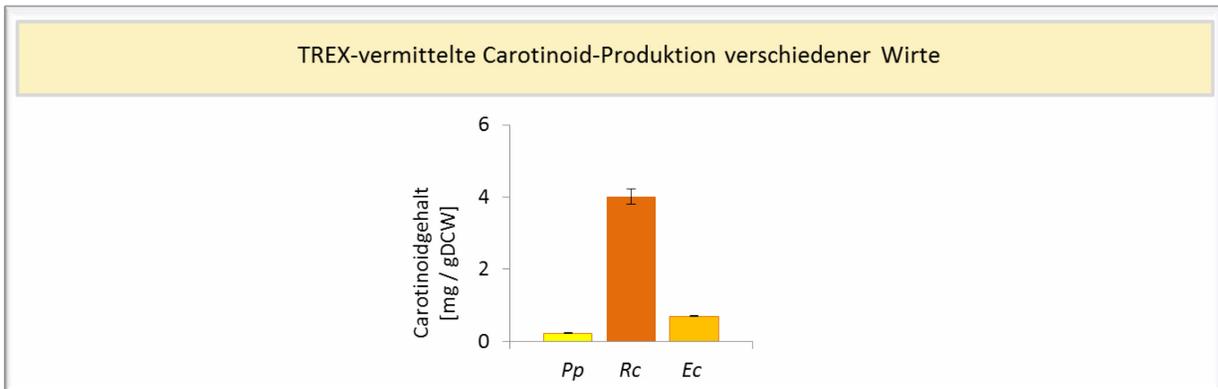


Abb. IV-6: Carotinoid-Gehalt verschiedener Wirte bei T7RP-vermittelter *crt*-Genexpression mittels TREX.

Die jeweiligen Expressionsbedingungen sowie das Extraktionsverfahren sind beschrieben in III bzw. II. Pp = *P. putida* (PpTREXcrtΔX + pML5-P_{lac}T7), Rc = *R. capsulatus* (RcTREXcrtΔX + pML5-P_{fru}T7), Ec = *E. coli* (EcTREXcrtΔZ).

Das Resultat der heterologen Expression von Biosynthesegenen auf der Ebene der Produktsynthese ist äußerst schwierig vorherzusagen, da mehrere maßgebliche Faktoren im Vorfeld häufig unbekannt sind. Das TREX-System ermöglicht die experimentelle Überprüfung dieser Fragestellung.

IV.1.6 Zusammenfassung der Limitierungen des TREX-Systems

Das TREX-System soll komparative Expressionsstudien mit Biosynthese-Genclustern in einem breiten Spektrum bakterieller Expressionswirte ermöglichen und damit die Gewinnung und Charakterisierung wertvoller Naturstoffe erlauben. Derzeit bestehen dabei die folgenden Limitierungen. Zunächst muss der Wirt transformierbar oder durch Konjugation zugänglich sein. Dies sollten vermutlich alle Gram-negativen und manche Gram-positiven Bakterien sein (siehe I.4.2.1). Im Wirt müssen daraufhin zwei Prozesse funktionieren, nämlich die funktionale Expression der Transposase und die Umsetzung des Transpositionsereignisses sowie die funktionale Expression eines Gentamycin-Resistenzmarkers. Für die Funktionalität des Transposon Tn5 werden keinerlei Proteine des Expressionswirtes benötigt (Goryshin & Reznikoff, 1998). Das Transposon funktioniert erwiesenermaßen in verschiedenen Rhizobien, Myxokokken, Pseudomonaden, Enterobakterien und vielen weiteren, sodass es häufig in verschiedenen Zusammenhängen verwendet wird (Berg & Berg, 1983; Nikel & de Lorenzo, 2012; Rademacher *et al.*, 2012). Die Tn5-basierte Transposition größerer DNA-Fragmente als rund 30 kb ist noch nicht gezeigt worden, aber wahrscheinlich möglich (siehe IV.1.3). Das Gentamycin-Resistenzgen *aacC1* des Transposon Tn1696 in *P. aeruginosa* ist als funktionell in einem breiten Spektrum an Bakterien wie Streptomyzeten, Enterobakterien, Rhizobien, Agrobakterien und weiteren beschrieben und wurde vielfach verwendet (Wohlleben *et al.*, 1989; Schweizer, 1993; Ding *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Im Anschluss an die Erzeugung von TREX-Transpositions-Mutanten muss die Expression der T7RP im gewählten Wirt erfolgen. Dafür stehen verschiedenste T7-Expressionsstämme sowie die Vektoren pML5P_{lac}-T7 und

pMI5P_{fru}-T7 zur Verfügung (siehe I.4.2.3). Zudem existiert für die Erzeugung neuer T7-Expressionsstämme ein T7-Expressionstransposon zur Integration des T7RP-Gens in Gram-negativen Bakterien (Kang *et al.*, 2007). Die effektive, bidirektionale Transkription von Bereichen > 22 kb ist bisher nicht gezeigt worden (siehe IV.1.4.2). Das Resultat der konzertierten gegenläufigen Transkription von großen Genregionen um 100 kb ist schwer vorherzusagen; da aber die grundsätzliche Einschränkung der Transkriptionseffizienz durch den bidirektionalen Modus bekannt ist (siehe I.7), könnte die Größe der Genregion als zusätzliche Schwierigkeit die Limitierung der effektiven Expression darstellen.

IV.2 EVALUATION DER CAROTINOID-AUSBEUTEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Carotinoid-Biosyntheseweg aus *P. ananatis* in drei heterologen Wirten etabliert. Dieser Biosyntheseweg ist bereits vielfach für die heterologe Produktion von Carotinoiden verwendet worden. Dabei wurde zumeist *E. coli* als Expressionswirt verwendet. Für eine möglichst hohe Carotinoid-Ausbeute ist der metabolische Fluss von Isoprenoid-Vorstufen in den Carotinoid-Biosyntheseweg entscheidend (siehe auch I.6).

Es wurden in verschiedenen Plasmid-basierten Studien in *E. coli* ohne Manipulation der Isoprenoidsynthese β -Carotin-Ausbeuten im Bereich von 0,2 - 0,5 mg/gDCW beobachtet (Kajiwara *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 2006), während bei zusätzlicher Expression von Genen des MEP-Isoprenoid-Syntheseweges 6 mg/gDCW (Yuan *et al.*, 2006) oder bei zusätzlicher Etablierung des Mevalonat-Isoprenoid-Syntheseweges gar 49,3 mg/gDCW Carotinoid-Gehalt beschrieben wurden (Yoon *et al.*, 2007). Da außerdem die jeweiligen Anzuchtbedingungen, das Medium und Zusätze sowie die Expressionslevel der *crt*- und Isoprenoidsynthese-Gene eine Rolle spielen, sind die jeweiligen Ergebnisse nicht direkt zu vergleichen. Allerdings wird deutlich, dass der hier mittels TREX in *E. coli* erzielte Carotinoid-Gehalt von $0,7 \pm 0,01$ mg/gDCW in derselben Größenordnung liegt, wie bereits in anderen Studien ohne Optimierung der Isoprenoid-Synthese beschrieben.

Die Zeaxanthin-Produktion mit *P. putida* wurde bisher einmal beschrieben (Beuttler *et al.*, 2011). Dort wurde ein Stamm mit vier deletierten Genen verwendet, der eine verbesserte Lykopen-Toleranz zeigte, und zusätzlich zu den *crt*-Genen drei Gene des MEP-Wegs aus *E. coli* exprimiert. Bei Expression in LB-Medium wurden 1,3 mg/gDCW und in TB-Medium 7,0 mg/gDCW Zeaxanthin-Gehalt beschrieben. Die Ausbeute in LB-Medium ist gegenüber dem in dieser Arbeit erreichten Gehalt von $0,22 \pm 0,01$ mg/gDCW Zeaxanthin bzw. $0,15 \pm 0,01$ mg/gDCW β -Carotin um Faktor 6,5 bzw. 8,7 höher. Dieser Unterschied geht vermutlich auf die Deletionen und exprimierten MEP-Gene bei Beuttler *et al.* zurück. In *E. coli* konnte

Zeaxanthin bisher mit Ausbeuten von 0,3 – 0,8 mg/gDCW (Ruther *et al.*, 1997; Nishizaki *et al.*, 2007) hergestellt werden, wobei keine Optimierung der Isoprenoid-Synthese betrieben wurde.

Die Expression des *crt*-Genclusters aus *P. ananatis* in *R. capsulatus* ist bisher nicht beschrieben. Allerdings wurden *crt*-Gene aus *Pantoea agglomerans* in *Rhodobacter spheroides* exprimiert, um die Assemblierung fremder Carotinoide in den Lichtsammelkomplexen zu untersuchen. *R. spheroides* verfügt über den gleichen Photosyntheseapparat wie *R. capsulatus* (Armstrong, 1997) und die *crt*-Gene aus *P. agglomerans* katalysieren ebenso wie die aus *P. ananatis* die Umsetzung von Isopreneinheiten zu Zeaxanthin-Diglykosid (Misawa *et al.*, 1990; Hundle *et al.*, 1994). In ähnlicher Weise zu den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen konnte durch Expression der Gene *crtYIBZ* (*P. agglomerans*) die Carotinoid-Biosynthese einer Neurosporin-akkumulierenden *R. spheroides crtC*-Mutante vollständig zu der von *P. agglomerans* umgeleitet werden (Hunter *et al.*, 1994). Es wurden β -Carotin (84%), β -Cryptoxanthin (3%) und Zeaxanthin (12%) akkumuliert. Die unvollständige Umsetzung von β -Carotin zu Zeaxanthin wurde auf die ineffiziente Expression des bidirektional organisierten Genclusters durch nur einen Wirts-Promotor zurückgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Assemblierung von Lichtsammelkomplexen mit diesen fremden Carotinoiden möglich ist und dass diese wie auch Neurosporin (Cogdell *et al.*, 1981) als akzessorische Pigmente Lichtenergie zum Bakteriochlorophyll a transferieren können. Auch Lykopen kann funktionell in die Lichtsammelkomplexe eingebunden werden (Garcia-Asua *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). Die angesprochenen Studien fokussierten auf die Frage nach der Funktionalität der Lichtsammelkomplexe bei der Akkumulation fremder Carotinoide in der Zelle und nicht auf die Ausbeuten der produzierten Pigmente, sodass keine Angaben darüber gemacht wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte in *R. capsulatus* durch Expression von *crt*-Genen aus *P. ananatis* die nahezu vollständige Umsetzung von Neurosporin zu β -Carotin gezeigt werden. Dabei akkumulierten $4,0 \pm 0,15$ mg/gDCW (III.3.4).

IV.3 PERSPEKTIVEN DER NATURSTOFF-ERSCHLISSUNG

Für die biotechnologische Entdeckung, Charakterisierung und Produktion von wertvollen Naturstoffen ist die Verfolgung zweier Grundstrategien notwendig. Es wird einerseits ein breites *Screening* verschiedener Wirte für die Aktivierung Gencluster-kodierter Biosynthesewege und andererseits die optimale zeitliche und örtliche Abstimmung des metabolischen Flusses in der Zelle für eine effiziente Produktion entscheidend sein.

IV.3.1 *Screening* mit verschiedenen Wirten

Da verschiedene Organismen sich aufgrund individueller Physiologie unterschiedlich gut für die Aktivierung heterologer Biosynthesewege eignen, sind Methoden wie das TREX-System, die in einem breiten Wirtsbereich die Expression von Biosynthesegenen ermöglichen, von großer Bedeutung. Das System ist besonders wertvoll bei der Verwendung unmanipulierter Biosynthese-Gencluster aus ursprünglichen Produzenten-Organismen und aus (Meta-)Genom-Studien. Denn diese können unabhängig von vorkommenden genetischen Regulationselementen zur Expression gebracht werden. Auf diese Weise können passende Wirte für den jeweiligen Biosyntheseweg gefunden werden. Dieser Bereich des *Screenings* kann mittels TREX bearbeitet werden. So können einerseits schwer zugängliche, unbekannte Naturstoffe überhaupt gewonnen werden, um diese oder den zugrundeliegenden Biosyntheseweg zu charakterisieren. Für solche Fragestellungen werden nicht zwingend große Mengen des Stoffes benötigt, sodass eine Optimierung der Produktionsleistung nicht notwendig sein muss. Weiterhin kann andererseits ein Stamm mit besonders günstigen Voraussetzungen für eine effiziente Naturstoff-Produktion identifiziert werden, der daraufhin für den jeweiligen Biosyntheseweg spezifisch manipuliert werden kann, um die Produktion zu steigern.

IV.3.2 Optimierung der Produktionsleistung

Eine gezielte Optimierung der Produktionsleistung kann auf unterschiedlichen Ebenen, zumeist in Kombination erfolgen. Grundsätzlich spielen die Produktionsbedingungen wie Temperatur oder Komposition des Mediums eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus bestehen verschiedene Möglichkeiten des *metabolic engineering*. Zunächst kann, wie bei der Carotinoid-Produktion aufgezeigt, die Hochregulation der Vorstufensynthese durch zusätzliche (Über-)Expression entsprechender Gene die Produktion steigern (Yuan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). Außerdem kann das Abschalten von Kreuzreaktionen durch Deletion entsprechender Gene, wie in dieser Arbeit bei *R. capsulatus* angewendet, das Abreagieren von Zwischenprodukten zu nicht-gewünschten Endprodukten verhindern. Schließlich gibt es verschiedene Strategien, den metabolischen Fluss feinzuregulieren, um unnötigen Energieverbrauch zu minimieren und die Produktionsleistung zu maximieren. Farmer & Liao (2000) zeigten die Produktions-steigernden Auswirkungen einer dynamische Regulation der Produktion von Lykopen in *E. coli*. Es wurde ein synthetisches Regulon eingesetzt, das mithilfe des Stickstoff-Regulationssystems die Lykopen-Produktion bei hohem Glykolyse-Status stimuliert. Dieser elegante Ansatz erlaubt im Gegensatz zu unkontrollierter Überexpression fremder Biosynthesegene einen kontrollierten, physiologisch verträglichen und effektiven Fluss des intrazellulären Kohlenstoff-Metabolismus in den heterologen Biosyntheseweg. Temme *et al.* (2012) zeigten die Kontrollierbarkeit

der Expression innerhalb eines Genclusters mit einer *Refactoring*-Strategie auf. Sie gestalteten ein Stickstofffixierungs-Gencluster aus *Klebsiella oxytoca* vollständig um, sodass es von jeglicher natürlicher Regulation befreit in eine synthetische Ordnung mit definierten Transkriptionseinheiten gebracht und in *E. coli* in kontrollierter Weise exprimiert werden konnte. Grundsätzlich kann auf genetischer Ebene in unterschiedlicher Weise auf die Expressionseffizienz Einfluss genommen werden. Zunächst ist die Promotorstärke entscheidend (Temme *et al.*, 2012). Außerdem kann für gesteigerte Expressionslevel die Gendosis erhöht werden (Tyo *et al.*, 2009). Weiterhin ist die 5'-untranslatierte Region des Transkriptes ausschlaggebend für die Transkriptstabilität und kann somit für die Modulation von Expression eingesetzt werden (Lale *et al.*, 2011). Zudem ist die Ribosomen-Bindestelle für die Effizienz der Translation entscheidend und bietet dadurch einen Ansatzpunkt für Feinregulation (Wang *et al.*, 2009; Temme *et al.*, 2012). In der Zukunft wird die synthetische Feinregulation von Biosynthese-Schritten und Abstimmung mit dem Metabolismus des Wirtes ausschlaggebend für die Effizienz heterologer Naturstoff-Produktion sein (Medema *et al.*, 2011b).

IV.3.3 Möglicher kombinatorischer Kompromiss mit TREX 2.0?

Das effektive *Screening* verschiedener Wirte mit ein und demselben genetischen System und eine optimierte Produktionsleistung schließen sich prinzipiell aus. Ein kombinatorischer Kompromiss ist mit dem folgenden Ansatz denkbar.

Das TREX-System bietet die Möglichkeit, natürliche Gencluster direkt in einem breiten Wirtsbereich zu aktivieren. Da die funktionelle Expression von Biosynthesegenclustern in verschiedenen Wirten immernoch ein großes Hindernis für die Naturstoff-Erschließung darstellt, ist diese Anwendung von großem Wert. Allerdings können sich durch die Expression unmanipulierter Gencluster inklusive ihrer natürlichen Promotoren im bidirektionalen Modus der TREX-Anwendung im beschriebenen Maße komplizierte Transkriptionsszenarien ergeben (siehe IV.1.4.3). Dabei wird zwingend unnötig Energie verbraucht, indem die Level der generierten Transkripte nicht für einen optimalen Fluss der Metabolite im kodierten Biosyntheseweg gegeneinander austariert sind. Insofern stellt der Expressionsmodus im TREX-System gleichzeitig die Schlüssel-Methode und den größten Nachteil dar, weil durch diesen Modus generierte, unnatürliche Transkriptmuster grundsätzlich energetisch ineffizient sein werden und in manchen Fällen möglicherweise auch den metabolischen Fluss ungünstig beeinflussen, sodass neben einem gewünschten Endprodukt größere Mengen von Zwischenprodukten akkumulieren können. Möglicherweise wird sich durch sinkende Preise synthetischer DNA der Bedarf, unmanipulierte Gencluster zu verwenden, legen, sodass alle Gene eines Biosynthese-Genclusters in einer Orientierung arrangiert werden und auf den bidirektionalen Expressionsmodus verzichtet werden kann. Alternativ

könnte eben dieser Modus für eine effizientere Expression und verbesserte Kopplung von Transkription und metabolischem Fluss genutzt werden. Es könnte durch individuelle Kontrolle der beiden T7-Promotoren in den TREX-Kassetten die zeitliche Trennung der Expression in den entgegengesetzten Richtungen erreicht werden. Auf diese Weise könnte vermutlich die Expression in jeder Richtung effizienter ablaufen, sodass zum Zeitpunkt der Ansteuerung eines Promotors die entsprechend orientierten Gene stärker exprimiert werden könnten, als im konzertiert-bidirektionalen Modus. Besonders die weiter von den T7-Promotoren entfernten Gene könnten von einer solchen Konstellation profitieren. Die gezielte Regulation der Expression von den beiden Promotoren könnte außerdem den metabolischen Fluss im kodierten Biosyntheseweg verbessern. Die Biosynthesegene müssen dafür so angeordnet sein, dass die frühen Schritte der Biosynthese unter Kontrolle des einen Promotors und die späten Schritte in entgegengesetzter Orientierung unter Kontrolle des zweiten Promotors kodiert sind. Es könnten so die zuerst benötigten Enzyme durch Aktivierung nur eines Promotors bereitgestellt werden und die Expression von später benötigten Biokatalysatoren zu einem günstigen Zeitpunkt durch Aktivierung des zweiten Promotors realisiert werden. Besonders für toxische Endprodukte mag ein solches Verfahren die Produktausbeuten verbessern. Möglicherweise ist eine sinnvolle Abstimmung der beiden Biosynthese-Sequenzen nicht trivial, da ein akkumuliertes Zwischenprodukt abgebaut werden könnte oder ebenfalls Toxizität aufweisen mag. Da das hier notwendige Arrangement bei natürlichen Genclustern selten ist, kommt eine solche Anwendung vornehmlich für synthetisch arrangierte Gencluster in Frage. Für eine gezielte Ansteuerung der beiden T7-Promotoren müssten effektive Repressoren eingesetzt werden, die die Expression vom jeweiligen Promotor in strikte Abhängigkeit von einem Induktor bringen. In der R-TREX-Kassette befindet sich bereits ein *lac*-Operator am T7-Promotor. Dieser ist die Bindestelle für den *lac*-Repressor, der die Transkription am T7-Promotor effektiv reprimieren kann (Giordano *et al.*, 1989; Dubendorff & Studier, 1991; Alexander *et al.*, 1992). Durch Zugabe von Laktose oder Analoga wie IPTG kann der Repressor gelöst und die Transkription ermöglicht werden. Eine weitere Option der Repression bietet TetR. Der TetR-Repressor den *tet*-Operator und kann ebenfalls effektiv die Transkription an einem T7-Promotor verhindern (Karig *et al.*, 2012). Dieser wird durch Bindung mit Tetrazyklin oder Analoga wie einem RNA-Aptamer (Hunsicker *et al.*, 2009) vom Operator gelöst. Durch Einfügen eines *tet*-Operators am T7-Promotor der L-TREX-Kassette und Expression der beiden Repressoren könnte durch Induktor-Zugabe die gezielte Steuerung der Expression früher und später Biosynthesegene umgesetzt werden. Das *lac*-System ist funktionell in einem breiten Wirtsspektrum (Khan *et al.*, 2008). Das *tet*-System funktioniert sowohl in Bakterien, als auch in Eukaryoten (Berens & Hillen, 2003) und ist dort als gebräuchliches *Tool* etabliert worden (Wirtz *et al.*,

1999; Kushnir *et al.*, 2005; Poon *et al.*, 2012). Somit besteht die Möglichkeit, dass bei einer solchen Erweiterung des TREX-Systems die Anwendbarkeit in einem breiten Wirtsbereich weiterhin gegeben ist. In einer weiteren Ausbaustufe wäre die Kontrolle der Regulation der T7-Promotoren durch Licht ein interessantes Ziel. Im Forschungsgebiet *optogenetics* wurden in den vergangenen Jahren immense Fortschritte gemacht, sodass hier grundsätzlich bereits verschiedene Licht-Sensor-Systeme zur Verfügung stehen (siehe I.7.1). In einer im Rahmen dieser Dissertation betreuten Bachelorarbeit konnte ein robustes Test-System für die Untersuchung Licht-abhängiger Genexpression in *E. coli* etabliert und mit einem nach Möglich (2009) konstruierten Licht-sensitiven Schaltkreis getestet werden (siehe **Abb. I-10** und III.6). Licht stellt deshalb einen besonders reizvollen Induktor dar, weil die einzigartigen physikalischen Eigenschaften von Licht eine unabhängige, Raum- und Zeit-aufgelöste Steuerung verschiedener Prozesse in nicht-invasiver Weise erlauben (Drepper *et al.*, 2011). Insofern scheint eine Licht-abhängige Kontrolle des Metabolit-Flusses in einem Biosyntheseweg ideal. An diesem Punkt stehen sich allerdings wiederum eine unkomplizierte *broad host range*-Aktivierbarkeit von Biosynthesewegen und eine optimierte Produktionsleistung durch koordinierte Genexpression gegenüber, da die Licht-kontrollierte Genexpression eine zusätzliche Komplexität in das System bringt, die nicht in allen denkbaren Wirten eingesetzt werden kann. Im Fall des hier verwendeten YF1-FixJ Zwei-Komponenten-Systems (**Abb. I-10**) hängt die Genexpression von der im Dunkeln aktiven Kinase-Domäne von YF1 ab. Diese phosphoryliert den *response regulator* FixJ, sodass dieser den Promotor P_{fixK2} aktiviert. Das genutzte Zwei-Komponenten-System aus *Bradyrhizobium japonicum* ist natürlicherweise in die Stickstofffixierung involviert und wird in Rhizobien (Ferrières *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010) und anderen Bakterienstämmen (Arnold *et al.*, 1988; Boesten & Priefer, 2004) Kreuzreaktionen mit diesem Stoffwechsel hervorrufen.

Da im TREX-System ein Licht-koordinierter Stoffwechselfluss nicht mit der Anwendbarkeit in frei wählbaren Wirten zu vereinbaren ist, wird dieses Projekt als Ausgangspunkt für die Entwicklung Licht-gesteuerter Expressionssysteme in *E. coli* genutzt.

V ZUSAMMENFASSUNG

Eine Vielzahl biotechnologisch oder medizinisch bedeutsamer Stoffe wird von Mikroorganismen produziert. Da die Extraktion dieser Naturstoffe aus ihren natürlichen Produzenten nur eingeschränkt möglich ist, werden die Verbindungen häufig in heterologen Wirtstämmen produziert. Dafür müssen ganze Biosynthese-Gencluster in solchen Wirten exprimiert werden. Bei der Aktivierung eines fremden Biosynthese-Genclusters in einem heterologen Wirt ist die Kompatibilität des kodierten Biosyntheseweges mit der Wirtsphysiologie schwer vorherzusagen. Daher ist ein breites *Screening* verschiedener Wirtsorganismen wünschenswert. Dies ist allerdings bislang mit einigem Aufwand verbunden, weil für die heterologe Expression eines Genclusters in verschiedenen Wirtskandidaten üblicherweise verschiedene genetische Elemente für jeden Wirt spezifisch angepasst werden müssen.

Das TREX-System ist ein neues Expressions-*tool*, das durch ein kombinatorisches Verfahren die heterologe Expression isolierter, unmanipulierter Gencluster in verschiedenen bakteriellen Wirten ermöglichen soll. Es besteht aus zwei Genkassetten, die alle genetischen Elemente enthalten, um die folgenden vier Schritte zu ermöglichen: (i) Zunächst wird ein Vektor-getragenes Gencluster mit den TREX-Kassetten markiert. (ii) Danach wird das gesamte Konstrukt mittels Konjugation in einen Expressionswirt eingebracht und (iii) durch Transposition im bakteriellen Chromosom inseriert, wo es (iv) schließlich von beiden Seiten aus durch die T7 RNA Polymerase exprimiert wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die TREX-Anwendung eingehend charakterisiert. Dabei standen zwei Hauptfragen im Vordergrund: Es wurde (i) die Umsetzbarkeit der im TREX-System vorgesehenen simultanen, konvergenten Transkription eines Genclusters durch die T7 RNA Polymerase untersucht und (ii) die Anwendbarkeit des Systems in einem weiten Wirtsspektrum überprüft. Dazu wurde das Carotinoidbiosynthese-Gencluster (*crt*) aus *P. ananatis* mittels TREX in *P. putida*, *R. capsulatus* und *E. coli* zur Expression gebracht.

Zunächst wurde unter Verwendung von *P. putida* als Wirt die Anwendbarkeit des konzertiert-bidirektionalen Transkriptionsmodus des TREX-Systems demonstriert, indem über die volle Länge des Genclusters Transkripte in beiden Orientierungen mittels RT-qPCR nachgewiesen werden konnten. Die Funktionalität sämtlicher Genprodukte konnte außerdem durch HPLC-Analyse der gebildeten Carotinoide nachgewiesen werden. Weiterhin wurde das intrinsisch carotinogene Bakterium *R. capsulatus* als Produktionswirt verwendet. Durch die Kombination von Manipulation der intrinsischen Carotinoid-Biosynthese von *R. capsulatus* und TREX-vermittelter Expression heterologer *crt*-Gene konnte der *P. ananatis*-spezifische Carotinoid-Biosyntheseweg erfolgreich in diesem Wirt etabliert werden.

Schließlich wurde die TREX-vermittelte Carotinoid-Produktion im Standard-Expressionswirt *E. coli* demonstriert.

Zusammenfassend konnte die Umsetzbarkeit aller Schritte der TREX-Anwendung in allen verwendeten Wirten bestätigt werden. Damit wurde gezeigt, dass das TREX-System die Expression unmanipulierter Gencluster in verschiedenen bakteriellen Wirten ermöglicht und so den Zugang zu wertvollen mikrobiellen Naturstoffen verbessert.

V SUMMARY

A large number of substances with biotechnological or medical potential is produced by microorganisms. Since the direct access to these natural substances by extraction from the original producers is limited, these compounds are often synthesized in heterologous hosts. For heterologous biosynthesis, whole biosynthetic gene clusters have to be expressed in such hosts. In the activation of a foreign biosynthetic gene cluster in a heterologous host, the compatibility of the encoded biosynthetic pathway with the host's physiology is difficult to predict. Therefore, a broad screening approach in different host organisms is favorable. However, this momentarily means time-consuming adaptation of certain genetic elements for the heterologous expression of gene clusters in individual host candidates.

The TREX system is a novel expression tool which is designed to allow the expression of unmanipulated gene clusters in various bacterial hosts by applying a combinatorial approach. It consists of two gene cassettes that contain all genetic elements to enable the following four steps: (i) A vector-borne gene cluster is labeled with the two TREX cassettes. (ii) The produced construct is then mobilized to an expression host by conjugation and (iii) integrated into the bacterial host chromosome by transposition, where (iv) it is transcribed from both sides by T7 RNA polymerase.

Within the presented work, the TREX systems' realization was characterized in detail, while two main questions were addressed: (i) The feasibility of the simultaneous bidirectional expression of a gene cluster by the T7 RNA polymerase and (ii) the applicability of the system in a broad host range. To this end, the carotenoid biosynthesis gene cluster (*crt*) from *P. ananatis* was expressed in *P. putida*, *R. capsulatus* and *E. coli* using TREX.

Using *P. putida* as expression host, the feasibility of the TREX systems' concerted bidirectional expression mode was demonstrated by applying RT-qPCR for detection of *crt* transcripts in both orientations over the complete gene cluster. Functionality of the gene products was shown by HPLC analysis of produced carotenoids. Furthermore, the intrinsically carotenogenic bacterium *R. capsulatus* was used as another production host. Applying a combination of metabolic engineering of the intrinsic carotenoid biosynthesis of *R. capsulatus* and TREX-mediated expression of heterologous *crt* genes, the *P. ananatis*-specific carotenoid biosynthesis could be established successfully in this host. Finally, TREX-mediated carotenoid production was also demonstrated with standard expression host *E. coli*.

In summary, robust functionality of the TREX system was verified in all tested hosts. In conclusion, the TREX system allows the expression of unmanipulated gene clusters in various bacterial hosts thereby improving accessibility of valuable microbial natural substances.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- 1 **Alexander WA, Moss B & Fuerst TR (1992)** Regulated expression of foreign genes in vaccinia virus under the control of bacteriophage T7 RNA polymerase and the *Escherichia coli lac* repressor. *Journal of virology* **66**: 2934-2942.
- 2 **Amann RI, Ludwig W & Schleifer K-H (1995)** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* **59**: 143-169.
- 3 **Amedei A & D'Elis MM (2012)** New therapeutic approaches by using microorganism-derived compounds. *Current medicinal chemistry* **19**: 3822-3840
- 4 **Armstrong GA, Alberti M, Leach F & Hearst JE (1989)** Nucleotide sequence, organization, and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular & general genetics* **216**: 254-268.
- 5 **Armstrong GA, Alberti M & Hearst JE (1990)** Conserved enzymes mediate the early reactions of carotenoid biosynthesis in nonphotosynthetic and photosynthetic prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 9975-9979.
- 6 **Armstrong GA (1997)** Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annual review of microbiology* **51**: 629-659.
- 7 **Arnold W, Rump A, Klipp W, Priefer UB & Pühler A (1988)** Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of molecular biology* **203**: 715-738.
- 8 **Arvani S, Markert A, Loeschcke A, Jaeger KE & Drepper T (2012)** A T7 RNA polymerase-based toolkit for the concerted expression of clustered genes. *Journal of biotechnology* **159**: 162-171.
- 9 **Aslanidis C & de Jong PJ (1990)** Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic acids research* **18**: 6069-6074.
- 10 **Aune TE & Aachmann FL (2010)** Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Applied microbiology and biotechnology* **85**: 1301-1313.
- 11 **Backman K & Ptashne M (1978)** Maximizing gene expression on a plasmid using recombination *in vitro*. *Cell* **13**: 65-71.
- 12 **Bagdasarian M, Lurz R, Rückert B, Franklin FC, Bagdasarian MM, Frey J & Timmis KN (1981)** Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247.
- 13 **Bai L, Li L, Xu H, Minagawa K, Yu Y, Zhang Y, Zhou X, Floss HG, Mahmud T & Deng Z (2006)** Functional analysis of the validamycin biosynthetic gene cluster and engineered production of validoxylamine A. *Chemistry & biology* **13**: 387-397.
- 14 **Bassett EJ, Keith MS, Armelagos GJ, Martin DL & Villanueva AR (1980)** Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science* **209**: 1532-1534.
- 15 **Bauer C, Elsen S, Swem LR, Swem DL & Masuda S (2003)** Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **358**: 147-154.
- 16 **Bauernfeind JC (1981)** *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. Academic Press, New York.
- 17 **Behnken S & Hertweck C (2012)** Cryptic polyketide synthase genes in non-pathogenic *Clostridium* SPP. *PLoS one* **7**: e29609.
- 18 **Bendich A (2004)** From 1989 to 2001: what have we learned about the "biological actions of beta-carotene"? *The Journal of nutrition* **134**: 225S-230S.
- 19 **Bérdy J (2005)** Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics* **58**: 1-26.
- 20 **Berens C & Hillen W (2003)** Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *European journal of biochemistry* **270**: 3109-3121.
- 21 **Berg DE & Berg CM (1983)** The prokaryotic transposable element Tn5. *Biotechnology* **1**: 417-435.
- 22 **Bertram JS & Vine AL (2005)** Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target. *Biochimica et biophysica acta* **1740**: 170-178.

- 23 **Beuttler H, Hoffmann J, Jeske M, Hauer B, Schmid RD, Altenbuchner J & Urlacher VB (2011)** Biosynthesis of zeaxanthin in recombinant *Pseudomonas putida*. *Applied microbiology and biotechnology* **89**: 1137-1147.
- 24 **Bhasin A, Goryshin IY & Reznikoff WS (1999)** Hairpin formation in Tn5 transposition. *The Journal of biological chemistry* **274**: 37021-37029.
- 25 **Binder D (2011)** Modulierung der *lac*-Promoter basierten Genexpression in *Escherichia coli*. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- 26 **Blanusa M, Schenk A, Sadeghi H, Marienhagen J & Schwaneberg U (2010)** Phosphorothioate-based ligase-independent gene cloning (PLICing): An enzyme-free and sequence-independent cloning method. *Analytical biochemistry* **406**: 141-146.
- 27 **Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B & Shao Y (1997)** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.
- 28 **Blomberg P, Wagner EG & Nordström K (1990)** Control of replication of plasmid R1: the duplex between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT, is processed specifically *in vivo* and *in vitro* by RNase III. *The EMBO journal* **9**: 2331-2340.
- 29 **Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH & Prinsep MR (2012)** Marine natural products. *Natural product reports* **29**: 144-222.
- 30 **Boesten B & Priefer UB (2004)** The C-terminal receiver domain of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* FixL protein is required for free-living microaerobic induction of the *fnrN* promoter. *Microbiology* **150**: 3703-3713.
- 31 **Bone RA, Landrum JT, Cao Y, Howard AN & Alvarez-Calderon F (2007)** Macular pigment response to a supplement containing meso-zeaxanthin, lutein and zeaxanthin. *Nutrition & metabolism* **4**: 12.
- 32 **Boucher Y & Doolittle WF (2000)** The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Molecular microbiology* **37**: 703-716.
- 33 **Bouvier F, Backhaus RA & Camara B (1998)** Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **273**: 30651-30659.
- 34 **Brahmachari G (2009)** Mother nature - an inexhaustible source of drugs and lead molecules. *Natural Products: Chemistry, Biochemistry and Pharmacology*, (Brahmachari G), 1-20. Narosa Publishing House, New Dehli, India.
- 35 **Brigulla M & Wackernagel W (2010)** Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. *Applied microbiology and biotechnology* **86**: 1027-1041.
- 36 **Britton G (1995a)** UV/visible spectroscopy. *Carotenoids: spectroscopy*, Vol. 1B (Britton G, Liaaen-Jensen S & Pfander H), 13-63. Birkhäuser, Basel.
- 37 **Britton G (1995b)** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB journal* **9**: 1551-1558.
- 38 **Britton G, Liaaen-Jensen S & Pfander H (1995)** Carotenoids today and challenges for the future. *Carotenoids*, Vol. 1A: Isolation and Analysis (Britton G, Liaaen-Jensen S & Pfander H), Birkhäuser, Basel.
- 39 **Britton G, Liaaen-Jensen S & Pfander H (2004)** *Carotenoids, Handbook*. Birkhäuser Basel.
- 40 **Brunschwig E & Darzins A (1992)** A two-component T7 system for the overexpression of genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **111**: 35-41.
- 41 **Bulmer M (1987)** Coevolution of codon usage and transfer RNA abundance. *Nature* **325**: 728-730.
- 42 **Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J & Wittwer CT (2009)** The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* **55**: 611-622.
- 43 **Butalla AC, Crane TE, Patil B, Wertheim BC, Thompson P & Thomson CA (2012)** Effects of a carrot juice intervention on plasma carotenoids, oxidative stress, and inflammation in overweight breast cancer survivors. *Nutrition and cancer* **64**: 331-341.
- 44 **Butler MS & Newman DJ (2008)** Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. *Progress in drug research* **65**: 1, 3-44.
- 45 **Carbonell P, Planson AG, Fichera D & Faulon JL (2011)** A retrosynthetic biology approach to metabolic pathway design for therapeutic production. *BMC systems biology* **5**: 122.

- 46 **Carter GT (2011)** Natural products and Pharma 2011: strategic changes spur new opportunities. *Natural product reports* **28**: 1783-1789.
- 47 **Case CC, Simons EL & Simons RW (1990)** The IS10 transposase mRNA is destabilized during antisense RNA control. *The EMBO journal* **9**: 1259-1266.
- 48 **Chen YW, Smith ML, Sheets M, Ballaron S, Trevillyan JM, Burke SE, Rosenberg T, Henry C, Wagner R, Bauch J, Marsh K, Fey TA, Hsieh G, Gauvin D, Mollison KW, Carter GW & Djuric SW (2007)** Zotarolimus, a novel sirolimus analogue with potent anti-proliferative activity on coronary smooth muscle cells and reduced potential for systemic immunosuppression. *Journal of cardiovascular pharmacology* **49**: 228-235.
- 49 **Cheng Q (2007)** Recent patents on carotenoid production in microbes. *Recent patents on biotechnology* **1**: 202-211.
- 50 **Cho BK, Zengler K, Qiu Y, Park YS, Knight EM, Barrett CL, Gao Y & Palsson BO (2009)** The transcription unit architecture of the *Escherichia coli* genome. *Nature biotechnology* **27**: 1043-1049.
- 51 **Choi KH, Gaynor JB, White KG, Lopez C, Bosio CM, Karkhoff-Schweizer RR & Schweizer HP (2005)** A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nature methods* **2**: 443-448.
- 52 **Choi KH & Kim KJ (2009)** Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria. *Journal of microbiology and biotechnology* **19**: 217-228.
- 53 **Chou C, Young DD & Deiters A (2010)** Photocaged T7 RNA polymerase for the light activation of transcription and gene function in pro- and eukaryotic cells. *ChemBioChem* **11**: 972-977.
- 54 **Cogdell RJ, Hipkins MF, MacDonald W & Truscott TG (1981)** Energy transfer between the carotenoid and the bacteriochlorophyll within the B-800-850 light-harvesting pigment-protein complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochimica et biophysica acta* **634**: 191-202.
- 55 **Cogdell RJ & Frank HA (1987)** How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochimica et biophysica acta* **895**: 63-79.
- 56 **Colbeau A, Richaud P, Toussaint B, Caballero FJ, Elster C, Delphin C, Smith RL, Chabert J & Vignais PM (1993)** Organization of the genes necessary for hydrogenase expression in *Rhodobacter capsulatus*. Sequence analysis and identification of two *hyp* regulatory mutants. *Molecular microbiology* **8**: 15-29.
- 57 **Conn PF, Lambert C, Land EJ, Schalch W & Truscott TG (1992)** Carotene-oxygen radical interactions. *Free radical research communications* **16**: 401-408.
- 58 **Cornelis P (2010)** Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied microbiology and biotechnology* **86**: 1637-1645.
- 59 **Craig NL (1991)** Tn7: a target site-specific transposon. *Molecular microbiology* **5**: 2569-2573.
- 60 **Csonka LN (1989)** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological reviews* **53**: 121-147.
- 61 **Das A, Yoon SH, Lee SH, Kim JY, Oh DK & Kim SW (2007)** An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Applied microbiology and biotechnology* **77**: 505-512.
- 62 **Datsenko KA & Wanner BL (2000)** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 6640-6645.
- 63 **Davies BH (1976)** Carotenoids. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, Vol. 2 (Goodwin TW), Academic Press, London, New York and San Francisco.
- 64 **Davies DR, Goryshin IY, Reznikoff WS & Rayment I (2000)** Three-dimensional structure of the Tn5 synaptic complex transposition intermediate. *Science* **289**: 77-85.
- 65 **de Azevedo-Meleiro CH & Rodriguez-Amaya DB (2009)** Qualitative and quantitative differences in the carotenoid composition of yellow and red peppers determined by HPLC-DAD-MS. *Journal of separation science* **32**: 3652-3658.
- 66 **de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U & Timmis KN (1990)** Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Journal of bacteriology* **172**: 6568-6572.
- 67 **Deana A & Belasco JG (2005)** Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes & development* **19**: 2526-2533.

- 68 Del Campo JA, García-González M & Guerrero MG (2007) Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* **74**: 1163-1174.
- 69 Demmig-Adams B, Gilmore AM & Adams WW, 3rd (1996) Carotenoids 3: *in vivo* function of carotenoids in higher plants. *FASEB journal* **10**: 403-412.
- 70 Ding Y, Li J, Liu J, Yang J, Jiang W, Tian J, Li Y, Pan Y & Li J (2010) Deletion of the *ftsZ*-like gene results in the production of superparamagnetic magnetite magnetosomes in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Journal of bacteriology* **192**: 1097-1105.
- 71 Ditta G, Stanfield S, Corbin D & Helinski DR (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 7347-7351.
- 72 Dong H, Nilsson L & Kurland CG (1996) Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *Journal of molecular biology* **260**: 649-663.
- 73 Drepper T, Gross S, Yakunin AF, Hallenbeck PC, Masepohl B & Klipp W (2003) Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* **149**: 2203-2212.
- 74 Drepper T, Krauss U, Meyer zu Berstenhorst S, Pietruszka J & Jaeger KE (2011) Lights on and action! Controlling microbial gene expression by light. *Applied microbiology and biotechnology* **90**: 23-40.
- 75 Drews G & Golecki JR (2004) Structure, molecular organization, and biosynthesis of membranes of purple bacteria. *Anoxygenic photosynthetic bacteria*, Vol. 2 (Blankenship R, Madigan M & Bauer C), 231-257. Springer Netherlands.
- 76 Dubendorff JW & Studier FW (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. *Journal of molecular biology* **219**: 45-59.
- 77 Dunn JJ & Studier FW (1983) Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *Journal of molecular biology* **166**: 477-535.
- 78 Dunn SD (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. *Analytical biochemistry* **157**: 144-153.
- 79 Dunny GM, Lee LN & LeBlanc DJ (1991) Improved electroporation and cloning vector system for Gram-positive bacteria. *Applied and environmental microbiology* **57**: 1194-1201.
- 80 Eberl M, Hintz M, Reichenberg A, Kollas AK, Wiesner J & Jomaa H (2003) Microbial isoprenoid biosynthesis and human $\gamma\delta$ T cell activation. *FEBS letters* **544**: 4-10.
- 81 Eldar A & Elowitz MB (2010) Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature* **467**: 167-173.
- 82 Eppelmann K, Doekel S & Marahiel MA (2001) Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry* **276**: 34824-34831.
- 83 Ermolaeva MD (2001) Synonymous codon usage in bacteria. *Current issues in molecular biology* **3**: 91-97.
- 84 Escherich T (1885) Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte der Medizin* **3**: 515-522.
- 85 Evguenieva-Hackenberg E & Klug G (2009) RNA degradation in Archaea and Gram-negative bacteria different from *Escherichia coli*. *Progress in molecular biology and translational science* **85**: 275-317.
- 86 Farmer WR & Liao JC (2000) Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nature biotechnology* **18**: 533-537.
- 87 Fernández-Sevilla JM, Acien Fernández FG & Molina Grima E (2010) Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied microbiology and biotechnology* **86**: 27-40.
- 88 Ferrières L, Francez-Charlot A, Gouzy J, Rouillé S & Kahn D (2004) FixJ-regulated genes evolved through promoter duplication in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* **150**: 2335-2345.
- 89 Fischbach M & Voigt CA (2010) Prokaryotic gene clusters: a rich toolbox for synthetic biology. *Biotechnology journal* **5**: 1277-1296.
- 90 Flagfeldt DB, Siewers V, Huang L & Nielsen J (2009) Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **26**: 545-551.
- 91 Forst SA & Roberts DL (1994) Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Research in microbiology* **145**: 363-373.

- 92 Franceschi S, Bidoli E, La Vecchia C, Talamini R, D'Avanzo B & Negri E (1994) Tomatoes and risk of digestive-tract cancers. *International journal of cancer* **59**: 181-184.
- 93 Fraser PD, Misawa N, Linden H, Yamano S, Kobayashi K & Sandmann G (1992) Expression in *Escherichia coli*, purification, and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase. *The Journal of biological chemistry* **267**: 19891-19895.
- 94 Fraser PD, Miura Y & Misawa N (1997) *In vitro* characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *The Journal of biological chemistry* **272**: 6128-6135.
- 95 Frost LS (2009) Conjugation, Bacterial. *Encyclopedia of Microbiology*, (Schaechter M), 517-531. Academic Press, San Diego.
- 96 Fu J, Wenzel SC, Perlova O, Wang J, Gross F, Tang Z, Yin Y, Stewart AF, Müller R & Zhang Y (2008) Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition. *Nucleic acids research* **36**: e113.
- 97 Fu J, Bian X, Hu S, Wang H, Huang F, Seibert PM, Plaza A, Xia L, Müller R, Stewart AF & Zhang Y (2012) Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting. *Nature biotechnology* **30**: 440-446.
- 98 Fujii I (2009) Heterologous expression systems for polyketide synthases. *Natural product reports* **26**: 155-169.
- 99 Fujita M, Hanaura Y & Amemura A (1995) Analysis of the *rpoD* gene encoding the principal sigma factor of *Pseudomonas putida*. *Gene* **167**: 93-98.
- 100 Gallicchio L, Boyd K, Matanoski G, Tao XG, Chen L, Lam TK, Shiels M, Hammond E, Robinson KA, Caulfield LE, Herman JG, Guallar E & Alberg AJ (2008) Carotenoids and the risk of developing lung cancer: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition* **88**: 372-383.
- 101 Galm U & Shen B (2006) Expression of biosynthetic gene clusters in heterologous hosts for natural product production and combinatorial biosynthesis. *Expert Opinion on Drug Discovery* **1**: 409-437.
- 102 Gamer M, Fröde D, Biedendieck R, Stammen S & Jahn D (2009) A T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Bacillus megaterium*. *Applied microbiology and biotechnology* **82**: 1195-1203.
- 103 Garcia-Asua G, Cogdell RJ & Hunter CN (2002) Functional assembly of the foreign carotenoid lycopene into the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*, achieved by replacement of the native 3-step phytoene desaturase with its 4-step counterpart from *Erwinia herbicola*. *Molecular microbiology* **44**: 233-244.
- 104 García-Malea MC, Ación FG, Del Río E, Fernández JM, Cerón MC, Guerrero MG & Molina-Grima E (2009) Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the one-step system outdoors. *Biotechnology and bioengineering* **102**: 651-657.
- 105 Ghosh S, Rao KH, Sengupta M, Bhattacharya SK & Datta A (2011) Two gene clusters co-ordinate for a functional N-acetylglucosamine catabolic pathway in *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology* **80**: 1549-1560.
- 106 Gibson DG (2009) Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic acids research* **37**: 6984-6990.
- 107 Giordano TJ, Deuschle U, Bujard H & McAllister WT (1989) Regulation of coliphage T3 and T7 RNA polymerases by the *lac* repressor-operator system. *Gene* **84**: 209-219.
- 108 Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA & Willett WC (1995) Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **87**: 1767-1776.
- 109 Giovannucci E (1999) Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *Journal of the National Cancer Institute* **91**: 317-331.
- 110 Glaeser J & Klug G (2005) Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes. *Microbiology* **151**: 1927-1938.
- 111 Golecki J, Drews G & Bühler R (1979) The size and number of intramembrane particles in cells of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* studied by freeze-fracture electron microscopy. *Cytobiologie* **18**: 381-389.
- 112 Golecki JR, Schumacher A & Drews G (1980) The differentiation of the photosynthetic apparatus and the intracytoplasmic membrane in cells of *Rhodospseudomonas capsulata* upon variation of light intensity. *European journal of cell biology* **23**: 1-5.

- 113 **Golomb M & Chamberlin M (1974)** A preliminary map of the major transcription units read by T7 RNA polymerase on the T7 and T3 bacteriophage chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**: 760-764.
- 114 **Goodin S (2008)** Novel cytotoxic agents: epothilones. *American journal of health-system pharmacy* **65**: S10-15.
- 115 **Goodwin TW, Land DG & Sissins ME (1956)** Studies in carotenogenesis. 23. The nature of the carotenoids in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas spheroides* (athiorhodaceae). *Biochemical Journal* **64**: 486-480.
- 116 **Goryshin IY & Reznikoff WS (1998)** Tn5 in vitro transposition. *The Journal of biological chemistry* **273**: 7367-7374.
- 117 **Gradman RJ & Reznikoff WS (2008)** Tn5 synaptic complex formation: role of transposase residue W450. *Journal of bacteriology* **190**: 1484-1487.
- 118 **Gregor J & Klug G (2002)** Oxygen-regulated expression of genes for pigment binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **4**: 249-253.
- 119 **Grewe C & Griehl C (2008)** Time- and media-dependent secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology journal* **3**: 1232-1244.
- 120 **Grünberg R & Serrano L (2010)** Strategies for protein synthetic biology. *Nucleic acids research* **38**: 2663-2675.
- 121 **Haas MJ & Dowding JE (1975)** Aminoglycoside-modifying enzymes. *Methods in enzymology* **43**: 611-628.
- 122 **Hanahan D (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580.
- 123 **Handelsman J (2004)** Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews* **68**: 669-685.
- 124 **Hara M, Yuan H, Yang Q, Hoshino T, Yokoyama A & Miyake J (1999)** Stabilization of liposomal membranes by thermozeaxanthins: carotenoid-glucoside esters. *Biochimica et biophysica acta* **1461**: 147-154.
- 125 **Harada H & Misawa N (2009)** Novel approaches and achievements in biosynthesis of functional isoprenoids in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* **84**: 1021-1031.
- 126 **Harris AK, Williamson NR, Slater H, Cox A, Abbasi S, Foulds I, Simonsen HT, Leeper FJ & Salmond GP (2004)** The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. *Microbiology* **150**: 3547-3560.
- 127 **Harvey AL (2008)** Natural products in drug discovery. *Drug discovery today* **13**: 894-901.
- 128 **Heber D & Lu QY (2002)** Overview of mechanisms of action of lycopene. *Experimental biology and medicine* **227**: 920-923.
- 129 **Heim R, Prasher DC & Tsien RY (1994)** Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 12501-12504.
- 130 **Heinrich M & Gibbons S (2001)** Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **53**: 425-432.
- 131 **Herrero M, de Lorenzo V & Timmis KN (1990)** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* **172**: 6557-6567.
- 132 **Hoekema S, van Breukelen FR, Janssen M, Tramper J & Wijffels RH (2009)** Exploration of the hydrogen producing potential of *Rhodobacter capsulatus* chemostat cultures: The application of deceleration-stat and gradient-stat methodology. *Biotechnology progress* **25**: 1343-1352.
- 133 **Höfle G, Bedorf N, Steinmetz H, Schomburg D, Gerth K & Reichenbach H (1996)** Epothilone A and B—Novel 16-Membered Macrolides with Cytotoxic Activity: Isolation, Crystal Structure, and Conformation in Solution. *Angewandte Chemie* **35**: 1567-1569.
- 134 **Hornero-Méndez D & Britton G (2002)** Involvement of NADPH in the cyclization reaction of carotenoid biosynthesis. *FEBS letters* **515**: 133-136.
- 135 **Hundle B, Alberti M, Nievelstein V, Beyer P, Kleinig H, Armstrong GA, Burke DH & Hearst JE (1994)** Functional assignment of *Erwinia herbicola* Eho10 carotenoid genes expressed in *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics* **245**: 406-416.

- 136 Hundle BS, O'Brien DA, Beyer P, Kleinig H & Hearst JE (1993) *In vitro* expression and activity of lycopene cyclase and β -carotene hydroxylase from *Erwinia herbicola*. *FEBS letters* **315**: 329-334.
- 137 Hungate RE (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in microbiology*, Vol. 3B (Norris JR & Ribbons DW), 117-132. Academic Press, New York.
- 138 Hunsicker A, Steber M, Mayer G, Meitert J, Klotzsche M, Blind M, Hillen W, Berens C & Suess B (2009) An RNA aptamer that induces transcription. *Chemistry & biology* **16**: 173-180.
- 139 Hunter CN, Hundle BS, Hearst JE, Lang HP, Gardiner AT, Takaichi S & Cogdell RJ (1994) Introduction of new carotenoids into the bacterial photosynthetic apparatus by combining the carotenoid biosynthetic pathways of *Erwinia herbicola* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology* **176**: 3692-3697.
- 140 Hunter WN (2007) The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* **282**: 21573-21577.
- 141 Hurst LD, Pal C & Lercher MJ (2004) The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nature reviews. Genetics* **5**: 299-310.
- 142 Igarashi N, Harada J, Nagashima S, Matsuura K, Shimada K & Nagashima KV (2001) Horizontal transfer of the photosynthesis gene cluster and operon rearrangement in purple bacteria. *Journal of molecular evolution* **52**: 333-341.
- 143 Imhoff J (2006) The Phototrophic Alpha-Proteobacteria. *The Prokaryotes*, (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackebrandt E), 41-64. Springer New York.
- 144 Inoue H, Nojima H & Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- 145 Iost I, Guillerez J & Dreyfus M (1992) Bacteriophage T7 RNA polymerase travels far ahead of ribosomes *in vivo*. *Journal of bacteriology* **174**: 619-622.
- 146 Iost I & Dreyfus M (1995) The stability of *Escherichia coli lacZ* mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *The EMBO journal* **14**: 3252-3261.
- 147 Jacob F & Monod J (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology* **3**: 318-356.
- 148 Jäger S, Evguenieva-Hackenberg E & Klug G (2004a) Temperature-dependent processing of the *cspA* mRNA in *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* **150**: 687-695.
- 149 Jäger S, Hebermehl M, Schiltz E & Klug G (2004b) Composition and activity of the *Rhodobacter capsulatus* degradosome vary under different oxygen concentrations. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **7**: 148-154.
- 150 Jensen SL (1965) Biosynthesis and function of carotenoid pigments in microorganisms. *Annual review of microbiology* **19**: 163-182.
- 151 Jeong H, Barbe V, Lee CH, Vallenet D, Yu DS, Choi SH, Couloux A, Lee SW, Yoon SH, Cattolico L, Hur CG, Park HS, Ségurens B, Kim SC, Oh TK, Lenski RE, Studier FW, Daegelen P & Kim JF (2009) Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of molecular biology* **394**: 644-652.
- 152 Jiang PX, Wang HS, Zhang C, Lou K & Xing XH (2010) Reconstruction of the violacein biosynthetic pathway from *Duganella* sp. B2 in different heterologous hosts. *Applied microbiology and biotechnology* **86**: 1077-1088.
- 153 Kajiwara S, Fraser PD, Kondo K & Misawa N (1997) Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal* **324 (Pt 2)**: 421-426.
- 154 Kang Y, Son MS & Hoang TT (2007) One step engineering of T7-expression strains for protein production: increasing the host-range of the T7-expression system. *Protein expression and purification* **55**: 325-333.
- 155 Karig DK, Iyer S, Simpson ML & Doktycz MJ (2012) Expression optimization and synthetic gene networks in cell-free systems. *Nucleic acids research* **40**: 3763-3774.
- 156 Katzke N, Arvani S, Bergmann R, Circolone F, Markert A, Svensson V, Jaeger KE, Heck A & Drepper T (2010) A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein expression and purification* **69**: 137-146.
- 157 Keshavarz T & Roy I (2010) Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current opinion in microbiology* **13**: 321-326.

- 158 Khalil AS & Collins JJ (2010) Synthetic biology: applications come of age. *Nature reviews. Genetics* **11**: 367-379.
- 159 Khamduang M, Packdibamrung K, Chutmanop J, Chisti Y & Srinophakun P (2009) Production of L-phenylalanine from glycerol by a recombinant *Escherichia coli*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **36**: 1267-1274.
- 160 Khan SR, Gaines J, Roop RM, 2nd & Farrand SK (2008) Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Applied and environmental microbiology* **74**: 5053-5062.
- 161 Kim I-J, Ko K-C, Nam T-S, Kim Y-W, Chung W-I & Kim C-S (2003) Expression and activity of citrus phytoene synthase and β -carotene hydroxylase in *Escherichia coli*. *The Journal of Microbiology* **41**: 212-218.
- 162 Kim JY, Jo BH, Jo Y & Cha HJ (2012) Improved production of biohydrogen in light-powered *Escherichia coli* by co-expression of proteorhodopsin and heterologous hydrogenase. *Microbial cell factories* **11**: 2.
- 163 Klipp W, Masepohl B & Pühler A (1988) Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: duplication of a *nifA-nifB* region. *Journal of bacteriology* **170**: 693-699.
- 164 Komar AA, Lesnik T & Reiss C (1999) Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during *in vitro* translation. *FEBS letters* **462**: 387-391.
- 165 Kossel A (1891) Ueber die chemische Zusammensetzung der Zelle. *Archiv für Physiologie* 181-185.
- 166 Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd & Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBRR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- 167 Krebs MP & Reznikoff WS (1986) Transcriptional and translational initiation sites of IS50. Control of transposase and inhibitor expression. *Journal of molecular biology* **192**: 781-791.
- 168 Krinsky NI (2002) Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of nutrition* **132**: 540S-542S.
- 169 Kushnir S, Gase K, Breitling R & Alexandrov K (2005) Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein expression and purification* **42**: 37-46.
- 170 Kuzuya A, Tanaka K, Katada H & Komiyama M (2012) Enzyme treatment-free and ligation-independent cloning using caged primers in polymerase chain reactions. *Molecules* **17**: 328-340.
- 171 Labes M, Pühler 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.
- 172 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- 173 Laible PD, Scott HN, Henry L & Hanson DK (2004) Towards higher-throughput membrane protein production for structural genomics initiatives. *Journal of structural and functional genomics* **5**: 167-172.
- 174 Lale R, Berg L, Stüttgen F, Netzer R, Stafsnes M, Brautaset T, Vee Aune TE & Valla S (2011) Continuous control of the flow in biochemical pathways through 5' untranslated region sequence modifications in mRNA expressed from the broad-host-range promoter *Pm*. *Applied and environmental microbiology* **77**: 2648-2655.
- 175 Lam KS (2007) New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in microbiology* **15**: 279-289.
- 176 Landrum JT & Bone RA (2001) Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Archives of biochemistry and biophysics* **385**: 28-40.
- 177 Lange BM, Rujan T, Martin W & Croteau R (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13172-13177.
- 178 Lanka E & Wilkins BM (1995) DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annual review of biochemistry* **64**: 141-169.
- 179 Lee JH & Kim YT (2006) Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthesis gene cluster from the marine bacterium *Paracoccus haeundaensis*. *Gene* **370**: 86-95.
- 180 Lee JH, Li X & O'Sullivan DJ (2011) Transcription analysis of a lantibiotic gene cluster from *Bifidobacterium longum* DJO10A. *Applied and environmental microbiology* **77**: 5879-5887.
- 181 Lee S-S, Oh TJ, Kim J, Kim J-B & Lee H-S (2009a) Bacteriocin from purple nonsulfur phototrophic bacteria, *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology and Virology* **39**: 269-276.

- 182 Lee SF, Li YJ & Halperin SA (2009b) Overcoming codon-usage bias in heterologous protein expression in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* **155**: 3581-3588.
- 183 Leng F, Amado L & McMacken R (2004) Coupling DNA supercoiling to transcription in defined protein systems. *The Journal of biological chemistry* **279**: 47564-47571.
- 184 Leung MM, Florizone SM, Taylor TA, Lang AS & Beatty JT (2010) The gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. Recent advances in phototrophic prokaryotes. Vol. 675 (Hallenbeck PC), 253-264. Springer New York.
- 185 Levsikaya A, Chevalier AA, Tabor JJ, Simpson ZB, Lavery LA, Levy M, Davidson EA, Scouras A, Ellington AD, Marcotte EM & Voigt CA (2005) Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature* **438**: 441-442.
- 186 Li H, Xu F, Ren X & Chen S (2010) Functional analysis of the *fixL/fixJ* and *fixK* genes in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Annals of Microbiology* **60**: 469-480.
- 187 Li MH, Ung PM, Zajkowski J, Garneau-Tsodikova S & Sherman DH (2009) Automated genome mining for natural products. *BMC bioinformatics* **10**: 185.
- 188 Lian F & Wang XD (2008) Enzymatic metabolites of lycopene induce Nrf2-mediated expression of phase II detoxifying/antioxidant enzymes in human bronchial epithelial cells. *International journal of cancer* **123**: 1262-1268.
- 189 Lichtenthaler HK (2007) Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, alpha-tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis research* **92**: 163-179.
- 190 Lindquist S (1986) The heat-shock response. *Annual review of biochemistry* **55**: 1151-1191.
- 191 Loane E, Kelliher C, Beatty S & Nolan JM (2008) The rationale and evidence base for a protective role of macular pigment in age-related maculopathy. *The British journal of ophthalmology* **92**: 1163-1168.
- 192 Loeschcke A (2008) Bakterielle Produktion von Carotinoiden unter Verwendung des IVAC-Systems. Diplomarbeit, Universität zu Köln, Köln.
- 193 Lussier FX, Denis F & Shareck F (2010) Adaptation of the highly productive T7 expression system to *Streptomyces lividans*. *Applied and environmental microbiology* **76**: 967-970.
- 194 Ma H, Kunes S, Schatz PJ & Botstein D (1987) Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* **58**: 201-216.
- 195 Ma N & McAllister WT (2009) In a head-on collision, two RNA polymerases approaching one another on the same DNA may pass by one another. *Journal of molecular biology* **391**: 808-812.
- 196 Makarova OV, Makarov EM, Sousa R & Dreyfus M (1995) Transcribing of *Escherichia coli* genes with mutant T7 RNA polymerases: stability of *lacZ* mRNA inversely correlates with polymerase speed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 12250-12254.
- 197 Markert A (2008) Etablierung eines neuen T7 RNA-Polymerase-abhängigen Expressionssystems zur koordinierten Expression aller Gene einer Genregion. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- 198 Marusich WL & Bauernfeind JC (1981) Oxycarotenoids in poultry feed. *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*, (Bauernfeind JC), 320-441. Academic Press, New York.
- 199 Masepohl B, Klipp W & Pühler A (1988) Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular & general genetics* **212**: 27-37.
- 200 Masepohl B & Hallenbeck PC (2010) Nitrogen and molybdenum control of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Advances in experimental medicine and biology* **675**: 49-70.
- 201 McAllister WT, Morris C, Rosenberg AH & Studier FW (1981) Utilization of bacteriophage T7 late promoters in recombinant plasmids during infection. *Journal of molecular biology* **153**: 527-544.
- 202 Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E & Breitling R (2011a) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research* **39**: W339-346.
- 203 Medema MH, Breitling R, Bovenberg R & Takano E (2011b) Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms. *Nature reviews. Microbiology* **9**: 131-137.

- 204 **Medema MH, van Raaphorst R, Takano E & Breitling R (2012)** Computational tools for the synthetic design of biochemical pathways. *Nature reviews. Microbiology* **10**: 191-202.
- 205 **Miki W (1991)** Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure & Applied Chemistry* **63**: 141-146.
- 206 **Miller JH (1972)** Experiments in molecular genetics. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 207 **Miller WG & Simons RW (1993)** Chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **10**: 675-684.
- 208 **Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K, Yamano S, Izawa Y, Nakamura K & Harashima K (1990)** Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **172**: 6704-6712.
- 209 **Misawa N, Satomi Y, Kondo K, Yokoyama A, Kajiwara S, Saito T, Ohtani T & Miki W (1995)** Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *Journal of bacteriology* **177**: 6575-6584.
- 210 **Mishra NN, Liu GY, Yeaman MR, Nast CC, Proctor RA, McKinnell J & Bayer AS (2011)** Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts *Staphylococcus aureus* susceptibility to host defense peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 526-531.
- 211 **Möglich A, Ayers RA & Moffat K (2009)** Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. *Journal of molecular biology* **385**: 1433-1444.
- 212 **Möglich A & Moffat K (2010)** Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools. *Photochemical & photobiological sciences* **9**: 1286-1300.
- 213 **Molnár J, Serly J, Pusztai R, Vincze I, Molnár P, Horváth G, Deli J, Maoka T, Zalatnai A, Tokuda H & Nishino H (2012)** Putative supramolecular complexes formed by carotenoids and xanthophylls with ascorbic acid to reverse multidrug resistance in cancer cells. *Anticancer research* **32**: 507-517.
- 214 **Morgan SA, Al-Abdul-Wahid S & Woolley GA (2010)** Structure-based design of a photocontrolled DNA binding protein. *Journal of molecular biology* **399**: 94-112.
- 215 **Morgan SA & Woolley GA (2010)** A photoswitchable DNA-binding protein based on a truncated GCN4-photoactive yellow protein chimera. *Photochemical & photobiological sciences* **9**: 1320-1326.
- 216 **Naumann TA & Reznikoff WS (2002)** Tn5 transposase with an altered specificity for transposon ends. *Journal of bacteriology* **184**: 233-240.
- 217 **Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VA, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris Lee P, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen JA, Timmis KN, Düsterhöft A, Tümmler B & Fraser CM (2002)** Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology* **4**: 799-808.
- 218 **Neudert U, Martínez-Férez IM, Fraser PD & Sandmann G (1998)** Expression of an active phytoene synthase from *Erwinia uredovora* and biochemical properties of the enzyme. *Biochimica et biophysica acta* **1392**: 51-58.
- 219 **Newman DJ, Cragg GM & Snader KM (2000)** The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports* **17**: 215-234.
- 220 **Newman DJ & Cragg GM (2012)** Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products* **75**: 311-335.
- 221 **Nguyen T, Ishida K, Jenke-Kodama H, Dittmann E, Gurgui C, Hochmuth T, Taudien S, Platzer M, Hertweck C & Piel J (2008)** Exploiting the mosaic structure of *trans*-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection. *Nature biotechnology* **26**: 225-233.
- 222 **Nikel PI & de Lorenzo V (2012)** Implantation of unmarked regulatory and metabolic modules in Gram-negative bacteria with specialised mini-transposon delivery vectors. *Journal of biotechnology* **163**: 143-154
- 223 **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*. *Applied and environmental microbiology* **73**: 1355-1361.

- 224 **Noguchi T, Hayashi H & Tasumi M (1990)** Factors controlling the efficiency of energy transfer from carotenoids to bacteriochlorophyll in purple photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1017**: 280-290.
- 225 **Ohlendorf R, Vidavski RR, Eldar A, Moffat K & Möglich A (2012)** From dusk till dawn: One-plasmid systems for light-regulated gene expression. *Journal of molecular biology* **416**: 534-542.
- 226 **Okada K (2011)** The biosynthesis of isoprenoids and the mechanisms regulating it in plants. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **75**: 1219-1225.
- 227 **Olson JA & Krinsky NI (1995)** Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *FASEB journal* **9**: 1547-1550.
- 228 **Ōmura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y & Hattori M (2001)** Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 12215-12220.
- 229 **Osborn A (2010)** Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends in genetics* **26**: 449-457.
- 230 **Pawson T & Nash P (2003)** Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **300**: 445-452.
- 231 **Petković H, Cullum J, Hranueli D, Hunter IS, Perić-Concha N, Pigac J, Thamchaipenet A, Vujaklija D & Long PF (2006)** Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer. *Microbiology and molecular biology reviews* **70**: 704-728.
- 232 **Peto R, Doll R, Buckley JD & Sporn MB (1981)** Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* **290**: 201-208.
- 233 **Pettit RK (2011)** Culturability and secondary metabolite diversity of extreme microbes: expanding contribution of deep sea and deep-sea vent microbes to natural product discovery. *Marine biotechnology* **13**: 1-11.
- 234 **Pfander H (1992)** [1] Carotenoids: An overview. *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 213 (Lester P), 3-13. Academic Press.
- 235 **Pickens LB, Tang Y & Chooi YH (2011)** Metabolic engineering for the production of natural products. *Annual review of chemical and biomolecular engineering* **2**: 211-236.
- 236 **Piel J (2004)** Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural product reports* **21**: 519-538.
- 237 **Piel J (2011)** Approaches to capturing and designing biologically active small molecules produced by uncultured microbes. *Annual review of microbiology* **65**: 431-453.
- 238 **Pintea A, Diehl HA, Momeu C, Aberle L & Socaciu C (2005)** Incorporation of carotenoid esters into liposomes. *Biophysical chemistry* **118**: 7-14.
- 239 **Poon SK, Peacock L, Gibson W, Gull K & Kelly S (2012)** A modular and optimized single marker system for generating *Trypanosoma brucei* cell lines expressing T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor. *Open biology* **2**: 110037.
- 240 **Puchalka J, Oberhardt MA, Godinho M, Bielecka A, Regenhardt D, Timmis KN, Papin JA & Martins dos Santos VAP (2008)** Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. *PLoS Comput Biol* **4**: e1000210.
- 241 **Rademacher C, Hoffmann MC, Lackmann JW, Moser R, Pfänder Y, Leimkühler S, Narberhaus F & Masepohl B (2012)** Tellurite resistance gene *trgB* confers copper tolerance to *Rhodobacter capsulatus*. *Biometals* **25**: 995-1008
- 242 **Raja A, Lebbos J & Kirkpatrick P (2004)** Telithromycin. *Nature reviews. Drug discovery* **3**: 733-734.
- 243 **Reddy BV, Kallifidas D, Kim JH, Charlop-Powers Z, Feng Z & Brady SF (2012)** Natural product biosynthetic gene diversity in geographically distinct soil microbiomes. *Applied and environmental microbiology* **78**: 3744-3752.
- 244 **Reeves AR, English RS, Lampel JS, Post DA & Vanden Boom TJ (1999)** Transcriptional organization of the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea*. *Journal of bacteriology* **181**: 7098-7106.
- 245 **Reva O & Tümmler B (2008)** Think big - giant genes in bacteria. *Environmental microbiology* **10**: 768-777.
- 246 **Reznikoff WS (2008)** Transposon Tn5. *Annual review of genetics* **42**: 269-286.

- 247 **Roberts TM, Kacich R & Ptashne M (1979)** A general method for maximizing the expression of a cloned gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 760-764.
- 248 **Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B & Sahm H (1993)** Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *The biochemical journal* **295 (Pt 2)**: 517-524.
- 249 **Rohmer M, Grosdemange-Billiard C, Seemann M & Tritsch D (2004)** Isoprenoid biosynthesis as a novel target for antibacterial and antiparasitic drugs. *Current opinion in investigational drugs* **5**: 154-162.
- 250 **Rosenberg AH, Lade BN, Chui DS, Lin SW, Dunn JJ & Studier FW (1987)** Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**: 125-135.
- 251 **Rozen S & Skaletsky H (2000)** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology* **132**: 365-386.
- 252 **Ruiz B, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, Rocha D, Sánchez B, Rodríguez-Sanoja R, Sanchez S & Langley E (2010)** Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical reviews in microbiology* **36**: 146-167.
- 253 **Ruther A, Misawa N, Böger P & Sandmann G (1997)** Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformed with different carotenogenic plasmids. *Applied microbiology and biotechnology* **48**: 162-167.
- 254 **Samal A & Jain S (2008)** The regulatory network of *E. coli* metabolism as a Boolean dynamical system exhibits both homeostasis and flexibility of response. *BMC systems biology* **2**: 21.
- 255 **Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989)** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 256 **Samuelson JC (2011)** Recent developments in difficult protein expression: a guide to *E. coli* strains, promoters, and relevant host mutations. *Methods in molecular biology* **705**: 195-209.
- 257 **Saunders R & Deane CM (2010)** Synonymous codon usage influences the local protein structure observed. *Nucleic acids research* **38**: 6719-6728.
- 258 **Schelle B & Thiel V (2002)** T7 RiboMAX™ Express: Generation of 27kb *in vitro* transcripts in minutes. Vol. 2012 Promega Corporation.
- 259 **Schnurr G, Misawa N & Sandmann G (1996)** Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora*. *The Biochemical journal* **315 (Pt 3)**: 869-874.
- 260 **Schulz VP & Reznikoff WS (1991)** Translation initiation of IS50R read-through transcripts. *Journal of molecular biology* **221**: 65-80.
- 261 **Schumann G, Nürnberger H, Sandmann G & Krügel H (1996)** Activation and analysis of cryptic *crt* genes for carotenoid biosynthesis from *Streptomyces griseus*. *Molecular & general genetics* **252**: 658-666.
- 262 **Schwecke T, Aparicio JF, Molnár I, König A, Khaw LE, Haydock SF, Oliynyk M, Caffrey P, Cortés J, Lester JB, Böhm GA, Staunton J & Leadlay PF (1995)** The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 7839-7843.
- 263 **Schweizer HD (1993)** Small broad-host-range gentamycin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *BioTechniques* **15**: 831-834.
- 264 **Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD, Hiller R, Blair N, Burton TC, Farber MD, Gragoudas ES, Haller J, Miller DT, Yannuzzi LA & Willett W (1994)** Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *JAMA* **272**: 1413-1420.
- 265 **Semba RD (1994)** Vitamin A, immunity, and infection. *Clinical infectious diseases* **19**: 489-499.
- 266 **Sheng Y, Mancino V & Birren B (1995)** Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic acids research* **23**: 1990-1996.
- 267 **Shevchenko Y, Bouffard GG, Butterfield YS, Blakesley RW, Hartley JL, Young AC, Marra MA, Jones SJ, Touchman JW & Green ED (2002)** Systematic sequencing of cDNA clones using the transposon Tn5. *Nucleic acids research* **30**: 2469-2477.
- 268 **Shin CS, Hong MS, Bae CS & Lee J (1997)** Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2]. *Biotechnology progress* **13**: 249-257.

- 269 Shizuya H, Birren B, Kim UJ, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 8794-8797.
- 270 Shizuya H & Kouros-Mehr H (2001) The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system. *The Keio journal of medicine* **50**: 26-30.
- 271 Simon R, Priefer U & Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nature Biotechnology* **1**: 784-791.
- 272 Simpson KL, Katayama T & Chichester CO (1981) Carotenoids in fish feed. *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*, (Bauernfeind JC), 463-538. Academic Press, New York.
- 273 Singh J, Behal A, Singla N, Joshi A, Birbian N, Singh S, Bali V & Batra N (2009) Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnology journal* **4**: 480-494.
- 274 Slover CM, Rodvold KA & Danziger LH (2007) Tigecycline: a novel broad-spectrum antimicrobial. *The Annals of pharmacotherapy* **41**: 965-972.
- 275 Smith BJ, Gutierrez P, Guerrero E, Brewer CJ & Henderson DP (2011) Development of a method to produce hemoglobin in a bioreactor culture of *Escherichia coli* BL21(DE3) transformed with a plasmid containing *Plesiomonas shigelloides* heme transport genes and modified human hemoglobin genes. *Applied and environmental microbiology* **77**: 6703-6705.
- 276 Smith MA & Bidochka MJ (1998) Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Canadian journal of microbiology* **44**: 351-355.
- 277 Sommer A (1994) Vitamin A: its effect on childhood sight and life. *Nutrition reviews* **52**: S60-66.
- 278 Sousa C, de Lorenzo V & Cebolla A (1997) Modulation of gene expression through chromosomal positioning in *Escherichia coli*. *Microbiology* **143** (Pt 6): 2071-2078.
- 279 Starcevic A, Zucko J, Simunkovic J, Long PF, Cullum J & Hranueli D (2008) *ClustScan*: an integrated program package for the semi-automatic annotation of modular biosynthetic gene clusters and *in silico* prediction of novel chemical structures. *Nucleic acids research* **36**: 6882-6892.
- 280 Steffensky M, Mühlenweg A, Wang ZX, Li SM & Heide L (2000) Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**: 1214-1222.
- 281 Stein LD (2010) The case for cloud computing in genome informatics. *Genome biology* **11**: 207.
- 282 Steiniger M, Adams CD, Marko JF & Reznikoff WS (2006) Defining characteristics of Tn5 Transposase non-specific DNA binding. *Nucleic acids research* **34**: 2820-2832.
- 283 Stevens DC, Henry MR, Murphy KA & Boddy CN (2010) Heterologous expression of the oxytetracycline biosynthetic pathway in *Myxococcus xanthus*. *Applied and environmental microbiology* **76**: 2681-2683.
- 284 Strickland D, Moffat K & Sosnick TR (2008) Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 10709-10714.
- 285 Strickland D, Yao X, Gawlak G, Rosen MK, Gardner KH & Sosnick TR (2010) Rationally improving LOV domain-based photoswitches. *Nature methods* **7**: 623-626.
- 286 Striedner G, Pfaffenzeller I, Markus L, Nemecek S, Grabherr R & Bayer K (2010) Plasmid-free T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnology and bioengineering* **105**: 786-794.
- 287 Strnad H, Lapidus A, Paces J, Ulbrich P, Vlcek C, Paces V & Haselkorn R (2010) Complete genome sequence of the photosynthetic purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB 1003. *Journal of bacteriology* **192**: 3545-3546.
- 288 Studier FW (1972) Bacteriophage T7. *Science* **176**: 367-376.
- 289 Studier FW & Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* **189**: 113-130.
- 290 Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ & Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in enzymology* **185**: 60-89.
- 291 Sueoka N (1961) Compositional correlation between deoxyribonucleic acid and protein. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **26**: 35-43.

- 292 Sum P-E, Lee VJ, Testa RT, Hlavka JJ, Ellestad GA, Bloom JD, Gluzman Y & Tally FP (1994) Glycylcyclines. 1. A new generation of potent antibacterial agents through modification of 9-aminotetracyclines. *Journal of medicinal chemistry* **37**: 184-188.
- 293 Swords WE (2003) Chemical transformation of *E. coli*. *Methods in molecular biology* **235**: 49-53.
- 294 Tabor JJ, Salis HM, Simpson ZB, Chevalier AA, Levskaya A, Marcotte EM, Voigt CA & Ellington AD (2009) A synthetic genetic edge detection program. *Cell* **137**: 1272-1281.
- 295 Tabor JJ, Levskaya A & Voigt CA (2011) Multichromatic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **405**: 315-324.
- 296 Tabor S & Richardson CC (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase / promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 1074-1078.
- 297 Temme K, Zhao D & Voigt CA (2012) Refactoring the nitrogen fixation gene cluster from *Klebsiella oxytoca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 7085-7090.
- 298 Teng F, Murray BE & Weinstock GM (1998) Conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to enterococci: a method to make insertion mutations. *Plasmid* **39**: 182-186.
- 299 Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* **72**: 211-222.
- 300 Thomas CM & Nielsen KM (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews. Microbiology* **3**: 711-721.
- 301 Timmis KN (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist *par excellence*. *Environmental microbiology* **4**: 779-781.
- 302 Tuller T, Carmi A, Vestsigian K, Navon S, Dorfan Y, Zaborske J, Pan T, Dahan O, Furman I & Pilpel Y (2010) An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. *Cell* **141**: 344-354.
- 303 Tuveson RW, Larson RA & Kagan J (1988) Role of cloned carotenoid genes expressed in *Escherichia coli* in protecting against inactivation by near-UV light and specific phototoxic molecules. *Journal of bacteriology* **170**: 4675-4680.
- 304 Tyo KE, Ajikumar PK & Stephanopoulos G (2009) Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. *Nature biotechnology* **27**: 760-765.
- 305 Vadali RV, Fu Y, Bennett GN & San KY (2005) Enhanced lycopene productivity by manipulation of carbon flow to isopentenyl diphosphate in *Escherichia coli*. *Biotechnology progress* **21**: 1558-1561.
- 306 Vaishnav P & Demain AL (2011) Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology advances* **29**: 223-229.
- 307 van den Berg H, Faulks R, Fernando Granado H, Hirschberg J, Olmedilla B, Sandmann G, Southon S & Stahl W (2000) The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 880-912.
- 308 van Duuren JB, Wijte D, Leprince A, Karge B, Puchałka J, Wery J, Dos Santos VA, Eggink G & Mars AE (2011) Generation of a *catR* deficient mutant of *P. putida* KT2440 that produces *cis, cis*-muconate from benzoate at high rate and yield. *Journal of biotechnology* **156**: 163-172.
- 309 van Hijum SA, Medema MH & Kuipers OP (2009) Mechanisms and evolution of control logic in prokaryotic transcriptional regulation. *Microbiology and molecular biology reviews* **73**: 481-509.
- 310 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.
- 311 Vignais PM, Dimon B, Zorin NA, Tomiyama M & Colbeau A (2000) Characterization of the hydrogen-deuterium exchange activities of the energy-transducing HupSL hydrogenase and H₂-signaling HupUV hydrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of bacteriology* **182**: 5997-6004.
- 312 von Lintig J & Vogt K (2004) Vitamin A formation in animals: molecular identification and functional characterization of carotene cleaving enzymes. *The Journal of nutrition* **134**: 251S-256S.
- 313 Wagner A (2007) Energy costs constrain the evolution of gene expression. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution* **308**: 322-324.

- 314 **Walsh CT & Fischbach MA (2010)** Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 2469-2493.
- 315 **Wang D, Zhang Y, Pohlmann EL, Li J & Roberts GP (2011)** The poor growth of *Rhodospirillum rubrum* mutants lacking RubisCO is due to the accumulation of ribulose-1,5-bisphosphate. *Journal of bacteriology* **193**: 3293-3303.
- 316 **Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR & Church GM (2009)** Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature* **460**: 894-898.
- 317 **Wang Q & Nomura CT (2010)** Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. *Journal of bioscience and bioengineering* **110**: 653-659.
- 318 **Weaver PF, Wall JD & Gest H (1975)** Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Archives of microbiology* **105**: 207-216.
- 319 **Weber T, Rausch C, Lopez P, Hoof I, Gaykova V, Huson DH & Wohlleben W (2009)** CLUSEAN: a computer-based framework for the automated analysis of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Journal of biotechnology* **140**: 13-17.
- 320 **Wenzel SC, Gross F, Zhang Y, Fu J, Stewart AF & Müller R (2005)** Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in pseudomonads via Red/ET recombineering. *Chemistry & biology* **12**: 349-356.
- 321 **West AH & Stock AM (2001)** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in biochemical sciences* **26**: 369-376.
- 322 **Widenhorn KA, Somers JM & Kay WW (1988)** Expression of the divergent tricarboxylate transport operon (*tctl*) of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **170**: 3223-3227.
- 323 **Winsor GL, Lam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, Hancock RE & Brinkman FS (2011)** Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic acids research* **39**: D596-600.
- 324 **Wirth R, Friesenegger A & Fiedler S (1989)** Transformation of various species of Gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Molecular & general genetics* **216**: 175-177.
- 325 **Wirtz E, Leal S, Ochatt C & Cross GA (1999)** A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* **99**: 89-101.
- 326 **Wittgens A, Tiso T, Arndt TT, Wenk P, Hemmerich J, Müller C, Wichmann R, Küpper B, Zwick M, Wilhelm S, Hausmann R, Sylodat C, Rosenau F & Blank LM (2011)** Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial cell factories* **10**: 80.
- 327 **Wohlleben W, Arnold W, Bissonnette L, Pelletier A, Tanguay A, Roy PH, Gamboa GC, Barry GF, Aubert E, Davies J & Kagan SA (1989)** On the evolution of Tn21-like multiresistance transposons: sequence analysis of the gene (*aacC1*) for gentamicin acetyltransferase-3-I(AAC(3)-I), another member of the Tn21-based expression cassette. *Molecular & general genetics* **217**: 202-208.
- 328 **Woodall CA (2003a)** Electroporation of *E. coli*. *Methods in molecular biology* **235**: 55-69.
- 329 **Woodall CA (2003b)** DNA transfer by bacterial conjugation. *Methods in molecular biology* **235**: 61-65.
- 330 **Wu X, Monchy S, Taghavi S, Zhu W, Ramos J & van der Lelie D (2011)** Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS microbiology reviews* **35**: 299-323.
- 331 **Yanisch-Perron C, Vieira J & Messing J (1985)** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- 332 **Ye VM & Bhatia SK (2012)** Pathway engineering strategies for production of beneficial carotenoids in microbial hosts. *Biotechnology letters*.
- 333 **Yeh KC, Wu SH, Murphy JT & Lagarias JC (1997)** A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* **277**: 1505-1508.
- 334 **Yim H, Haselbeck R, Niu W, Pujol-Baxley C, Burgard A, Boldt J, Khandurina J, Trawick JD, Osterhout RE, Stephen R, Estadilla J, Teisan S, Schreyer HB, Andrae S, Yang TH, Lee SY, Burk MJ & Van Dien S (2011)** Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nature chemical biology* **7**: 445-452.

- 335 Yoon SH, Park HM, Kim JE, Lee SH, Choi MS, Kim JY, Oh DK, Keasling JD & Kim SW (2007) Increased β -carotene production in recombinant *Escherichia coli* harboring an engineered isoprenoid precursor pathway with mevalonate addition. *Biotechnology progress* **23**: 599-605.
- 336 Yoon SH, Lee SH, Das A, Ryu HK, Jang HJ, Kim JY, Oh DK, Keasling JD & Kim SW (2009) Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of β -carotene in *E. coli*. *Journal of biotechnology* **140**: 218-226.
- 337 Young DD & Deiters A (2007) Photochemical activation of protein expression in bacterial cells. *Angewandte Chemie* **46**: 4290-4292.
- 338 Youssef PN, Sheibani N & Albert DM (2011) Retinal light toxicity. *Eye* **25**: 1-14.
- 339 Yu Q, Du A, Liu T, Deng Z & He X (2012) The biosynthesis of the polyether antibiotic nanchangmycin is controlled by two pathway-specific transcriptional activators. *Archives of microbiology* **194**: 415-426.
- 340 Yuan LZ, Rouvière PE, Larossa RA & Suh W (2006) Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metabolic engineering* **8**: 79-90.
- 341 Zerbs S, Frank AM & Collart FR (2009) Bacterial systems for production of heterologous proteins. *Methods in enzymology* **463**: 149-168.
- 342 Zhang H, Wang Y & Pfeifer BA (2008) Bacterial hosts for natural product production. *Molecular pharmaceutics* **5**: 212-225.
- 343 Zhang H, Boghigian BA, Armando J & Pfeifer BA (2011) Methods and options for the heterologous production of complex natural products. *Natural product reports* **28**: 125-151.
- 344 Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP & Stewart AF (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature genetics* **20**: 123-128.
- 345 Zhao JB & Wei DZ (2007) Use of a derivative of *Escherichia coli* BL21(DE3) for efficient production of three different recombinant proteins. *Biotechnology progress* **23**: 1043-1048.
- 346 Zhao Y, Wang S & Zhu J (2011) A multi-step strategy for BAC recombineering of large DNA fragments. *International journal of biochemistry and molecular biology* **2**: 199-206.
- 347 Zimmer M (2002) Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical reviews* **102**: 759-781.

LEBENS LAUF

Name: Anita Loeschke
geboren: 21.01.1984, Köln

SCHULE	1994 – 2003 2003	Friedrich-Wilhelm-Gymnasium, Köln Abitur
STUDIUM	2003 – 2008 2005 2005 – 2007	Biologiestudium, Universität zu Köln Vordiplom Hauptstudium, Schwerpunkte: Biochemie Entwicklungsbiologie Pharmakologie
	2008	Diplom, Titel der Diplomarbeit: „Bakterielle Produktion von Carotinoiden unter Verwendung des IVAC-Systems.“
PROMOTION	seit Mai 2009	Promotionsstipendium des CLIB-Graduate Clusters Titel der Dissertation: „Funktionelle Koexpression geclusterter Gene mithilfe des TREX-Systems.“

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.

Köln, den 06.09.2012

Anita Loeschcke