

# Anwendung und Optimierung des TREX-Systems zur effektiven heterologen Sekundärmetabolit-Produktion in *Pseudomonas putida*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Andreas Domröse** 

aus Neuss

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. Jörg Pietruszka

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2017

Nurwonigo wisson wie viel men wissen muss um zu wissen
"Nur wenige wissen, wie viel man wissen muss, um zu wissen,
wie wenig man weiß."
Werner Heisenberg

## Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

#### **Publikationen**

<u>Domröse A</u>, Klein AS, Hage-Hülsmann J, Thies S, Svensson V, Classen T, Pietruszka J, Jaeger KE, Drepper T, Loeschcke A (2015): Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*, Front. Microbiol. 6:972 doi: 10.3389/fmicb.2015.00972

Klein AS, <u>Domröse A</u>, Bongen P, Brass H, Classen T, Loeschcke A, Drepper T, Laraia L, Sievers S, Jaeger KE, Pietruszka J (2017): New Prodigiosin Derivatives obtained by Mutasynthesis in *Pseudomonas putida*. (Manuskript bei ACS Synthetic Biology eingereicht)

<u>Domröse A</u>, Weihmann R, Thies S, Jaeger KE, Drepper T, Loeschcke A (2017): Rapid generation of recombinant Pseudomonas putida secondary metabolite producers using yTREX. (Manuskript in Vorbereitung)

#### Präsentationen auf internationalen Konferenzen

Hage-Hülsmann J, Grünberger A, Thies S, <u>Domröse A</u>, Klein AS, Binder D, Hilgers F, Kohlheyer D, Pietruszka J, Jaeger KE, Drepper T, Loeschcke A (2016): Combinatorial antibiotic effects of natural biocide cocktails. IV International Conference on Antimicrobial Research. Malaga/Esp, 29.06-01.07.2016 Poster

Thies S, Loeschcke A, <u>Domröse A</u>, Klein AS, Pietruszka J,. Hilgers F, Weihmann R, Binder D, Troost K, Jaeger KE, Drepper T (2016): Novel microbial production strategies for natural products with antimicrobial properties. IV International Conference on Antimicrobial Research. Malaga/Esp, 29.06-01.07.2016 Poster

<u>Domröse A</u> (2016): Functional expression of clustered genes encoding biosynthetic pathways. 7th CLIB-GC Student Symposium "From Gene to Protein and Beyond". Düsseldorf/D, 08.04.2016 **Vortrag auf Einladung** 

<u>Domröse A</u>, Weihmann R, Klein AS, Pietruszka J, Jaeger KE, Thomas Drepper T, Anita Loeschcke A (2016): yTREX - update of a synthetic biology tool for effective gene cluster cloning and secondary metabolite production. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Jena/D, 13.03-16.03.2016 Poster

Klein AS, <u>Domröse A</u>, Loeschcke A, Classen T, Drepper T, Jaeger KE, Pietruszka J (2016): Chemoenzymatic Production of Prodiginines. Irseer Naturstofftage, Irsee/D 24-26.02.2016 **Poster und** Kurzvortrag

<u>Domröse A</u>, Klein AS, Hage-Hülsmann J, Pietruszka J, Jaeger KE, Drepper T, Loeschcke A (2015): TREX — a synthetic biology tool used for the bacterial production of prodigiosin. 6th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics ProkaGENOMICS. Göttingen/D, 29.09-02.10.2015 **Poster** 

Klein AS, <u>Domröse A</u>, Loeschcke A, Jaeger KE, Drepper T, Pietruszka J (2015): Chemo-enzymatic production of the Antibiotic Prodigiosin in Pseudomonas putida. IV. Symposium of the Interdisciplinary Graduate School of Natural Products Research , Saarbrücken/D, 05.08.2015 Poster und Vortrag

Loeschcke A, Thies S, Hage-Hülsmann J, Grünberger A, Binder D, <u>Domröse A</u>, Klein A, Kohlheyer D., <u>Pietruszka J, Jaeger KE, Drepper T (2015)</u>: Heterologous production of antibacterial secondary metabolites from Serratia marcescens in Pseudomonas putida. FEMS 6th Congress of European Microbiologists. Maastricht/NL, 07-11.06.2015 **Poster und Vortrag** 

Klein AS, <u>Domröse A</u>, Loeschcke A, Jaeger KE, Drepper T, Pietruszka J (2015): Chemoenzymaticproduction of the antibiotic prodigiosin in *Pseudomonas putida*. Directing Biosynthesis IV. Norwich/UK, 25-27.3.2015 **Poster** 

<u>Domröse A</u>, Klein AS, Pietruszka J., Loeschcke A., Drepper T., Jaeger KE (2014): Bacterial production of high-value compounds by heterologous expression of clustered genes using TREX. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Dresden/D, 05-08.10.2014 Poster, Gewinner des VAAM-Posterpreises.

Klein A, <u>Domröse A</u>, <u>Loeschcke A</u>, <u>Jaeger KE</u>, <u>Drepper T</u>, <u>Pietruszka J (2014)</u>: Chemo-enzymatic production of the antibiotic prodigiosin. EMBO Conference on Synthetic Biology of Antibiotic Production II. Sant Feliu de Guixols/Esp, 30.08-04.09.2014 **Poster** 

## **Danksagung**

Diese Seite möchte ich all jenen widmen, die mich während dieser Arbeit in irgendeiner Art und Weise unterstützt haben.

Beginnen möchte ich bei Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger. Diesem danke ich, für die Überlassung des sehr interessanten Themas und die Möglichkeit dieses am Institut für Molekulare Enzymtechnologie unter tollen wissenschaftlichen und zwischenmenschlichen Bedingungen bearbeiten zu können.

Herrn Prof. Dr. Jörg Pietruszka danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Dr. Thomas Drepper und Dr. Anita Loeschcke danke ich für die hervorragende und engagierte Betreuung während der gesamten Zeit der Doktorarbeit. Ihr hattet immer ein offenes Ohr für meine Probleme und tolle Ratschläge für deren Lösungen. Auch für die Durchsicht dieser Arbeit gebührt euch mein Dank.

Dem CLIB-Graduate Cluster danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit durch ein Promotionsstipendium. Besonders möchte ich mich bei Dr. Sonja Meyer zu Berstenhorst, Dr. Jennifer Pahlke, Dr. Martina Holz und Dr. Jessica Hilbig für die tolle Koordination des Graduate Clusters und seiner Veranstaltungen bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem zentralen Kooperationspartner des hier bearbeiteten Projekts, dem Institut für Bioorganische Chemie (Leitung Prof. Dr. Jörg Pietruszka), hierbei seien besonders Andreas Sebastian Klein sowie Dr. Thomas Classen zu erwähnen, es war eine tolle und fruchtbare Zeit der Zusammenarbeit.

Des Weiteren gebührt mein Dank dem gesamten Institut für Molekulare Enzymtechnologie, besonders den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der AG Drepper, ohne Euch wäre die Zeit nur halb so schön gewesen und ohne Labor 409 nur halb so lustig. Im Speziellen möchte ich mich bei folgenden Personen für die tolle Zusammenarbeit bedanken, meinen beiden Masterstudenten Jennifer Hage-Hülsmann sowie Robin Weihmann, Vera Svensson und Dr. Stephan Thies, letzterem auch für die Durchsicht dieser Arbeit.

Schließlich danke ich noch von ganzem Herzen meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während der gesamten Studien- und Promotionszeit. Besonderer Dank gebührt dabei meiner besseren Hälfte Nadine Schröder für die große Geduld, den Zuspruch und die Unterstützung während der gesamten Promotion.

Ohne Euch alle wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

# **Inhaltsverzeichnis**

INH	ALTSVERZEI	CHNIS	VII
ABE	BILDUNGSVE	RZEICHNIS	XI
TAE	BELLENVERZE	EICHNIS	XIII
ABI	KÜRZUNGSVI	ERZEICHNIS	XIV
1	EINLEITUNG	G	1
1.1	Naturstoffe	– Definition, Funktion, Synthese und Bedeutung	1
1	.1.1 Primär-	- und Sekundärmetabolite	1
1	.1.2 Sekund	lärmetabolit-Synthese	2
1	.1.3 Genclus	ster-kodierte Sekundärmetabolit-Biosynthesewege	4
1	.1.4 Sekund	lärmetabolite als wichtige Pharmazeutika	6
1	.1.5 Zugang	zu neuen pharmazeutisch wirksamen Sekundärmetaboliten	7
1.2	Prodigiosin.		9
1	.2.1 Prodigio	osin-Biosyntheseweg und pig-Gencluster aus Serratia marcescens	10
1.3	Produktion v	von Sekundärmetaboliten in heterologen Wirten	12
1.4	Pseudomono	as putida - ein vielseitiger Wirtsorganismus	17
1.5	Das TREX-Sy	vstem	18
1	.5.1 Aufbau	des TREX-Systems	18
1	.5.2 Anwend	dung des TREX-Systems	20
1	.5.3 Limitier	rungen des TREX-Systems	23
1	.5.4 Möglich	he Anpassungen des TREX-Systems	24
1.6	Zielsetzung.		26
2	MATERIAL	UND METHODEN	28
2.1	Bakterien- u	ınd Hefestämme	28
2.2	Plasmide		28
2.3	Oligonukleo	tide	29
2.4	Chemikalien	1	30
2.5	Puffer		31
	Enzymo		ວາ

2.7	Mole	kularbiologische Kits	32
2.8	Verb	rauchsmaterialien	33
2.9	Gerä	te	33
2.10	Softv	vare	34
2.11	Mikr	obiologische Methoden	35
2.1	1.1	Nährmedien zur Anzucht von Bakterien	35
2.1	1.2	Antibiotika	36
2.1	1.3	Kultivierung von E. coli	36
2.1	1.4	Kryokonservierung von <i>E. coli</i>	37
2.1	1.5	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli-</i> Zellen	37
2.1	1.6	Kultivierung von <i>P. putida</i> und <i>S. marcescens</i>	37
2.1	1.7	Kryokonservierung von <i>P. putida</i>	38
2.1	1.8	Nährmedien zur Anzucht von Saccharomyces cerevisiae	38
2.1	1.9	Kultivierung von S. cerevisiae	38
2.1	1.10	Kryokonservierung von <i>S. cerevisiae</i>	39
2.12	Mole	kularbiologische Methoden	
2.1	2.1	Transformation von E. coli	39
2.1	2.2	In vivo Rekombination von DNA in S. cerevisiae	
2.1	12.3	Plasmid-Übertragung von <i>E. coli</i> zu <i>P. putida</i> durch Konjugation	
2.1	2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	41
2.1	12.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	41
2.1	2.6	Isolierung von genomischer DNA aus <i>P. putida</i>	42
2.1	12.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
2.1	12.8	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	43
2.1	12.9	DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	43
2.1	2.10	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese	43
2.1	2.11	Reinigung von DNA-Fragmenten	44
2.1	2.12	In vitro Rekombination von DNA-Fragmenten durch Ligation	44
2.1	2.13	DNA-Sequenzierungen	45
2.1	2.14	Transkriptnachweis durch RT-qPCR	45
2 12	A nal	tik von Bradigiosin	47
		ytik von Prodigiosin	
	13.1	Aufnahme von Absorptionsspektren von Prodigiosin aus Bakterien	
2.1	13.2	Quantifizierung von Prodigiosin in Bakterien	4/
_			

3.1	TRE	X-vermittelte Prodigiosin-Produktion in <i>P. putida</i>	49
3	.1.1	TREX-vermittelte Erzeugung Prodigiosin-produzierender <i>P. putida</i> Stämme	49
3	.1.2	Optimierung der Prodigiosin-Produktion von <i>P. putida</i> pig-r1	54
3	.1.3	Einfluss von Prodigiosin auf die Vitalität von P. putida	58
3	.1.4	Stabilität der konstitutiven Produktionsstämme über lange Zeitperioden	61
3	.1.5	Polyurethan als effektive Trägersubstanz zur Prodigiosin-Extraktion	63
3.2	Ana	lyse des zur T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktion führenden Genomlocus	66
3	.2.1	Bestimmung des Integrationsortes von TREX-pig in P. putida pig-r1 und P. putida pig -r2	66
3	.2.2	Generierung weiterer T7RP-unabhängiger Prodigiosin-Produktionsstämme mit dem TREX-	System70
3	.2.3	Bestimmung des TREX-pig-Transposon Insertionsortes für P. putida pig-r1 bis r52	72
3	.2.4	Charakterisierung der Prodigiosin-Produktion in Bezug auf den Insertionsort	79
3	.2.5	Untersuchung der Transkriptmenge der <i>pig-</i> Gene in Bezug auf die Prodigiosin-Produktion	83
3.3	Erze	eugung natürlicher und artifizieller Prodigiosin-Derivate mittels Mutasynthese	88
3	.3.1	Erzeugung eines in der Biosynthese von MAP defizienten Stammes	90
3	.3.2	Anwendung der Mutasynthese im Rahmen der Dissertation von Andreas Sebastian Klein	93
3.4	Wei	terentwicklung des TREX-Systems für eine vielfältigere Anwendbarkeit	96
3	.4.1	Design der yTREX-Kassetten	97
3	.4.2	Erzeugung des yTREX shuttle Vektors	99
3	.4.3	Evaluation des yTREX-Systems am Beispiel des Prodigiosin-Genclusters	101
3	.4.4	Anwendungsmöglichkeiten des yTREX Systems	104
3	.4.5	Anwendung des yTREX-Systems im Rahmen der Masterarbeit von Robin Weihmann	108
4	DIS	KUSSION	111
4.1	Anv	vendung des TREX-Systems zur Erzeugung kompetitiver Produktionsstämme	112
4	.1.1	Ansätze zur Steigerung der Prodigiosin-Produktionsausbeute	113
4	.1.2	Möglichkeiten zur Nutzung der Prodigiosin-Produktionsstämme	115
4.2	Unt	ersuchung des zur T7RP-unabhängigen Produktion führenden Insertionsortes	118
4	.2.1	rRNA-Operons als vielversprechender Integrationsort	118
4	.2.2	Unterschiede zwischen den sieben rRNA-Operons	121
4.3	Eva	luation des yTREX-Systems	124
4	.3.1	Überprüfung der Funktionalität des yTREX-Systems am <i>pig</i> -Gencluster	127
4	.3.2	Perspektiven in der Anwendung des yTREX-Systems	128

5	ZUSAMMENFASSUNG	132
6	SUMMARY	134
7	LITERATURVERZEICHNIS	136
8	ANHANG	161
Eide	sstattliche Erklärung	173

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Beispiele für mikrobielle Sekundärmetabolit-Gencluster sowie die Strukturformeln der
	entsprechenden Sekundärmetaboliten
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung des Prodigiosin-Biosyntheseweges aus Serratia marcescens
Abb. 1.3:	Aufbau der TREX-Kassetten und des TREX-Vektors pIC20H-RL
Abb. 1.4:	Schematische Darstellung der Anwendung des TREX-Systems
Abb. 2.1:	Verhältnis von Transkriptkopien zu CT-Werten
Abb. 2.2:	Verhältnis von Zelldichte [OD <sub>650nm</sub> ] zu DCW [mg]
Abb. 3.1:	Vektoren pTREX-LpigR und pTREX-RpigL
Abb. 3.2:	Absorptionsspektren von extrahiertem oder synthetisch hergestelltem Prodigiosin 51
Abb. 3.3:	Konstitutive und induzierte Prodigiosin-Biosynthese in verschiedenen <i>P. putida</i> TREX- <i>pig</i> -Stämmen
Abb. 3.4:	Wachstum und Prodigiosin-Produktion von <i>P. putida</i> pig-r1 unter verschiedenen
	Kultivierungsbedingungen
Abb. 3.5:	Toleranz von <i>P. putida</i> KT2440 gegen das antibakterielle Prodigiosin
Abb. 3.6:	Wachstum von <i>P. putida</i> pig-r1 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm KT2440 60
Abb. 3.7:	Stabilität der konstitutiven Prodigiosin-Produktionsstämme <i>P. putida</i> pig-r1 und pig-r2
Abb. 3.8:	Arbeitsablauf der Prodigiosin-Extraktion aus einer <i>P. putida</i> pig-r1 Kultur mit PU-Würfeln 64
Abb. 3.9:	Schematische Darstellung des p <i>lasmid-rescue</i> aus genomischer DNA von <i>P. putida</i> pig-r1 und -r2 68
Abb. 3.10:	Erzielte Prodigiosintiter in den mittels TREX-System erzeugten <i>P. putida</i> Stämmen pig-r1 bis -r52 71
Abb. 3.11:	Struktur der sieben rRNA-Operons in <i>P. putida</i> KT2440 und abgeleitete Bindestellen der
	Oligonukleotide zur Analyse der TREX-pig-Transposon Insertionsorte
Abb. 3.12:	Exemplarische Darstellung der Auswertung einer Lokalisierungs-PCR am Beispiel pig-r46
Abb. 3.13:	Übersicht der <i>pig</i> -Insertionsorte innerhalb der sieben rRNA-Operons von <i>P. putida</i> pig-r1 bis -52 78
Abb. 3.14:	Sequenzen der vorhergesagten rRNA-Operon-Promotorregionen aus <i>P. putida</i> KT2440 80
Abb. 3.15:	Vergleich Promotorabstand und Prodigiosin-Produktion innerhalb der rRNA-Operons
Abb. 3.16:	Quantifizierung der Transkriptkopien von $pigA$ und $pigN$ in unterschiedlichen Stämmen mittels
	real-time PCR
Abb. 3.17:	Möglichkeiten zur Erzeugung von Prodigiosin-Derivaten in einem MAP defizienten Stamm mittels
	Muta- und Semisynthese
Abb. 3.18:	Darstellung der Erzeugung des MAP defizienten Mutanten-Stammes $P$ . $putida$ pig-r1 $\Delta pigD$ 92
Abb. 3.19:	Zellextrakte zur Veranschaulichung der Mutasynthese-Umsetzungen verschiedener MAP-Derivate
	in <i>P. putida</i> pig-r1 $\Delta$ pigD
Abb. 3.20:	Aufbau der yTREX-Kassetten im Vergleich zu den TREX-Kassetten
Abb. 3.21:	Schematische Darstellung der Konstruktion des yTREX shuttle Vektors
Abb. 3.22:	Anwendung des yTREX-Systems zur funktionellen Expression des <i>pig-</i> Gencluster in <i>P. putida</i> 103
Abb. 3.23:	Schematische Übersicht der vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten des yTREX-Systems 107

Abb. 4.1:	Schematische	Übersicht	der	Lokalisierung	der	sieben	rRNA-Operons	im	Genom	von
	P. putida KT24	40								. 122
Abb. 8.1:	Plasmidkarten	der verwend	deten	Plasmide						. 161
Abb. 8.2:	PCR-Ergebnisse	e der Stämm	e pig	-r1 bis –r52 bei	Verw	endung v	on Primern, die	eine	grundsätz	liche
	Insertion des T	REX-Transpo	sons	in einem rRNA-	Opero	n anzeige	en			. 165
Abb. 8.3:	PCR-Ergebnisse	e der Stämn	ne pig	-r1 bis –r52 be	i Verv	vendung	von Primern, die	e eine	Insertion	ı des
	TREX-Transpos	ons in einen	ı spez	ifischen rRNA-C	peror	n anzeige	n			. 166
Abb. 8.4:	Multi-Sequenz-	-Alignment o	ler <i>up</i>	stream region c	ler sie	ben rRNA	A-Operons von <i>P.</i>	putio	da KT2440	169
Abb. 8.5:	Schematische	Darstellung	des V	iolacein Genclu	ısters	aus Chro	omobacterium v	iolace	rum sowie	e des
	von ihm kodier	ten Biosynth	nesew	eges						. 171
Abb. 8.6:	Schematische I	Darstellung (	des Ph	nenazin-Genclus	ters a	us <i>Pseud</i>	omonas aerugin	osa P	AO1 sowi	e des
	von ihm kodier	ten Biosynth	nesew	eges						. 172

# **Tabellenverzeichnis**

Tab. 2.1:	Ubersicht der verwendeten Bakterien- und Hefestämme	28
Tab. 2.2:	Übersicht der verwendeten Plasmide	29
Tab. 2.3:	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	29
Tab. 2.4:	Übersicht der verwendeten Chemikalien	30
Tab. 2.5:	Übersicht der verwendeten Puffer	32
Tab. 2.6:	Übersicht der verwendeten Enzyme	32
Tab. 2.7:	Übersicht der verwendeten molekularbiologischen Kits	32
Tab. 2.8:	Übersicht spezieller verwendeter Verbrauchsmaterialien	33
Tab. 2.9:	Übersicht der verwendeten Geräte	34
Tab. 2.10:	Übersicht der verwendeten Software	34
Tab. 2.11:	Übersicht der für Bakterien verwendeten Nährmedien	36
Tab. 2.12:	Übersicht der zur Selektion verwendeten Antibiotika und der genutzten Konzentrationen	36
Tab. 2.13:	Übersicht der für <i>S. cerevisiae</i> verwendeten Nährmedien	38
Tab. 2.14:	Basisprotokoll für PCR-Ansätze	42
Tab. 2.15:	Basis-Programm zur Adaptierung individueller PCR-Programme	43
Tab. 3.1:	Vergleich der Extraktion von Prodigiosin aus einer <i>P. putida</i> pig-r1 Kultur mit und ohne PU	64
Tab. 3.2:	Übersicht der Insertionsloki der Prodigiosin-Produktionsstämme <i>P. putida</i> pig-r1 und pig-r2	69
Tab. 3.3:	Übersicht über synthetisch erzeugten MAP-Derivate und ihrer Funktionalität in der Mutasynthe	ese
		94
Tab. 3.4:	Übersicht der mithilfe des yTREX-Systems produzierten Sekundärmetabolite	.09
Tab. 8.1:	Prodigiosin-Produktion in <i>P. putida</i> pig-r1, dargestellt als Titer [mg/L] und pro Zellmas	sse
	[mg/gDCW]1	.62
Tab. 8.2:	Identitäts-Matrix der DNA der sieben 16S rRNAs aus P. putida KT2440	.63
Tab. 8.3:	Identitäts-Matrix der DNA der sieben 23S rRNAs aus P. putida KT2440	.63
Tab. 8.4:	Identitäts-Matrix von jeweils 260 bp der <i>upstream region</i> der sieben rRNA-Opero	ons
	P. putida KT2440	.64
Tab. 8.5:	Übersicht der Insertionsloki der Prodigiosin-Produktionsstämme pig-r1 bis r52	.67

# Abkürzungsverzeichnis

°C Grad Celsius A Adenin Abb. Abbildung Amp Ampicillin

ARS Autonom replizierende Sequenz Bcl-2 B-cell lymphoma 2 (engl.)

bp Basenpaare C Cytosin cm Zentimeter

DCW Zelltrockengewicht (engl.: dry cell weight)

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)

dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EtOH Ethanol
G Guanin
g Gramm

ggf. gegebenenfalls

GRAS generally recognized as safe (engl.)
GVO Gentechnisch veränderter Organismus

h Stunde(n) H<sub>2</sub>0 Wasser

HB Homologer Bereich

HCI Salzsäure

HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography)

HR Homologe Rekombination

HRMS Hochauflösende Massenspektrometrie (engl. High Resolution Mass Spectrometry)

IPTG Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

Irg Irgasan
k kilo (10³)
kb Kilobasenpaare
Km Kanamycin
L Liter

LB lysogeny broth (engl.)

LiAc Lithiumacetat

M Stoffmengenkonzentration (Molar [mol/L])

m Meter
m milli (10<sup>-3</sup>)
mA Milliampere
min Minute(n)
mg Milligramm
mL Milliliter

MTP Mikrotiterplatte

MW Molekulargewicht (engl.: molecular weight)

nm Nanometer

NRPS nicht-ribosomale Peptidsynthase

OD Optische Dichte

ori Replikationsursprung (engl.: origin of replication)

oriC chromosomaler Replikationsursprung

oriT origin of transfer (engl.)

PCR Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)

PEG Polyethylenglykol
PKS Polyketidsynthase
qPCR quantitative PCR

RNA Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)

rRNA ribosomale RNA RT Reverse-Transkription

s Sekunde(n)

SC synthetic complete (engl.)
SD synthetic dextrose (engl.)

Sm Streptomycin

SNP Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl.: single nucleotide polymorphism)

T Thymin

T7RP T7 RNA Polymerase

Tab. Tabelle

TB terrific broth (engl.)
TBE Tris-Borat-EDTA
Tc Tetracyclin

Tm Hybridisierungstemperatur
TREX <u>transfer and expression</u> (engl.)
TRIS Trishydroxymethylaminomethan

tRNA Transfer-RNA
ÜK Übernachtkultur/en
UpM Umdrehungen pro Minute

URA Uracil

URL einheitlicher Ressourcenzeiger (engl.: Uniform Resource Locator)

USR upstream region (engl.)

V Volt

v.Chr. Vor Christus

v/v Volumen pro Volumen

VE vollentsalzt

w/v Gewicht pro Volumen (engl. weight per volume)

WT Wildtyp

YAC yeast artificial chromosome (engl.)

YNB Hefe-Stickstoff-Basismedium (engl.: yeast nitrogen base)

YPD yeast peptone dextrose (engl.)

z.B. zum Beispiel  $\lambda$  Wellenlänge  $\mu$  mikro (10<sup>-6</sup>)  $\mu$ g Mikrogramm  $\mu$ L Mikroliter  $\mu$ m Mikrometer

# 1 Einleitung

## 1.1 Naturstoffe - Definition, Funktion, Synthese und Bedeutung

#### 1.1.1 Primär- und Sekundärmetabolite

Der Terminus "Naturstoffe" bezeichnet ganz allgemein von lebenden Organismen gebildete chemische Verbindungen. Dabei wird bereits seit über 100 Jahren nach Kossel (1891) zwischen primären und sekundären Naturstoffen (oder Primär- und Sekundärmetaboliten) unterschieden. Die grundlegende Unterscheidung zwischen diesen beiden Metabolit-Klassen erfolgt nach Kossel anhand eines einzelnen aber entscheidenden Punktes: Primärmetabolite sind für das Leben des jeweiligen Organismus essentiell, Sekundärmetabolite nicht.

Zu den Primärmetaboliten gehören also die essentiellen Grundbausteine des Lebens wie beispielsweise Nukleotide, Aminosäuren und Kohlenhydrate (Hanson, 2006), welche aufgrund ihrer Funktion im Metabolismus für das Überleben des Organismus nötig sind (Nelson und Cox, 2013). Die Unterteilung ist jedoch nicht Substanzklassen-spezifisch und keinesfalls als starre Grenze zu sehen.

Wird die Gesamtheit der Organismen betrachtet, existieren sehr viele verschiedene Sekundärmetabolite, die den verschiedensten Substanzgruppen angehören, wie z.B. Alkaloiden, Polyketiden, nicht-ribosomalen Peptiden (NRP) oder Terpenen (Hanson, 2006; Loeschcke und Thies, 2015; Vaishnav und Demain, 2011). In ihrer Funktion für den Organismus unterscheiden sie sich nicht nur aufgrund der grundsätzlichen Definition maßgeblich von den Primärmetaboliten. Während Primärmetabolite eindeutig dem Leben Überleben des Organismus dienen, wurde anfangs angenommen, Sekundärmetabolite keine wichtigen Funktionen haben, sondern es sich um Lagersubstanzen oder sogar Abfallprodukte des Primärstoffwechsels handelt (Vining, 1990). Diese Hypothese wurde jedoch bereits früh widerlegt. Zwar ist selbst bei den am besten untersuchten Modellorganismen, wie z.B. Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae Arabidopsis thaliana, noch nicht für jeden Sekundärmetaboliten die Funktion innerhalb des jeweiligen Produzenten aufgeklärt, aber es wurde wiederholt gezeigt, dass sie wichtige, wenn auch nicht essentielle Aufgaben im Organismus erfüllen (Caretto et al., 2015; Demain, 1974; Gershenzon und Dudareva, 2007; Haavik, 1979; Vaishnav und Demain, 2011; Weinberg, 1971). Ihre Funktionen für den jeweiligen Produzenten sind dabei sehr unterschiedlich, z.B. produzieren Mikroorganismen antibiotische Sekundärmetabolite, um Nahrungskonkurrenten auszuschalten (Demain, 1974; Liu et al., 2013; Rigali et al., 2008), Pflanzen produzieren toxische Sekundärmetabolite zur Abwehr von Parasiten oder Fraßfeinden (Gols, 2014; Tholl, 2015). Darüber hinaus gibt es Blütenpflanzen, die durch die Produktion von Lockstoffen bestimmte Bestäuber anlocken (Byers et al., 2014).

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Aufgaben ist auch der Zeitpunkt der Produktion zwischen den Metabolit-Typen verschieden. Primärmetabolite werden vermehrt während des Aufbaus von Biomasse gebildet, sind aber häufig über die gesamte Lebenszeit der Zellen präsent (Caretto et al., 2015; Drew und Demain, 1977). Sekundärmetabolite hingegen werden in der Regel vermehrt gebildet, wenn die Zelle oder der Einzeller die Teilung eingestellt hat (Drew und Demain, 1977; Haavik, 1979; Weinberg, 1971). Hierbei kann es jedoch entsprechend der Funktion Unterschiede geben. In Pflanzen können Abwehrstoffe gegen Fraßfeinde gezielt als Reaktion auf einen Angriff gebildet werden (Gols, 2014), andere Organismen sind in der Lage als Stress-Reaktion eine Sekundärmetabolit-Synthese zu induzieren (Ramakrishna und Ravishankar, 2011) oder die Syntheseleistung zu erhöhen (Caretto et al., 2015).

Des Weiteren unterscheiden sich Primär- und Sekundärmetabolite auch durch ihre Variabilität und Verbreitung. Während ein spezifischer Sekundärmetabolit meist nur in wenigen, häufig verwandten Spezies oder Gattungen produziert wird, findet sich aufgrund der Universalität des zentralen Stoffwechsels in allen Organismen ein sehr ähnliches Set an Primärmetaboliten und das unabhängig davon, ob es sich um Pflanzen, Tiere, Pilze oder Bakterien handelt (Drew und Demain, 1977; Haavik, 1979; Weinberg, 1971). Selbst Lebewesen mit komplett synthetischem Genom, wie das im J. Craig Venter Institute erzeugte *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 (Gibson et al., 2010), können auf diese Stoffwechselwege nicht verzichten.

#### 1.1.2 Sekundärmetabolit-Synthese

Wird die Sekundärmetabolit-Synthese im Allgemeinen betrachtet, ist erkennbar, dass ihre Grundbausteine aus dem Primärmetabolismus stammen. Wichtig sind hierbei (1) der Zucker-Metabolismus, (2) der Fettsäure-Metabolismus und (3) der Aminosäure-Metabolismus (Drew und Demain, 1977; Loeschcke und Thies, 2015; Marienhagen und Bott, 2013; Weinberg, 1971). Um dies zu verdeutlichen, werden im Folgenden einige Biosynthesewege beschrieben, die direkt dem Primärmetabolismus angehören oder auf Primärmetaboliten

aufbauen und aus denen Vorläufermoleküle für die Sekundärmetabolit-Synthese hervorgehen.

Die Biosynthese der Terpene, einer der größten Gruppen innerhalb der Sekundärmetaboliten (Gershenzon und Dudareva, 2007), ist sehr divers (Boronat und Rodríguez-Concepcón, 2014; Dewick, 2002; Tholl, 2015). Sie basieren jedoch grundsätzlich auf Isopentenylpyrophosphat (IPP), einem C5-Kohlenwasserstoff, der im Mevalonat (MVA)-Weg oder Methylerithritolphosphat (MEP)-Weg gebildet wird (Lange et al., 2000; Tholl, 2015). Bei Prokaryoten wird hierbei hauptsächlich der MEP-Weg genutzt, die für den MVA-Weg kodierenden Gene fehlen häufig (Boronat und Rodríguez-Concepcón, 2014; Rohmer et al., 2004). Eukaryotische Zellen können auf beide Wege zurückgreifen, diese werden dabei durch unterschiedliche Regulatoren kontrolliert. So läuft z.B. in Pflanzen der MEP-Weg dann verstärkt ab, wenn auch Photosynthese betrieben werden kann. Sowohl der MEP- als auch der MVA-Weg basieren auf dem aus dem Zucker-Metabolismus stammenden Primärmetaboliten Pyruvat.

Eine weitere wichtige Basis für die Sekundärmetabolit-Synthese bildet der Shikimatweg, welcher Teil des Aminosäure-Metabolismus ist und die Vorstufen der drei aromatischen Aminosäuren liefert. Die letzte gemeinsame Vorstufe der Aminosäuren ist dabei das Primärmetabolit Chorisminsäure (Herrmann, 1995), welche unter anderem als Grundlage für den Biosyntheseweg der Phenazine, einer Gruppe von Sekundärmetaboliten, dient (Mavrodi et al., 2001, vgl. auch Anhang Abb. 8.6). Die aus Chorisminsäure gebildete Aminosäure Tryptophan stellt wiederum die Ausgangssubstanz für die Biosynthese des Sekundärmetaboliten Violacein dar (Rodrigues et al., 2013, vgl. auch Anhang Abb. 8.5).

Eine weitere bedeutende Gruppe innerhalb der Sekundärmetaboliten bilden die Polyketide, zu ihnen zählen unter anderem das Antibiotikum Erythromycin sowie das antitumorale Therapeutikum Epothilon (Weissman und Leadlay, 2005). Ihre Biosynthese ist oft eng mit der von nicht-ribosomalen Peptiden verknüpft (Wang et al., 2014), zu den z.B. die Pyoverdine gehören (Schalk und Guillon, 2013). Die Biosynthesen beider Substanzgruppen erfolgen zumeist in modularen Protein-Komplexen aus Polyketidsynthasen (PKS), respektive nichtribosomalen Peptidsynthasen (NRPS) oder einer Kombination aus beiden. Die unterschiedlichen katalytischen Domänen dieser Protein-Komplexe bauen dabei die Sekundärmetabolite in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten auf (Schalk und Guillon, 2013; Shen, 2003; Walsh, 2004; Wang et al., 2014; Weissman und Leadlay, 2005). Bei

Polyketiden werden hierbei durch die drei verschiedene Typen der PKS (Shen, 2003) Coenzym A aktivierte C<sub>2</sub> und/oder C<sub>3</sub>-Körper, wie die Primärmetabolite Acetyl-CoA (C<sub>2</sub>) bzw. Malonyl-CoA (C<sub>3</sub>), durch Kondensation miteinander verbunden (Cummings et al., 2014). Bei den nicht-ribosomalen Peptiden werden, ebenfalls durch Kondensation, Aminosäuren durch die NRPS (Strieker et al., 2010) zu Peptidpolymeren verkettet (Finking und Marahiel, 2004).

#### 1.1.3 Gencluster-kodierte Sekundärmetabolit-Biosynthesewege

Die für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten verantwortlichen Enzyme sind häufig von in sogenannten Genclustern angeordneten Genen kodiert (Bode und Müller, 2005; Osbourn, 2010). Die Gene eines solchen Genclusters liegen im Genom des Wirtes lokal gruppiert vor und können aus einer oder mehreren Transkriptionseinheiten oder bei Mikroorganismen aus einem oder mehreren Operons bestehen (Yu et al., 2012). Derartige Gencluster sind der vorherrschende Standard in der Sekundärmetabolit-Biosynthese von Mikroorganismen (Osbourn, 2010), sie treten jedoch auch bei Pflanzen, Tieren und Pilzen auf, sind also in allen Reichen zu finden (Hurst et al., 2004; Osbourn, 2010). Neben den für die Enzyme des Biosyntheseweges kodierenden Strukturgenen beinhalten die Gencluster auch alle für die Expression der Gene benötigten nicht-kodierenden Sequenzen, wie Promotoren und Terminatoren, zusätzlich können auch Regulatorgene und für Transportproteine kodierende Gene enthalten sein (Schwecke et al., 1995).

Gencluster verschiedener Sekundärmetabolit-Biosynthesewege weisen eine große Bandbreite in der Gesamtgröße und der Anzahl sowie der Orientierung der in ihnen lokalisierten Gene auf. **Abb. 1.1** zeigt beispielhaft drei unterschiedliche Gencluster (**A**), sowie die Produkte ihrer jeweiligen Biosynthesewege (**B**).

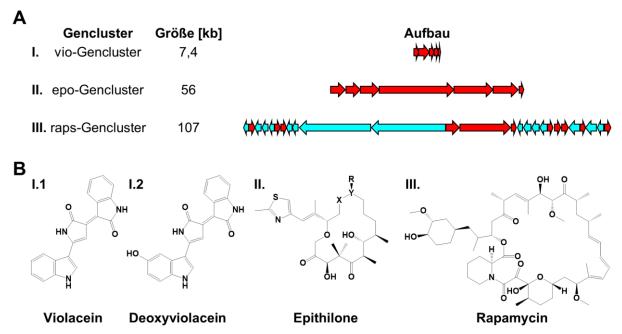


Abb. 1.1: Beispiele für mikrobielle Sekundärmetabolit-Gencluster sowie die Strukturformeln der entsprechenden Sekundärmetaboliten

A: Schematische Darstellung von drei Genclustern: I. vio-Gencluster aus Chromobacterium violaceum, II. epo-Gencluster aus Sorangium cellulosum und III. raps-Gencluster aus Streptomyces hygroscopoicus. Die Größen der Gencluster sind in [kb] angegeben, die schematischen Darstellungen der Gencluster unter Aufbau entsprechen den Größenverhältnissen zueinander. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen die unterschiedlichen Orientierungen der einzelnen Gene innerhalb der Gencluster. B: Strukturformeln der Biosyntheseweg-Produkte der jeweiligen Gencluster, die römischen Ziffern dienen der Zuordnung zu den in A gezeigten Genclustern. Referenzen für Gencluster und Struktur ihrer Produkte: vio (Sánchez et al., 2006), epo (Julien et al., 2000) und raps (Schwecke et al., 1995).

Die Enzyme des Biosyntheseweges zur Produktion des Alkaloids Violacein und dessen Nebenprodukt Deoxyviolacein werden in *Chromobacterium violaceum* vom *vio-*Gencluster kodiert (**Abb. 1.1** A I.). Dieses Gencluster ist vergleichsweise klein und einfach aufgebaut, es besteht aus fünf unidirektional angeordneten Genen und ist insgesamt 7,4 kb groß (Sánchez et al., 2006). Das für die Synthese verschiedener Epothilone (Polyketide) verantwortliche *epo-*Gencluster (**Abb. 1.1** A II.) aus *Sorangium cellulosum* ist mit 56 kb zwar deutlich größer, weist aber was die Organisation der Gene angeht ebenfalls eine geringe Komplexität auf, es besteht aus sieben Genen, die wie beim *vio-*Gencluster unidirektional orientiert sind (Julien et al., 2000). Das für die Synthese von Rapamycin, einem weiteren Polyketid, kodierende *raps-*Gencluster (**Abb. 1.1** A III.) aus *Streptomcyces hygroscopicus* ist hingegen sehr komplex aufgebaut, es besteht aus insgesamt 26 Genen mit unterschiedlichen Orientierungen und ist dazu mit insgesamt 107 kb sehr groß (Schwecke et al., 1995). Wie an diesen Beispielen dargestellt unterscheidet sich die Struktur verschiedener Gencluster mitunter deutlich.

#### 1.1.4 Sekundärmetabolite als wichtige Pharmazeutika

Wie bereits in **1.1.1** beschrieben, ist die natürliche Funktion noch nicht für jeden Sekundärmetaboliten bekannt, der immense Nutzen von Sekundärmetaboliten für den Menschen ist jedoch nicht von der Hand zu weisen. Sekundärmetabolite werden in der modernen Medizin z.B. wegen ihrer antibakteriellen oder antitumoralen Wirkung häufig als Pharmazeutika eingesetzt.

Bereits vor tausenden von Jahren setzten Menschen Pflanzenteile oder ganze Pflanzen als Heilmittel ein. Erste Dokumentationen von etwa 1000 medizinisch eingesetzten Substanzen gibt es aus dem Jahr 2600 v.Chr. aus Mesopotamien (Cragg und Newman, 2013) und auch heute noch haben Sekundärmetabolite eine zentrale Rolle in der Medizin, sei es in bestehenden Pharmazeutika oder bei der Entdeckung von neuen. Dies wird im inzwischen in der fünften aktualisierten Version erschienenen Review von Newman und Cragg (2016) eindrucksvoll beschrieben (Cragg et al., 1997; Newman et al., 2003; Newman und Cragg, 2007, 2012, 2016). Insgesamt waren 45 % der zwischen 1981 und 2014 zugelassenen Medikamente Naturstoffe oder Naturstoff-Derivate, zusätzlich waren 29 % der synthetisch generierten Medikamente auf Basis einer Naturstoffvorlage oder in direktem Bezug zu einem Naturstoff erzeugt worden (Newman und Cragg, 2016). Naturstoffe und ihre Derivate bilden mit 52 % auch den größten Anteil der in den beschriebenen 33 Jahren zugelassenen antitumoralen Therapeutika, hinzu kommen weitere 33 %, die mit direktem Bezug zu einem Naturstoff erzeugt worden sind (Newman und Cragg, 2016). Ein besonders hoher Anteil von Naturstoffen ist unter den Antibiotika zu finden. So waren in dem im Review beschriebenen Zeitraum insgesamt 79 % der zugelassenen Antibiotika Naturstoffe oder von diesen abgeleitet (Newman und Cragg, 2016).

Anzumerken ist jedoch, dass bei den im Jahr 2014 neu zugelassenen Substanzen (dem im Review letzten betrachteten Jahr) der Anteil an direkten Naturstoffen und Naturstoff-Derivaten nur noch bei 22 % lag. Ein starker Rückgang ist vor allem bei den Antibiotika zu beobachten. 2014 waren nur noch 50 % der zugelassenen Antibiotika Naturstoffe oder von diesen abgeleitet (Newman und Cragg, 2016). Insgesamt wurden 2014 nur sechs Antibiotika neu zugelassen, im Vergleich zu den Vorjahren ist dies wenig (Newman und Cragg, 2016). Bei diesen sechs neu zugelassenen Antibiotika handelt es sich ausschließlich um spätere Generationen bestehender Antibiotika-Klassen oder Abwandlungen bestehender Antibiotika (Kern, 2015). Gerade in Zeiten, in denen die Anzahl resistenter und multiresistenter Erreger

beunruhigend schnell steigt (Barriere, 2015), ist die schnelle Identifikation und Erforschung neuer Sekundärmetabolite mit antibiotischer Wirkung von höchster Wichtigkeit. In Bérdy (2005) wird beschrieben, dass zum Stand des Jahres 2002 von insgesamt 43040 bioaktiven Naturstoffen 22500 von Mikroorganismen gebildet werden, von diesen zeigen 73 % eine antibakterielle Wirkung. Dies unterstreicht die Bedeutung von Mikroorganismen als Quelle für bioaktive und vor allem antibakterielle Naturstoffe (Newman et al., 2003).

#### 1.1.5 Zugang zu neuen pharmazeutisch wirksamen Sekundärmetaboliten

Während Sir Alexander Fleming 1928 bei der Entdeckung von Penicillin (Fleming, 1929) noch auf den Zufall angewiesen war, wie er in seiner Rede zum Nobelpreis schilderte (Fleming, 1945), bietet die moderne Wissenschaft verschiedenste Möglichkeiten, neue Sekundärmetabolite zu identifizieren.

Seit der ersten vollständigen Sequenzierung eines bakteriellen Genoms durch Fleischmann et al. im Jahr 1995 entwickelte sich die Sequenzierungstechnik mit zunehmender Geschwindigkeit. Während die Sequenzierung des 1,83 Megabasen großen Genoms von Haemophilus influenzae 1995 noch etwa 1 Million \$ kostete (Fleischmann et al., 1995), liegen die Kosten im Jahr 2016 mit unter 1000 \$ um den Faktor 1000 niedriger. Neben den Kosten ist auch der zeitliche Aufwand für eine Genom-Sequenzierung stark gesunken. In den Anfängen der Sequenzierung konnten Sequenzierungsvorgänge von der genomischen DNA bis zum assemblierten Genom noch Monate oder Jahre dauern (Fleischmann et al., 1995), die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms dauerte sogar mehrere Jahre (Venter et al., 2001). Einen großen Anteil an der Reduktion der Kosten und des Zeitaufwands haben die sogenannten Next-Generation Sequencing Techniken, die etwa ab 2008 eingesetzt wurden (Metzker, 2010; Shendure und Ji, 2008). High-throughput Sequenzierautomaten arbeiten um ein vielfaches schneller als Sanger-Sequenzierautomaten. Hinzu kommen bessere Hard- und Software, die eine effiziente bioinformatische Assemblierung der Fragmente zu einer vollständigen Genomsequenz ermöglichen (Fleischmann et al., 1995; Loman et al., 2012; Metzker, 2010; Shendure und Ji, 2008). Dadurch ist es möglich, in wenigen Tagen sowohl den eigentlichen Sequenziervorgang als auch die Assemblierung des Genoms durchzuführen (Loman et al., 2012). Folglich ist die Zahl der sequenzierten bakteriellen Genome seit der Einführung der Next-Generation Sequencing Techniken rasant angestiegen. Im Jahr 2010 waren etwa 700 bakterielle Genome sequenziert, bis 2014 hat

sich die Zahl jährlich mehr als verdoppelt und erreichte den Stand von 30.000 über das *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) zugänglichen Genomen (Land et al., 2015). Zum Stand dieser Arbeit (September 2016) sind auf NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/) bereits Sequenzdaten für 71096 bakterielle Genome eingetragen.

Von den Next-Generation Sequencing Techniken profitieren aber nicht nur gezielte Sequenzierungen der Genome einzelner Organismen, sondern auch Projekte zur Sequenzierung von Metagenomen (Land et al., 2015; Vincent et al., 2015). Da der Metagenomik-Ansatz eine kultivierungsunabhängige Analyse von genetischen Informationen verfolgt (Handelsman, 2004), erweitern solche Projekte die theoretisch zugängliche Menge an Sequenzdaten immens, weil geschätzt nur unter 1 % der bekannten Mikroorganismen im Labor kultivierbar sind (Akondi und Lakshmi, 2013; Handelsman, 2004). Vor allem marine Mikroorganismen sind hierbei eine besondere Herausforderung (Alma'abadi et al., 2015), stellen aber eine höchst interessante Quelle für neue pharmazeutisch nutzbare Sekundärmetabolite dar (Cragg und Newman, 2013; Medema et al., 2015; Newman et al., 2015). Neben der klassischen Methode der Erzeugung von Metagenombibliotheken gepaart mit funktionsbasierten screenings durch Expression der metagenomischen Gene, z.B. in E. coli (Handelsman, 2004; Piel, 2011), bietet sich durch die moderne Bioinformatik die Möglichkeit, auf Sequenzebene gezielt nach Sekundärmetabolit-kodierenden Genclustern zu suchen (Medema et al., 2015; Ziemert et al., 2016). Bioinformatische tools wie ClustScan (Starcevic et al., 2008) oder antiSMASH (Blin et al., 2013; Medema et al., 2011a; Weber et al., 2015) können die große Menge an Sequenzdaten, die auf Sequenzierungen von Metagenom-Proben und einzelnen Genomen basiert, schnell und gezielt nach Genclustern durchsuchen. Durch Sequenzanalysen identifizierte Gencluster bieten also eine gute Grundlage für die Entdeckung neuer pharmazeutisch nutzbarer Sekundärmetabolite. Eine vergleichende Studie von Katz et al. (2016) zeigt, dass bioinformatische screenings von Metagenom-Sequenzierungsdaten zu einer höheren Ausbeute an gefundenen Naturstoffen führten als klassische funktionsbasierte screenings von Metagenombibliotheken. Aus der Studie geht jedoch auch hervor, dass eine Kombination beider screening Ansätze, aufgrund einer nicht vollständigen Schnittmenge, eine höhere Anzahl an gefundenen Sekundärmetaboliten erzielt (Katz et al., 2016).

Die durch *Next-Generation Sequencing* Techniken zur Verfügung stehende, immense Menge an (Meta)Genom-Sequenzdaten, führt zur Identifizierung von neuen potentiellen Sekundärmetabolit-kodierenden Genclustern. Hieraus entsteht ein großer Bedarf an molekularbiologischen *tools*, die die heterologe Expression solcher Gencluster sowie die Erzeugung ihrer Biosyntheseweg-Produkte ermöglichen (Luo et al., 2015; Medema et al., 2011b; Piel, 2011; Zhang et al., 2008a; Ziemert et al., 2016).

## 1.2 Prodigiosin

Der mikrobielle Sekundärmetabolit Prodigiosin ist ein rotes Pigment und weist eine Tripyrrol-Struktur auf. Es bildet zusammen mit anderen Sekundärmetaboliten, wie z.B. Undecylprodigiosin, Norprodigiosin, Cyclononylprodigiosin oder Streptorubin B, die Gruppe der Prodiginine (Darshan und Manonmani, 2015; Williamson et al., 2006). Prodiginine werden von verschiedenen Arten aus Gattungen wie z.B. *Hahella* (Jeong et al., 2005; Kim et al., 2007), *Streptomyces* (Tsao et al., 1985) und *Serratia* (Williamson et al., 2006) gebildet. Einer der bedeutendsten Produzenten von Prodigiosin ist *Serratia marcescens*, aus diesem wurde es bereits von Wrede und Hettche (1929) erstmals erfolgreich isoliert und hinsichtlich seiner Tripyrrol-Struktur beschrieben.

Der Sekundärmetabolit Prodigiosin weist aufgrund seiner Eigenschaften eine große biotechnologische und pharmazeutische Relevanz auf. Diese beruht jedoch nicht auf der roten Färbung, obwohl der Naturstoff bereits Anwendung als roter Farbstoff gefunden hat (Kulandaisamy Venil and Lakshmanaperumalsamy, 2009; Stankovic et al., 2014), sondern insbesondere auf seinen vielseitigen pharmazeutischen Eigenschaften. Prodigiosin zeigt zum einen antibiotische Aktivität gegen eine Vielzahl verschiedener Spezies, darunter auch bedeutende Humanpathogene wie *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus pyogenes* (Darshan und Manonmani, 2016; Lapenda et al., 2014; Priya et al., 2013; Stankovic et al., 2014; Suryawanshi et al., 2014, 2016), wobei Gram-positive Bakterien grundsätzlich sensitiver zu sein scheinen als Gram-negative (Darshan und Manonmani, 2015). Zum anderen wurde für Prodigiosin eine vielversprechende Aktivität gegen verschiedene Krebszelllinien nachgewiesen. Die Wirksamkeit ergibt sich hierbei daraus, dass es in diesen Zellen häufig die Apoptose auslöst (Hassankhani et al., 2014; Khanafari et al., 2006; Williamson et al., 2007; Yenkejeh et al., 2016). Ein Grund hierfür könnte die Inhibition von mTORC1 und mTORC2 sein, welche durch die Bindung von Prodigiosin an die Serin/Threonin

Proteinkinase mTOR bewirkt wird. Das Unterbinden der darauf basierenden Signalwege begünstigt die Einleitung der Apoptose (Espona-Fiedler et al., 2012; Hong et al., 2014).

Aber nicht nur Prodigiosin allein zeigt diese interessanten pharmazeutischen Eigenschaften, sondern auch viele andere Prodiginine weisen eine antibiotische Aktivität und eine Wirkung gegen verschiedene Krebszellen auf (Montaner und Pérez-Tomás, 2003; Stankovic et al., 2014; Williamson et al., 2007). Obatoclax, ein synthetisch erzeugtes Derivat von Prodigiosin, wird aufgrund seiner Eigenschaft als Apoptose auslösender Pan Bcl-2 Inibitor, derzeit bereits in klinischen Studien für die Behandlung verschiedener Krebsarten wie dem Mantelzelllymphom getestet (Basit et al., 2013; Goy et al., 2014; Schimmer et al., 2008). Das große Anwendungsspektrum dieser Naturstoffgruppe bietet also ein sehr großes Potential für die pharmazeutische Nutzung.

#### 1.2.1 Prodigiosin-Biosyntheseweg und pig-Gencluster aus Serratia marcescens

Die an der Prodigiosin-Biosynthese beteiligten Enzyme werden durch die sogenannten *pig*-Gene kodiert, diese sind wie bei vielen anderen mikrobiellen Sekundärmetaboliten (vgl. **1.1.3**) in einem Genkluster lokalisiert. Das *pig*-Gencluster aus *S. marcescens*, welches in dieser Arbeit verwendet wird, wurde von Harris et al. (2004) beschrieben. Es besteht aus den 14 unidirektional in einem gemeinsamen Operon, angeordneten Genen *pigA-pigN* und hat eine Gesamtlänge von 21 kb (vgl. **Abb. 1.2** A).

Der Biosyntheseweg von Prodigiosin und somit die Funktion der einzelnen Proteine ist für *S. marcescens* weitestgehend aufgeschlüsselt (Williamson et al., 2005, 2006). Er setzt sich grundlegend aus zwei unabhängig voneinander ablaufenden Zweigen zusammen. In einem bilden die drei Enzyme PigB, D und E, ausgehend von den Substraten 2-Octenal und Pyruvat, die Prodigiosin Vorstufe MAP (2-Methyl-3-n-amyl-pyrrol). Parallel dazu wird, ausgehend von der Aminosäure Prolin, in mehreren Schritten durch die acht Enzyme PigA und F-N die zweite Vorstufe für Prodigiosin MBC (4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd) gebildet. Diese beiden Vorläufermoleküle werden in einem finalen Schritt von PigC zu Prodigiosin kondensiert (vgl. **Abb. 1.2** B).

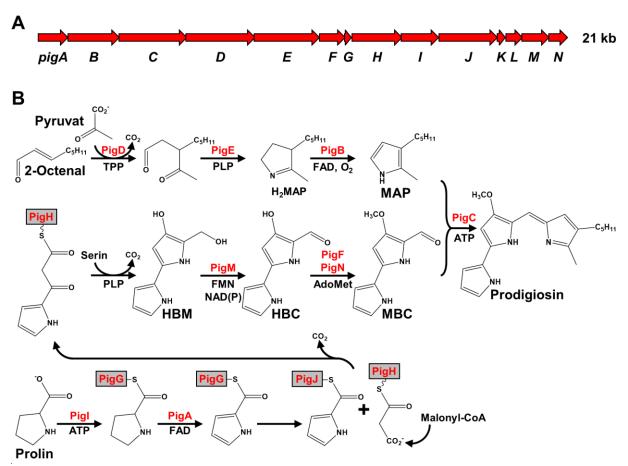


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Prodigiosin-Biosyntheseweges aus Serratia marcescens

A: Das *pig*-Gencluster aus *S. marcescens* besteht aus den 14 unidirektional angeordneten Genen *pigA-pigN*, diese kodieren für die an der Biosynthese von Prodigiosin beteiligen Enzyme PigA-PigN. **B:** Der Prodigiosin-Biosyntheseweg von *S. marcescens* ist gegabelt aufgebaut. Ein Zweig bildet unter Nutzung der drei Enzyme PigB, PigD und PigE das Intermediat MAP (2-Methyl-3-n-amyl-pyrrol). Der andere Zweig bildet unter Nutzung der acht Enzyme PigA und PigF-PigN das Intermediat MBC (4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd). Diese beiden Intermediate werden in einem finalen Schritt durch PigC zu Prodigiosin kondensiert. TPP = Thiamin-Pyrophosphat, PLP = Pyridoxal-Phosphat, FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid, MAP = 2-Methyl-3-n-Amyl-Pyrrol, ATP = Adenosin-Triphosphat, HBM = HBM, 4-Hydroxy-2,2'-Bipyrrol-5-Methanol, FMN = Flavin-Mononukleotid, NAD(P) = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, HBC = 4-Hydroxy-2,2'-Bipyrrol-5-Carbaldehyd, AdoMet = S-Adenosyl-methionin, MBC = 4-Methoxy-2,2'-Bipyrrol-5-Carbaldehyd. Modifiziert nach Williamson et al. (2006).

Der Biosyntheseweg von Prodigiosin ist im Hinblick auf die Erzeugung von Prodigiosin-Derivaten aus verschiedenen Gründen sehr interessant für die Forschung. Durch die klare Trennung der Biosynthesewege für die beiden Vorstufen MAP und MBC kann die Bildung eines der beiden Intermediate durch eine geeignete Deletionsmutation gezielt unterbunden werden. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, durch Mutasynthese gezielt neue Prodigiosin-Derivate zu erzeugen, indem die entsprechenden Derivate des fehlenden Vorläufermolküls in den Biosyntheseweg eingespeist werden. Wird dieses alternative Substrat von PigC akzeptiert, wird der Biosyntheseweg mit einem Prodigiosin-Derivat als Endprodukt vollendet. Eine derartige Abwandlung des Prodigiosin-Biosyntheseweges wurde bereits an

verschiedenen Stellen diskutiert (Stankovic et al., 2014; Williamson et al., 2007), jedoch bislang nicht umgesetzt. Nichtsdestotrotz erscheint dieser Ansatz aufgrund der natürlichen Promiskuität von PigC vielversprechend. So wird z.B. anstelle von MBC auch dessen Vorstufe HBC als Substrat für die Kondensation mit MAP akzeptiert, wodurch das sogenannte Norprodigiosin entsteht (Kim et al., 2007; Williamson et al., 2005). Auch die Akzeptanz für verschiedene MAP-Derivate scheint wahrscheinlich, denn verschiedene Studien zeigen, dass zu PigC homologe Enzyme aus anderen Prodiginin-Biosynthesewegen andere Monopyrrole als Substrat akzeptieren (Hu et al., 2016; Williamson et al., 2006).

Weiteres Potential steckt in der möglichen Kombination von verschiedenen Prodiginin-Biosynthesewegen, welche grundsätzlich sehr ähnlich aufgebaut sind (Hu et al., 2016). Der Biosyntheseweg von Undecylprodigiosin aus *S. coelicolor* z.B. ist auch zweigeteilt, es wird ebenfalls das Intermediat MBC gebildet, jedoch wird an Stelle von MAP, 2-Undecyl-Pyrrole synthetisiert. Diese beiden Intermediate werden dann von dem zu PigC homologen Enzym RedH zu Undecylprodigiosin kondensiert (Williamson et al., 2007). Die kondensierenden Enzyme der unterschiedlichen Prodiginin-Biosynthesewege zeigen generell eine sehr hohe Homologie zueinander (Hu et al., 2016; Williamson et al., 2005, 2006) und könnten genutzt werden, um verschiedene Prodiginin-Biosynthesewege miteinander zu kombinieren.

## 1.3 Produktion von Sekundärmetaboliten in heterologen Wirten

Da die natürlichen Produzenten von vielen Sekundärmetaboliten häufig nicht für die Produktion im Labor geeignet sind, weil sie z.B. im Labor nicht oder nur schlecht kultivierbar sind (Akondi und Lakshmi, 2013; Handelsman, 2004), die von ihnen erreichten Produktausbeuten sehr gering ausfallen oder es sich um Pathogene handelt, wird die Produktion häufig in heterologen Wirten durchgeführt. Die heterologe Expression von Genen in Bakterien wird bereits seit den 1970er Jahren erfolgreich durchgeführt (Backman und Ptashne, 1978) und gehört zu den Standard-Methoden in vielen Laboren. Die heterologe Expression geclusterter Gene ist jedoch deutlich anspruchsvoller, da hierbei viele verschiedene Punkte beachtet werden müssen. Zu den häufigen Limitierungen gehöhren (1) die Isolierung und Klonierung großer DNA-Fragmente, (2) die Übertragung der rekombinanten Gencluster in den jeweiligen Wirtsorganismus, (3) die Erzeugung eines stabilen Produktionsstammes sowie (4) die Auswahl eines geeigneten Wirtes für den jeweiligen Biosyntheseweg.

Gencluster, welche heterolog exprimiert werden sollen, müssen vor der Expression zunächst als DNA-Sequenz vorliegen und in das gewählte Expressionssystem, z.B. ein Expressions-Plasmid, eingebracht werden. Wegen der Größe von zum Teil über 100 kb (vgl. Abb. 1.1 raps-Gencluster) kann eine herkömmliche, auf Restriktionsendonukleasen basierende Klonierung Gencluster-tragender DNA-Fragmente aufgrund fehlender singulärer Erkennungssequenzen problematisch oder sogar unmöglich sein. Moderne Endonukleasefreie Klonierungsstrategien wie das Gibson Assembly® (Gibson et al., 2008a) oder lange bewährte Methoden wie die hefebasierte homologe Rekombination (Ma et al., 1987) bieten sich daher für die Klonierung großer DNA-Fragmente an. Auch für diese Methoden muss die DNA des Genclusters bereits vorliegen, sei es als genomische DNA oder als Gesamt-DNA einer Metagenom-Probe (auch environmental DNA oder eDNA genannt), damit sie z.B. durch Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction PCR) isoliert werden kann. Wenn die DNA im eigenen Labor nicht vorliegt, sondern nur Sequenzdaten aus bioinformatischen screenings (vgl. 1.1.5) vorhanden sind, ist es aber auch möglich, das Gencluster durch künstliche Gensynthese für die Analyse im Labor zugänglich zu machen. Durch immer effektivere Methoden in der künstlichen Gensynthese ist sogar die Synthese großer DNA-Fragmente realisierbar, die Firma GeneScript® (Piscataway, USA) z.B. bietet Gensynthesen bereits bis zu einer Fragmentgröße von 10 kb an. Diese Technik wurde bereits erfolgreich zur synthetischen Erzeugung von Teilen von Genclustern eingesetzt (Brieke et al., 2015). Durch künstliche Gensynthesen ist es zudem möglich, synthetische Gencluster, also Gencluster, die z.B. bioinformatisch auf Basis von bekannten Informationen aus verschiedenen Biosynthesewegen designt wurden (Medema et al., 2012, 2015), für die Analyse im Labor zugänglich zu machen.

Die auf diese Weise isolierten Gencluster müssen dann, meist getragen von einem Plasmid, in den späteren Expressionswirt übertragen werden. Für diesen Gentransfer kommen verschiedene Methoden in Frage, am häufigsten werden hierbei im Labor wohl chemische Transformation, Elektroporation oder Konjugation eingesetzt. Da Plasmide, die ein vollständiges Gencluster tragen, bereits bei kleinen Genclustern, wie dem *vio-*Gencluster (vgl. **Abb. 1.1**), Größen von deutlich über 10 kb aufweisen, bietet die Konjugation, also die Übertragung eines replikativen und mobilisierbaren Plasmids von einem bakteriellen Donorstamm auf den gewünschten Rezipienten, im Vergleich zu den anderen Methoden verschiedene Vorteile. So lässt die Effizienz bei der chemischen Transformation mit

steigender Plasmidgröße nach (Inoue et al., 1990) und bei der Elektroporation wird die Zelle stark in ihrer Viabilität beeinträchtigt, was ebenfalls zu einer geringeren Transformationseffizienz führt (Woodall, 2003). Die Konjugation hingegen beeinträchtigt die Viabilität der Bakterien nicht, da es sich zum einen um einen natürlichen Prozess handelt (Thomas und Nielsen, 2005) und der Zelle zum anderen kein zusätzlicher Stress durch Chemikalien oder elektrische Spannung zugefügt wird. Darüber hinaus ist der DNA-Transfer mittels Konjugation nicht durch die Größe des rekombinanten DNA-Moleküls limitiert (Brigulla und Wackernagel, 2010). Zudem kann die Konjugation für eine Vielzahl unterschiedlicher Gram-negativer und Gram-positiven Bakterien eingesetzt werden (Brigulla und Wackernagel, 2010; Grohmann et al., 2003; Thomas und Nielsen, 2005).

Nach der Übertragung in den gewünschten Expressionswirt muss sichergestellt werden, dass eine Replikation gewährleistet wird. Der sicherste Weg ist hierbei wohl die Integration ins Wirtsgenom. Bei dieser Methode kann zum einen auf eine Selektion verzichtet werden, zum anderen muss der Organismus nicht dauerhaft ein Plasmid replizieren, was gerade bei Plasmiden, deren Replikationsursprung eine hohe Kopienzahl bedingen, einen hohen Energieaufwand darstellt, beides Faktoren die den Stress für den Wirt neben Expression des Genclusters und der Produktion des Sekundärmetaboliten zusätzlich erhöhen würden (Mairhofer et al., 2013; Tyo et al., 2009). Für die Integration ins Genom kommen homologe Rekombination oder Transposition in Frage. Die homologe Rekombination ist dabei in der Regel weniger effektiv (Fu et al., 2008) und erfolgt entsprechend der jeweilig gewählten homologen Bereiche in eine spezielle Genomregion. Bei der Transposition gibt es neben der gerichteten Transposition in eine bestimmte Genomregion, z.B. durch das Tn7-Transposon (Arciszewska et al., 1989; Peters, 2014), auch ungerichtet transponierende Transposons, wie das Tn5-Transposon (Goryshin und Reznikoff, 1998; Gradman und Reznikoff, 2008; Reznikoff et al., 1999; Steiniger et al., 2006). Das Tn5-Transposon erscheint hierbei für die Arbeit mit Genclustern aus verschiedenen Gründen als besonders geeignet: Zum einen sind die funktionellen Elemente des Tn5-Transposon sehr klein, das Tn5-Transposasegen ist nur 1,4 kb lang, die beiden den Transpositionsbereich begrenzenden outside ends (OEs) jeweils nur 19 bp (Goryshin und Reznikoff, 1998). Dadurch ist das Transposon sehr flexibel einsetzbar, ohne das genutzte Plasmid dabei stark zu vergrößern. Zum anderen ist die Genregion, in die es integriert werden kann, mit neun Basen sehr kurz und in ihrer Sequenz sehr variabel (Schulz und Reznikoff, 1991; Steiniger et al., 2006). Hieraus resultiert zum einen die ungerichtete Transposition in das Zielgenom, zum anderen die Einsetzbarkeit in vielen verschiedenen Wirten (Reznikoff, 2008). Des Weiteren ist die Integration durch ein Tn5-Transposon sehr stabil (Herrero et al., 1990) und eine weitere Transposition innerhalb des Wirtsgenom wird durch die Selbstregulation der Tn5-Transposase inhibiert (Mahnke Braam et al., 1999; Reznikoff, 1993). Im Vergleich dazu ist das Tn7-Transposon, bestehend aus fünf Genen und einer Gesamtgröße von etwa 10 kb, deutlich größer, auch die den Transpositionsbereich begrenzenden Sequenzen Tn7L und Tn7R sind mit 150 respektive 90 bp deutlich länger (Arciszewska et al., 1989; Peters, 2014). Zwar gibt es auch kürzere Varianten, wie das miniTn7-Transposon, diese Variante ist jedoch nicht wirklich kleiner, sondern basiert nur auf der Aufteilung des Transposons auf zwei seperate Plasmide. Eines enthält den Transposon-Bereich, bestehend aus den beiden begrenzenden Sequenzen Tn7L und Tn7R sowie dem zu transponierenden DNA-Fragment, das andere die für die Transposition verantwortlichen Gene. Somit resultiert hieraus zwangsläufig die parallele Nutzung von zwei Plasmiden (Arciszewska et al., 1989; Choi et al., 2005; Peters, 2014).

Die letzte Herausforderung bei der heterologen Expression von Genclustern besteht in der Auswahl eines geeigneten Expressionswirtes. Diese Auswahl kann sich sowohl auf Transkription und Translation, also beide Ebenen der eigentlichen Genexpression, als auch auf die Biosynthese des Sekundärmetaboliten selbst auswirken.

Bei der Transkription ist zu beachten, ob der oder die native/n Promotor/en des Genclusters von der wirtseigenen RNA-Polymerase erkannt werden (Stevens et al., 2010). Ist dies nicht der Fall, müssen entweder der/die Promotor/en an den Wirt angepasst werden (Galm und Shen, 2006; Széliová et al., 2016) oder es muss auf ein alternatives Promotor/RNA-Polymerasen-System zurückgegriffen werden. Hierfür eignet sich z.B. ein auf der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 basierendes System, dieses wird bereits seit den 80er Jahren erfolgreich eingesetzt (Studier und Moffatt, 1986; Tabor und Richardson, 1985). Inzwischen sind bereits für verschiedene Spezies Stämme publiziert, bei denen das für die T7 RNA Polymerase (T7RP) kodierende Gen in das Genom integriert wurde, z.B. *E. coli* BL21(DE3), *Corynebacterium glutamicum* T7 (Kortmann et al., 2014), *Streptomyces lividans* 10T7 (Lussier et al., 2010) oder *Rhodobacter capsulatus* B10S-T7 (Katzke et al., 2010). Auch für die Expression geclusterter Gene kamen bereits auf der T7RP basierende Systeme erfolgreich zum Einsatz (Arvani et al., 2012; Loeschcke et al., 2013). Hierbei konnte die Fähigkeit der T7RP, bakterielle Transkriptionsterminatoren weitestgehend zu ignorieren

(Studier, 1972; Studier und Moffatt, 1986), in Arvani et al. (2012) und Loeschcke et al. (2013) bestätigt werden. Dies ist bei der Expression von komplex angeordneten Genclustern mit mehreren Trankriptionsseinheiten, wie dem von Rapamycin (vgl. Abb. 1.1), von größter Wichtigkeit. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist die hohe Polymerase/Promotor Spezifität. Die T7RP-Promotorsequenz wird nur von der T7RP erkannt und diese startet die Transkription wiederum ausschließlich an der T7RP-Promotorsequenz, wodurch sich die Genexpression gut regulieren lässt (Tabor und Richardson, 1985). Neben Stämmen, die das T7RP-Gen im Genom integriert tragen, gibt es verschiedene Plasmide, welche das Polymerasegen enthalten und in vielen verschiedenen Wirten einsetzbar sind (Arvani et al., 2012). Des weiteren existieret ein Transpositions-Systeme mit denen das T7RP-Gen in verschiedene Wirte integriert werden kann (Kang et al., 2007). Somit ist die T7RP flexibel in verschiedenen Wirten einsetzbar.

Auf Ebene der Translation ist die tRNA *codon usage* zu beachten, diese sollte zwischen Expressionswirt und dem Ursprungsorganismus des Genclusters kompatibel sein. Trifft dies nicht zu, kann die Sequenz durch die Nutzung von bioinformatischen *tools* für einen bestimmten Wirt Codon-optimiert werden (Chung und Lee, 2012; Yim et al., 2011; Zhang et al., 2008). Hierfür kann das Gencluster an die *codon usage* eines bestimmten Wirtes angepasst werden, was die flexible Nutzung in verschiedenen Wirten weitesgehend ausschließt, oder es werden zusätzliche tRNAs in den Wirtsorganismus integriert die die *codon usage* anpassen sollen. Eine verlässliche Strategie für eine Codon-Optimierung mit vorhersagbaren Einfluss auf die Expression der Zielgene und somit eine erfolgreiche Produktion des Sekundärmetaboliten ist allerdings bis jetzt nicht publiziert. Die optimale Anpassung des Codon-Gebrauchs ist aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Effekte gerade bei Genclustern schwierig und führt nicht immer zum Erfolg (Gemperlein et al., 2016).

Für die Biosynthese des Sekundärmetaboliten sind bei der heterologen Produktion vor allem zwei Punkte zu beachten. Einerseits muss gewährleistet sein, dass die beteiligten Enzyme im ausgewählten Wirt auch in aktiver Form synthetisiert werden, also ob für die korrekte Faltung der Enzyme eventuell nötige Chaperone vorhanden sind und der Wirt alle wichtigen Kofaktoren für diese Enzyme bereitstellt. Andererseits stellt sich die Frage, ob der natürliche Metabolismus des Wirtes alle nötigen Vorstufen für den heterologen Biosyntheseweg bietet, also ob der Metabolismus und der Biosyntheseweg miteinander kompatibel sind (Jiang et al., 2010; Pickens et al., 2011; Zhang et al., 2008a). Es gibt zwar die Möglichkeiten, zusätzliche

Chaperone zu exprimieren (Mahamad et al., 2016), oder auf bioinformatischem Weg näherungsweise zu überprüfen, ob der Metabolismus des Wirtes zum Biosyntheseweg passt (Carbonell et al., 2011; Fernández-Castané et al., 2014), aber diese Ansätze sorgen nicht zwangsläufig für eine fehlerfreie Biosynthese des gewünschten Produkts. Zusätzlich darf der Wirt durch das produzierte Sekundärmetabolit auch nicht weitreichend negativ beeinflusst werden. Dies stellt gerade für potentiell antibiotisch wirkende Substanzen eine Herausforderung bei der Auswahl des Wirtsorganismus dar. Zusammengenommen kann die Zahl der in Frage kommenden Wirte zwar eingegrenzt werden, aber eine eindeutige Vorhersage, ob der Wirt zur Produktion des Sekundärmetaboliten fähig ist und ob der Sekundärmetabolit in großer Menge produziert werden kann, ist nicht möglich.

Ein molekularbiologisches *tool* zur heterologen Expression von geclusterten Genen sowie zur Produktion ihrer Biosyntheseweg-Produkte muss also unter Beachtung der in diesem Kapitel genannten Limitierungen entwickelt werden. Ein besonderer Focus sollte dabei auf der Anwendbarkeit in einem großen Wirtsspektrum liegen, denn nur so können effizient geeignete Wirte für die Sekundärmetabolit-Produktion identifiziert werden.

## 1.4 Pseudomonas putida - ein vielseitiger Wirtsorganismus

Ein in Zusammenhang mit der heterologen Produktion von Sekundärmetaboliten immer wieder als vielversprechend erachteter Wirt ist das Gram-negative Bodenbakterium *P. putida.* Es besetzt in der Natur die verschiedensten Habitate (Nikel et al., 2014; Poblete-Castro et al., 2012; Wu et al., 2011) und hat sich in den letzten Jahren immer mehr zu einem sehr beliebten Labororganismus entwickelt. Seine Teilungsrate liegt ähnlich hoch wie die von *E. coli*, aber es kann ein breiteres Spektrum an C- und N-Quellen metabolisieren (Bagdasarian et al., 1981; Puchałka et al., 2008; Wu et al., 2011). Darüber hinaus ist der in dieser Arbeit genutzte Stamm KT2440 nicht pathogen und sogar als GRAS (*generally recognized as safe*) eingestuft (Martínez-García et al., 2014; Wu et al., 2011). Das Genom von KT2440 ist bereits seit über 10 Jahren vollständig sequenziert (Nelson et al., 2002) und über die Jahre sehr gut analysiert worden. Somit konnte bereits ein vergleichsweise großer Teil der Gene funktionell annotiert werden (Pseudomonas Genome DB; Winsor et al., 2011). *P. putida* zeichnet sich zudem durch einen sehr vielseitigen und bereits gut untersuchten Metabolismus aus (Blank et al., 2010; Nelson et al., 2002; Nikel et al., 2014; Poblete-Castro et al., 2012; Puchałka et al., 2008). Außerdem weist der Organismus eine große natürliche

Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Ethanol, verschiedenen Antibiotika sowie allgemein gegen verschiedene Xenobiotika auf (Fernández et al., 2012; Nikel und de Lorenzo, 2014; Simon et al., 2014). Zusammengenommen machen all diese Eigenschaften *P. putida* zu einem erfolgreichen Produzenten für verschiedenste Naturstoffe wie Polyketide, nicht-ribosomale Peptide, Terpene, Rhamnolipide und Alkaloide (Loeschcke und Thies, 2015). So wurde dieser Organismus bereits erfolgreich als Produzent für verschiedene Sekundärmetabolite, deren Biosynthesewege in Genclustern kodiert sind, eingesetzt (Beuttler et al., 2011; Loeschcke et al., 2013; Schmitz et al., 2015). *P. putida* bietet sich also als vielseitig einsetzbare Plattform für die Nutzung molekularbiologischer *tools* zur heterologen Expression von geclusterten Genen an.

### 1.5 Das TREX-System

Das <u>Transfer and Expression</u>- oder kurz TREX-System, welches in der AG Drepper (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) entwickelt wurde, ist ein molekularbiologisches *tool* zur heterologen Expression geclusterter Gene. Es konnte bereits mehrfach erfolgreich für verschiedene Gencluster eingesetzt werden (Loeschcke, 2012; Loeschcke et al., 2013). In erster Linie wurde das TREX-System als flexibel anwendbares screening tool entwickelt. Es ermöglicht es, schnell eine große Anzahl verschiedener Wirtsorganismen dahingehend untersuchen zu können, ob sie in der Lage sind, die von einem Gencluster kodierten Biosynthesegene funktionell zu exprimieren. Dies stellt eine Alternative zu den Strategien dar, die auf der Anpassung eines bestimmten Wirtes an die für eine erfolgreiche Sekundärmetabolit-Produktion nötigen Voraussetzungen und/oder der Anpassung des Genclusters an einen bestimmten Wirt basieren (vgl. 1.3). Im folgenden Kapitel werden der Aufbau und die Anwendung dieses Systems näher beschrieben.

#### 1.5.1 Aufbau des TREX-Systems

Das TREX-System besteht aus zwei Genkassetten, dem L-TREX und dem R-TREX (**Abb. 1.3** A), welche alle zur Anwendung des TREX-Systems nötigen funktionellen Elemente enthalten. Die Entwicklung und Etablierung durch Markert (2008) und Loeschcke (2012) erfolgte unter Berücksichtigung der in **1.3** aufgeführten Herausforderungen. Hierbei wurden die funktionellen Elemente so gewählt, dass eine schnelle Anwendbarkeit in einem großen Wirtsspektrum möglich ist. Die Funktionen der jeweiligen genetischen Elemente der beiden

TREX-Kassetten werden in **1.5.2** anhand ihrer spezifischen Rolle in der Anwendung des TREX-Systems näher erklärt.

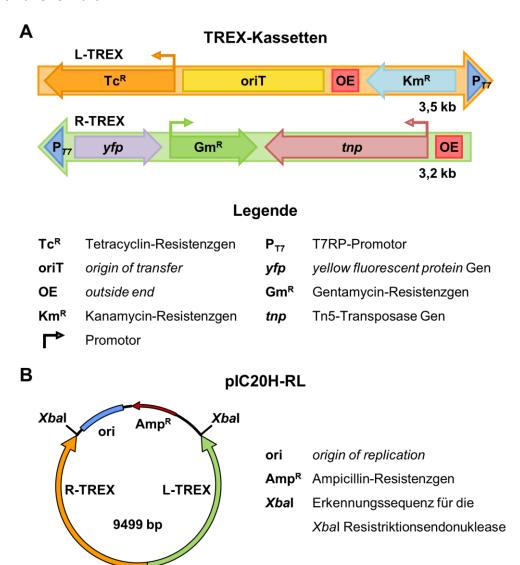


Abb. 1.3: Aufbau der TREX-Kassetten und des TREX-Vektors pIC20H-RL

A: Aufbau der beiden TREX-Kassetten (L-TREX orange und R-TREX grün) mit den jeweiligen funktionellen Elementen. Die hierbei gewählte Farbkodierung bleibt zur besseren Übersicht in der nachfolgenden, die Anwendung des TREX-Systems zeigenden Abb. 1.4 erhalten. Die Richtung der Pfeile entspricht der jeweiligen Orientierung der Gene und Promotoren in Bezug zu den anderen funktionellen Elementen. B: Darstellung des Vektors pIC20H-RL, der die beiden TREX-Kassetten enthält. Mithilfe der beiden eingetragenen Erkennungssequenzen für die Xbal Restriktionsendonuklease können die beiden TREX-Kassetten als zusammenhängendes Modul aus dem Vektor isoliert werden. Informationen zum Erstellen der Abbildungen entnommen aus Loeschcke et al. (2013).

Um eine schnellere Anwendbarkeit zu ermöglichen, wurden die beiden TREX-Kassetten in den Vektor pIC20H-RL (**Abb. 1.3** B) integriert. Wie in der Abbildung dargestellt, liegen die beiden Kassetten dabei nebeneinander aber in entgegengesetzten Richtungen auf dem Plasmid vor und werden von zwei Erkennungssequenzen für die *Xba*I

Restriktionsendonuklease flankiert. Dies ermöglicht die schnelle Isolierung des gesamten TREX-Systems, um es in einem Schritt für die Markierung eines Genclusters einsetzen zu können.

#### 1.5.2 Anwendung des TREX-Systems

In diesem Kapitel wird die Anwendung des TREX-Systems Schritt für Schritt anhand der schematischen Übersicht in **Abb. 1.4** erklärt.

#### Markierung des Genclusters mit den TREX-Kassetten (Abb. 1.4 A)

Zunächst muss das zu exprimierende Gencluster mit den beiden TREX-Kassetten markiert werden. Hierzu muss das Gencluster auf einem geeigneten Vektor, z.B. einem Plasmid oder Cosmid, vorliegen, dieser Vektor muss in *E. coil*, nicht jedoch in dem oder den gewählten Expressionswirten replizierbar sein. Dies ist nötig, um zum einen *E. coli* für molekularbiologische Techniken, wie die Vervielfältigung des Plasmids, nutzen zu können und um zum anderen im Expressionswirt direkt auf positive Transpositionsereignisse selektieren zu können. Die Nutzung eines auf *E. coli* limitierten Replikationsursprungs (*origin of replication*, ori) wie dem des Plasmids pMB1 ist also empfehlenswert. Die TREX-Kassetten können über *Xba*l-Restriktion aus pIC20H-RL (**Abb. 1.3** B) isoliert werden und über Ligation in den das Gencluster tragenden Vektor integriert werden. Sollte eine Integration aufgrund des Fehlens einer geeigneten, singulären Erkennungssequenz nicht durch restriktionsbasierte Klonierung erfolgen können, ist es möglich, auf restriktionsfreie Techniken, wie z.B. das Gibson Assembly® (Gibson et al., 2008a), zurückzugreifen. Zur Selektion stellt das TREX-System ein Tetracyclin-Resistenzgen (Tc<sup>R</sup>) in der L-TREX-Kassette und ein Gentamicin-Resistenzgen (Gm<sup>R</sup>) in der R-TREX-Kassette zur Verfügung (vgl. **Abb. 1.3** A).

#### Transfer des TREX-markierten Genclusters in den Expressionswirt (Abb. 1.4 B)

Das TREX-markierte Gencluster kann ausgehend vom auf der L-TREX-Kassette liegenden origin of transfer (oriT) (**Abb. 1.3** A) über Konjugation theoretisch in jeden Gram-negativen Wirt eingebracht werden. Zu diesem Zweck muss der Vektor mit dem TREX-markierten Gencluster zunächst in einen geeigneten *E. coli*-Donor, wie S17-1 (Simon et al., 1983), übertragen werden. *E. coli* ist für die Übertragung freier DNA leicht zugänglich, es bieten sich je nach Größe des Genclusters entweder chemische Transformation oder Transformation durch Elektroporation an (Swords, 2003; Woodall, 2003).

#### Integration des TREX-Gencluster-Transposons in das Wirtsgenom (Abb. 1.4 C)

Die Integration des TREX-Gencluster-Transposons in das Wirtsgenom erfolgt über Tn5-Transposition (Reznikoff, 2008). Der Transposon-Bereich ist durch jeweils ein OE (Goryshin und Reznikoff, 1998) auf beiden TREX-Kassetten begrenzt, das für die Tn5-Transposase (*tnp*) kodierende Gen liegt in der R-TREX-Kassette (vgl. **Abb. 1.3** A). Die Tn5-Transposition ins Wirtsgenom erfolgt ungerichtet an einen zufälligen Ort (Reznikoff, 2008; Steiniger et al., 2006). Bei der Transposition des rekombinanten TREX-Transposons geht der oriT verloren, so kann eine spätere Mobilisierung des Wirtsgenoms durch Konjugation ausgeschlossen werden. Zusätzlich geht die Tc<sup>R</sup> auf der L-TREX-Kassette verloren, dies ermöglicht neben der Positiv-Selektion auf Gentamicin (Gm<sup>R</sup> im Transposon-Bereich) noch eine Negativ-Selektion auf Tetracyclin (Tc<sup>R</sup> außerhalb des Transposon-Bereichs). Stämme die durch eine Transposition des TREX-Gencluster-Transposons entstehen, sind resistent gegen Gentamicin aber nicht mehr resistent gegen Tetracyclin.

#### Expression des Genclusters durch die T7RP (Abb. 1.4 D)

Im finalen Schritt erfolgt die konvergente Expression der gesamten Gene des Genclusters durch die T7RP ausgehend von den beiden das Gencluster flankierenden T7RP-Promotoren (Abb. 1.3 A). Die zueinander konvergente Anordnung der beiden T7RP-Promotoren, kombiniert mit der Fähigkeit der T7RP bakterielle Terminatoren zu ignorieren (Arvani et al., 2012; Drepper et al., 2005; Studier und Moffatt, 1986; Widenhorn et al., 1988), ermöglicht auch die vollständige Expression von bidirektional angeordneten Genclustern (Loeschcke et al., 2013). Zur Kontrolle der vollständigen Expression wurden zwei promotorlose Reportergene in das TREX-System eingebaut, ein Kanamycin-Resistenzgen (Km<sup>R</sup>) in der L-TREX-Kassette zur Kontrolle der Expression ausgehend vom P<sub>T7</sub> der R-TREX-Kassette sowie ein für das yellow fluorescent protein kodierendes Gen (yfp) in der R-TREX-Kassette zur Kontrolle der Expression ausgehend vom P<sub>T7</sub> der L-TREX-Kassette (Abb. 1.3 A). Die für die Expression benötigte T7RP wird hierbei als einziges benötigtes Element nicht direkt vom TREX-System zur Verfügung gestellt. Sie muss also entweder im Wirt vorliegen, hier existieren viele verschiedene Stämme, wie R. capsulaturs B10S-T7 (Katzke et al., 2010), Corynebacterium glutamicum T7 (Kortmann et al., 2014) oder Streptomyces lividans 10T7 (Lussier et al., 2010), um nur einige Beispiele zu nennen. Alternativ muss die T7RP nachträglich in den Wirt eingebracht werden, hierfür existieren zum einen Plasmide wie pML5-T7 (Arvani et al., 2012), zum anderen gibt es T7RP-Transposon-Systeme (Kang et al., 2007).

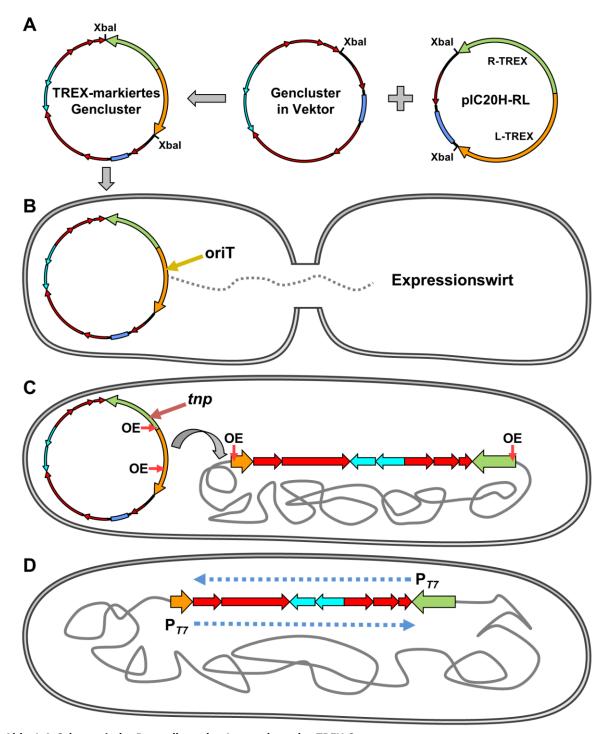


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Anwendung des TREX-Systems

A: Markierung eines auf einem Vektor vorliegenden Genclusters mit den auf pIC20H-RL liegenden TREX-Kassetten. B: Transfer des TREX-markierten Genclusters in den Expressionswirt durch Konjugation. C: Integration des TREX-Gencluster-Transposons in das Genom des Expressionswirtes durch Transposition. D: Expression der bidirektional angeordneten Zielgene durch die T7RP ausgehend von den beiden das Gencluster flankierenden T7RP-Promotoren. Die TREX-Kassetten sind als orange (L-TREX) und grüne Pfeilen (R-TREX) dargestellt. Das Beispiel-Gencluster wird durch rote und türkise Pfeile repräsentiert, die unterschiedlichen Farben kennzeichnen die unterschiedlichen Orientierungen der einzelnen Gene innerhalb des Genclusters. Xbal

= Erkennungsequenz für die Xbal Restriktionsendonuklease, oriT = origin of transfer, tnp = Tn5-Transposase Gen, OE = outside end,  $P_{T7}$  = T7RP-Promotor. Informationen zum Erstellen der Abbildungen entnommen aus Loeschcke et al. (2013).

Das TREX-System ist somit ein sehr flexibel anwendbares *screening tool*, um schnell geeignete Kombinationen aus Wirtsorganismus und Biosyntheseweg identifizieren zu können und gleichzeitig stabile Expressionsstämme zu erzeugen, ohne dabei das Gencluster an den Wirt oder den Wirt an das Gencluster anpassen zu müssen.

### 1.5.3 Limitierungen des TREX-Systems

Das TREX-System ist ein molekularbiologisches tool zur heterologen Expression geclusterter Gene. Es konnte bereits erfolgreich in verschiedenen Wirten, wie P. putida und R. capsulatus, sowie für verschiedene Gencluster, wie das crt-Gencluster Pantoea ananatis oder das pig-Gencluster aus Serratia marcescens, eingesetzt werden (Loeschcke et al., 2013). Das TREX-System kombiniert alle wichtigen genetischen Elemente für die Expression aller Gene eines Genclusters in einem breiten Wirtsspektrum, was es zu einem flexibel anwendbaren screening tool macht, mit dem schnell geeignete Kombinationen von Wirtsorganismus und Biosyntheseweg identifiziert werden können. Ein problematischer Punkt ist jedoch, dass das zu untersuchende Gencluster zunächst auf einem Plasmid bereitgestellt werden muss. Hierfür muss das Gencluster zunächst aus dem Genom des Herkunftsorganismus oder aus einer Metagenom-Bibliothek isoliert werden, wobei es je nach Größe nötig sein kann, das Gencluster sukzessiv, also in mehreren Schritten, klonieren zu müssen (Markert, 2008). Dies kann mitunter sehr zeitaufwendig sein und ist bei klassischen Restriktionsendonulease-basierten Klonierungsstrategien durch die in der Sequenz vorhandenen singulären Erkennungssequenzen limitiert. Neben der Bereitstellung des Genclusters kann es auch bei dessen Markierung mit den TREX-Kassetten zu Problemen kommen, denn diese basiert bei den momentanen Möglichkeiten ebenfalls primär auf Restriktionsendonulease-basierter Klonierung.

Hieraus ergibt sich folgende Situation: Mit einem TREX-markierten Gencluster können zwar schnell verschiedene Wirte getestet werden, aber die Markierung selbst sowie die Isolierung des Genclusters in einer für die TREX-Anwendung nutzbaren Form können äußerst zeitintensiv sein. Es wäre sogar denkbar, dass aufgrund fehlender singulärer Erkennungssequenzen besonders große Gencluster nicht bearbeitet werden können.

### 1.5.4 Mögliche Anpassungen des TREX-Systems

Einen vielversprechenden Ansatz zur Lösung des in 1.5.3 beschriebenen Problems bei der Isolierung und Markierung von Genclustern bildet die homologe Rekombination (HR) in der Hefe S. cerevisiae. Diese recombineering Technik wird bereits seit 1987 zur in vivo Herstellung von Plasmiden genutzt (Ma et al., 1987), über die Jahre wurden die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode sehr gut untersucht und erweitert. So wurde von Marykwas und Passmore (1995) erstmals gezeigt, dass es möglich ist, mehrere Fragmente in einem Schritt zu rekombinieren. Aufbauend auf der Entdeckung, dass bereits sehr kurze homologe Bereiche (HB) von nur etwa 30 bp für die HR ausreichen (Oldenburg et al., 1997), konnten Raymond et al. (1999) die erfolgreiche Anwendung von sogenannten Linkerfragmenten (<100 bp) in der HR zeigen. Derartige Linkerfragmente können aufgrund ihrer geringen Größe sehr günstig als Oligonukleotide bezogen werden und sind sehr flexibel einsetzbar (van Leeuwen et al., 2015a; Raymond et al., 1999). Die wichtigste Anwendung ist, sie ihrem Namen entsprechend als Verbindungsstück zwischen zwei, aufgrund fehlender HB eigentlich nicht für die HR miteinander geeigneter, DNA-Fragmente einzusetzen, damit diese miteinander rekombiniert werden können. Der mögliche Einsatz von PCR-Produkten für die HR wurde ebenfalls 1997 erstmals von Oldenburg et al. demonstriert, auch dies erhöht die Flexibilität der Methode weiter. Somit ist es möglich, Oligonukleotide mit beliebigen HB als PCR-Primer für Ziel-DNA-Fragmente einzusetzen, um eine nahtlose Rekombination verschiedener DNA-Fragmente zu gewährleisten. Dies bietet immense Möglichkeiten für die Arbeit mit Genclustern. Stückweise durch PCR erzeugte Teile eines Genclusters können demnach in beliebiger Reihenfolge miteinander rekombiniert werden. Zusätzlich ist für die Arbeit mit Genclustern jedoch auch die Möglichkeit, große DNA-Fragmente miteinander rekombinieren zu können, sehr wichtig. Hier zeigten Gibson et al. (2008b), dass es möglich ist, über HR in S. cerevisiae 25 Fragmente mit Größen zwischen 17 und 35 kb zu einem 592 kb großen synthetischen Genom (JCVI-1.1) zu rekombinieren. Aus diesen Gründen wird in modernene Ansätzen im Bereich der synthetischen Biologie und der Genclustergestützten Naturstoff-Produktion bereits vermehrt auf HR in S. cerevisiae gesetzt (Kim et al., 2015). TAR (transformation-associated recombination)-basierende Techniken werden hierbei eingesetzt, um Gencluster im Ganzen direkt aus eDNA von Metagenom-Proben oder anderen Quellen zu isolieren (Kim et al., 2010, 2015; Li et al., 2015; Zhang et al., 2016). Auch PCR-basierte HR wird bereits zur Klonierung von Genclustern eingesetzt (Kim et al., 2015;

van Leeuwen et al., 2015a; Montiel et al., 2015). Durch diese Methoden ist es möglich, direkt bei der Klonierung Änderungen im Gencluster, z.B. durch Abänderung der Genreihenfolge, vorzunehmen (van Leeuwen et al., 2015a; Montiel et al., 2015).

Zusammengefasst erfüllt die HR in *S. cerevisiae* alle Voraussetzungen dafür, die Isolierung und Markierung von Genclustern zu optimieren. Außerdem können bei einer Einbettung des TREX-Systems in einen *shuttle* Vektor für *S. cerevisiae/E. coli* sogar Isolierung und Markierung in einem Schritt vollzogen werden. Zusätzlich bringt die HR durch die Möglichkeit der einfachen Generierung und Untersuchung von Variationen der Gencluster weitere Flexibilität für das TREX-System.

### 1.6 Zielsetzung

Der Bedarf an neuen Pharmazeutika wächst stetig, wobei mikrobielle Sekundärmetabolite eine nahezu unerschöpfliche Quelle an potentiell pharmazeutisch wirksamen Naturstoffen bieten. Um Zugang zu diesen Naturstoffen zu bekommen, ist deren heterologe Produktion häufig der einzige Weg, da die ursprünglichen Produzenten nicht oder nur schlecht im Labor kultivierbar sind. Häufig sind die Biosynthesewege solcher Sekundärmetabolite in sogenannten Genclustern kodiert. Hieraus ergeben sich bei der heterologen Expression verschiedene Herausforderungen, da ein stabilier Expressionswirt erzeugt werden muss, der die effektive Expression sämtlicher Gene des Genclusters garantiert. Um derartige Gencluster effektiv zugänglich zu machen, bedarf es molekularbiologischer tools, die dies ermöglichen können. Ein solches tool ist das in der AG Drepper (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) entwickelte <u>Transfer and Expression</u>- oder kurz TREX-System. Dieses System wurde bereits erfolgreich als screening tool eingesetzt, um schnell verschiedene Wirtsorganismen auf ihre Kompatibilität mit einem Biosyntheseweg hin zu untersuchen.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob das TREX-System auch gezielt eingesetzt werden kann, um Stämme zu erzeugen, die eine kompetitive Produktion eines Sekundärmetaboliten ermöglichen. Hierzu wurde das für den Biosyntheseweg des pharmazeutisch wertvollen Prodigiosin kodierende *pig*-Gencluster aus *Serratia marcescens* ausgewählt. Unter Verwendung des vielversprechenden Expressionswirts *Pseudomonas putida* KT2440 sollen Stämme erzeugt werden, die größere Mengen an Prodigiosin produzieren können, die mindestens mit aus der Literatur bekannten Ausbeuten anderer heterologer Produktionssysteme vergleichbar sind. Dabei soll analysiert werden, ob die unidirektionale Anordnung des *pig*-Genclusters in Kombination mit der zufälligen Tn5-Transpositon genutzt werden kann, um Stämme zu erzeugen, in denen das Gencluster unter Nutzung starker nativer Promotoren unabhängig von der T7RP konstitutiv exprimiert werden kann. Für vielversprechende Produktionsstämme soll anschließend der Insertionsort des TREX-*pig*-Transposons determiniert werden. Die gewonnenen Informationen über den Insertionsort könnten anschließend gegebenenfalls für andere Anwendungen genutzt werden.

Neben Prodigiosin selbst sind auch seine Derivate von großem pharmazeutischem Interesse. Daher soll im Rahmen der Arbeit weiterhin versucht werden, auf Basis eines zuvor erzeugten effizienten Prodigiosin-Produktionsstammes, einen Stamm zu erzeugen, der durch gezielte

pig-Gendeletionen defizient in der Biosynthese der Prodigiosinvorstufe MAP ist. Durch einen solchen Stamm könnten über die sogenannte Mutasynthese Prodigiosin-Derivate erzeugt werden. Dieses Projekt erfolgt in Kooperation mit Andreas Sebastian Klein (Institut für Bioorganische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Er wird verschiedene MAP-Derivate chemisch synthetisieren, die dem für die Biosynthese von MAP defizienten Mutanten-Stamm in vivo zugefüttert werden sollen. Werden sie vom kondensierenden Enzym PigC anstelle von MAP als Substrat angenommen, entsteht in der Mutasynthese ein Prodigiosin-Derivat.

Im letzten Teil dieser Arbeit soll schließlich untersucht werden, ob sich die Anwendung des TREX-Systems in Bezug auf die Gencluster-Klonierung vereinfachen und somit beschleunigen lässt. Dies soll durch die Ermöglichung der homologen Rekombination in *S. cerevisiae* erfolgen. Diese Methode würde neben der vereinfachten Klonierung von Genclustern auch die leichtere Manipulation von Gencluster-kodierten Biosynthesewegen erlauben.

# 2 Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden unter Einhaltung der jeweiligen Sicherheitsbestimmungen durchgeführt. Arbeiten mit biologischen Arbeitsstoffen wurden entsprechend der in der Biostoffverorndung (BioStoffV) definierten Schutzstufen durchgeführt. Bei der Arbeit mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) wurden die im Gentechnikgesetz (GenTG) und in der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) angegebenen Sicherheitsmaßnahmen entsprechend der in § 7 GenTG angegebenen Sicherheitsstufen, angewandt.

### 2.1 Bakterien- und Hefestämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen lagen in der Stammsammlung des IMET vor oder wurden über ATCC® (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) bzw. die DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Bakterien- und Hefestämme

Organismus	Stamm	Relevante genotypische Merkmale	Quelle/Referenz
E. coli	DH5α	F Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk⁻, mk⁺) phoA supE44λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	(Grant et al., 1990; Hanahan, 1983)
E. coli	S17-1	recA, thi, pro, hsdR <sup>™</sup> [RP4 2- Tc <sup>R</sup> ::Mu::Km <sup>R</sup> Tn7] Tp <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup>	(Simon et al., 1983)
P. putida	KT2440	Wildtyp	(Bagdasarian et al., 1981; Nelson et al., 2002)
P. putida	pig-r1-52	P. putida KT2440::TREX-LpigR Gm <sup>R</sup>	diese Arbeit
P. putida	pig-r1 ΔpigD	P. putida KT2440::TREX-LpigR ΔpigD Gm <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup>	diese Arbeit
P. putida	pig-w1	P. putida KT2440::TREX-RpigL Gm <sup>R</sup>	diese Arbeit
P. putida	pig-y1-3	P. putida KT2440::yTREXpig Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
S. cerevisiae	VL6-48	MATa, his3-Δ200, trp1-Δ1, ura3–52, lys2, ade2–101, met14	ATCC <sup>®</sup> MYA-3666 <sup>™</sup> (Kouprina et al., 1998)
S. marcescens	W838	Wildtyp	DSM No. 12487

### 2.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden aus der Sammlung des IMET oder über ATCC® (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) bezogen. Eine Darstellung der jeweiligen Plasmidkarten befindet sich im Anhang (**Abb. 8.1**).

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Plasmide

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Quelle / Referenz
pHP45Ω	pHP45Ω Amp <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>	
pIC20H-RL	Amp <sup>R</sup> , L- & R-TREX	(Loeschcke et al., 2013)
pig-r1-Ncol-PR	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pig-r2-Mlul-PR	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pK18	Km <sup>R</sup>	(Pridmore, 1987)
pML5-T7 (pML5-P <sub>lac</sub> T7)	Tc <sup>R</sup> , Plac T7pol, <i>laql</i>	(Arvani et al., 2012)
pPIG	Amp <sup>R</sup> , W838 <i>pig</i> -Gencluster	(Loeschcke et al., 2013)
pSUP202	Mob, pBR322 ori, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	(Simon et al., 1983)
pSUP202-pigCaadApigD	Mob, pBR322 ori, Tc <sup>R</sup> + <i>pigC-aadA-pigD</i>	diese Arbeit
pSUP202-pigCD	Mob, pBR322 ori, Tc <sup>R</sup> + <i>pigCD</i>	diese Arbeit
pTREX-LpigR (pL>PIG <r)< td=""><td>pPIG + L- &amp; R-TREX aus pIC20H-RL</td><td>(Loeschcke et al., 2013)</td></r)<>	pPIG + L- & R-TREX aus pIC20H-RL	(Loeschcke et al., 2013)
pTREX-RpigL (pR>PIG <l)< td=""><td>pPIG + L- &amp; R-TREX aus pIC20H-RL</td><td>(Loeschcke et al., 2013)</td></l)<>	pPIG + L- & R-TREX aus pIC20H-RL	(Loeschcke et al., 2013)
YCp50-poly	URA3, CEN4/ARS1, Amp <sup>R</sup> , pMB1 ori	ATCC <sup>®</sup> 87555™ (Wang und Stillman, 1993)
YCp50-poly-KmR	URA3, CEN4/ARS1, Km <sup>R</sup> , pMB1 ori	diese Arbeit
yTREX	YCp50-poly-Km <sup>R</sup> + L- & R-yTREX	diese Arbeit
yTREXpig	yTREX + W838 pig-Gencluster	diese Arbeit

# 2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligionukleotide wurden mithilfe von Clone-Manager 9.2 erzeugt und über Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Eingebaute Erkennungssequenzen von Restriktionsendonuklease sind in der Nukleotidsequenz unterstrichen, die jeweilige Restriktionsendonuklease ist am Ende der Nukleotidsequenz in Klammern eingetragen.

Nr.	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	
	Für PCR verwendete Oligonukleotide		
AD9	Aphllfwd	GGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCTTCCAT <u>CGAT</u> <u>CG</u> CCCGGATGAATGTCAGCTAC ( <u>Pvul</u> )	
AD10	Aphllrev	AATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTTGGTCTGACAG <u>GAGCTC</u> GCTCAGAAGAACTCGTCAAG ( <u>Sacl</u> )	
AD49	aadAfwd	CATAT <u>CGCGCGCG</u> TCTGATTATGGAGCAGCAACGATG ( <u>MauBl</u> )	
AD50	aadArev	GTCGC <u>GCGATCGC</u> TTATTTGCCGACTACCTTGG ( <u>Asisl</u> )	
AD53	KmTREX	TGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTG	
AD54	rRNAUSR	GTCATTTGAGATTGCTGAGCCAAGTTTAGGG	
AD79	aadAStart	AAAGCTCGCCGCGTTGTTTC	
AD80	aadAStop	AAATCGCGCCGAAGGATGTC	
AD81	pigC1	GTATGGCGTGATGGCCGAAC	
AD82	pigE1	TGAAGATCGAGCCGGGTTGC	
AD106	rRNAA	TACGGTTGTCGGAGACGCCAGTGGAGTATC	

Nr.	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')
AD107	rRNAB	CCCATCCCGAACTCAGTAGTGAAACGATGC
AD108	rRNAC	AAGAAGTCGTTTGGCCGGGTTACCCTCAAG
AD109	rRNAD	CATGAAGCGTCGCAGTTTGCATTCCCTAGC
AD110	rRNAE	AGGATCACTGCAAGAAAGCCCGCACTGTAG
AD111	rRNAF	AGCAGCATGATGCTGGCGAAGATCAGG
AD112	rRNAG	CTTGGGTTGGGCTTGTTGCATTTCCTGTGG
	Fü	r Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide
AD16	Seq out OER	ACGGGAAAGGTTCCGTTCAGG
AD17	rot1 1fwd	GTACAGAGGGTTGCCAAG
AD18	rot2 1fwd	CGCTGTGAAGATGCAGTG
AD39	seqAphIIfwd	TCTGACGCTCAGTGGAAC
AD40	seqAphIIrev	GCGCATTCACAGTTCTCC
AD41	seqTREXfwd	GATGAACAGGCAGACATC
AD42	seqTREXrev	GGCGAATCATGGACATAC
AD44	seqGApigCfwd	ACGCTCGTCGTTTGGTATGG
AD48	inpigC	AGCAACCAGGCGTTTAAG
AD61	seqaadAfwd	AGTCCATCCACAGGCACAAC
AD62	seqaadAfwd2	AATGTACGGCCAGCAACGTC
AD63	SeqKmTREX	CCCGTGATATTGCTGAAGAG
AD90	HR-L-F	GGCCGTTGAATCGGGATATG
AD93	HR-R-R	TAGCAGCACGCCATAGTGAC
AD133	r16Sseq	CGGTATTAGCGTTCCTTTCG
AD134	r16SUSR	TTTCCTCAGAGCCTGTCAAG
AD135	r16SUSR_C	TTCGATCGTAGCCCTTTCAG
Für RT-qPCR verwendete Oligonukleotide		
AD119	FwqPCRpigA	CAACGACGTCTTCATTCCAG
AD120	RvqPCRpigA	CATTGAATCGTGGAAGATGG
AD153	Fw-qPCR pigN	TACCTGATAGGCACGCTGTT
AD154	Rv-qPCR pigN	TTGTTCGGATCCTGTTTGAA
AD155	Fw-qPCR rpoD	TCGCCAAGAAGTACACCAAC
AD156	Rv-qPCR rpoD	TTTCATCAGACCGATGTTGC

### 2.4 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in der jeweils für die benötigte Anwendung adäquaten Reinheit bezogen. Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien sowie die jeweilige Bezugsquelle ist in **Tab. 2.4** dargestellt.

Tab. 2.4: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Agar-Agar Kobe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie	Bezugsquelle
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin (Amp)	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
dNTP Mix (je 10 mM)	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Gentamicin (Gm)	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Hefe-Stickstoff-Basismedium (YNB)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Irgasan (Irg)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Kaiser Mixture, SC -Ura (SC -URA)	Formedium Ldt., Norfolk, Großbritannien
Kanamycin (Km)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lithiumacetat (LiAc)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Polyethylenglykol (PEG) 3350	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Pepton	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure (HCI)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin (Sm)	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Lachssperma SS DNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Terrific-Broth-Medium modifiziert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tetracyclin (Tc)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS Hydrochlorid (TRIS-HCI)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## 2.5 Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer sowie ihre Zusammensetzung sind in **Tab. 2.5** dargestellt. Der Ansatz erfolgte immer mit vollentsalztem (VE)-Wasser. Puffer, die einen bestimmten pH-Wert benötigen, wurden mit dem Calimatic 766 Labor-pH-Meter kontrolliert und gegebenenfalls mit zum Puffer passenden Säuren/Basen auf den gewünschten pH-Wert

eingestellt. Lösungen einer einzelnen Substanz werden jeweils im betreffenden Kapitel beschrieben.

Tab. 2.5: Übersicht der verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung	
	EDTA	100 mM
DNA Probenpuffer (5x)	Glycerin	40 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
	TRIS	45 mM
TBE-Puffer (0,5x)	Borsäure	45 mM
	EDTA	1 mM
TE-Puffer (pH 8,0)	TRIS-HCI	10 mM
TE-Fullet (ph 6,0)	EDTA	1 mM

## 2.6 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden ausnahmslos über die ThermoFisher Scientific GmbH (Waltham, USA) bezogen. Weitere verwendete Enzyme sind in **Tab. 2.6** mit der jeweiligen Bezugsquelle aufgelistet.

Tab. 2.6: Übersicht der verwendeten Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
I-Scel	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
T4 DNA Ligase	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
FastAP Alkaline Phosphatase	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Zymolyase	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

# 2.7 Molekularbiologische Kits

Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Kits sowie des jeweiligen Herstellers ist in **Tab. 2.7** dargestellt.

Tab. 2.7: Übersicht der verwendeten molekularbiologischen Kits

Bezeichnung	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
DNA-free™ DNA Removal Kit	Life Technologies AG, Carlsbad, USA
innuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit für RT-qPCR	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
NucleoBond <sup>®</sup> Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

### 2.8 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten gängigen Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße (RGs), Pipettenspitzen oder ähnliches wurden über VWR international GmbH (Darmstadt, Deutschland), BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), Sarstedt AG (Nümbrecht, Deutschland), Ratiolab GmbH (Dreieich, Deutschland) und Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bezogen. Unübliche Verbrauchsmaterialien sowie der jeweilige Hersteller sind in **Tab. 2.8** zusammengefasst. Glaswaren wie Laborflaschen und Erlenmeyerkolben wurden über die VWR international GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen, Schikanen für Erlenmeyerkolben wurden in der Glastechnischen Abteilung des ZEA-1 im Forschungszentrum Jülich (Jülich, Deutschland) nachträglich eingearbeitet.

Tab. 2.8: Übersicht spezieller verwendeter Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Atmungsaktiver Viskosefilm für MTP	VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
Celluloseacetat-Membran 0,2 μm, ø 25 mm, Whatman <sup>®</sup>	GE Healthcare, Maidstone, Großbritannien
DNA LoBind Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ep Dualfilter T.I.P.S.®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FlowerPlate <sup>®</sup> MTP	m2p-labs GmbH, Baesweiler, Deutschland
Kryoröhrchen, CryoTubes™	Nalge Nun International, Rocherster, USA
Spitzenvorsatzfilter (steril), 0,2 µm	VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland

### 2.9 Geräte

Eine Auflistung der verwendeten Geräte sowie ihre jeweilige Bezugsquelle ist in **Tab. 2.9** dargestellt.

Tab. 2.9: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, USA
SB2, Rotator	Bibby Scientific Ltd., Stone, Großbritannien
Tprofessional Basis Gradient Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
PowerPac™ Basic, Netzteil	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Wide Mini-Sub Cell GT, Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
TH15, Inkubationshaube	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
TiMix, MTP-Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
VKS 75 control, Vielkolben Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
ThermoMixer® C, MTP-Inkubationsschüttler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ThermoStat Plus, Inkubationsschüttler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikro 200, Mikroliterzentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Mikro 200R, Mikroliterzentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Rotina 380R, Zentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Multitron Pro, Inkubationsschüttler	Infors AG, Basel, Schweitz
Multitron Standard, Inkubationsschüttler	Infors AG, Basel, Schweitz
Calimatic 766, Labor-pH-Meter	Knick GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Thriller <sup>®</sup> ,Inkubationsschüttler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
MM 400, Schwingmühle	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Eagle Eye II-System, Geldokumentationssystem	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
Systec VX-55, Autoklav	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Infinite <sup>®</sup> M1000 Pro, MTP- Fluoreszenzphotometer	TECAN Group Ltd. , Männedorf, Schweitz
GENESYS™, UV-Vis Spektrophotometer	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
HeraSafe™ KS12 Typ II, Sicherheitswerkbank	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Sorvall <sup>®</sup> RC-6™ Plus, Zentrifuge	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
NanoDrop 2000c, UV-Vis Spektrophotometer	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA

## 2.10 Software

Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Software sowie die jeweilige Bezugsquelle ist in **Tab. 2.10** dargestellt.

Tab. 2.10: Übersicht der verwendeten Software

Software	Bezugsquelle
Lizenzsoftware	Hersteller
BioEdit 7.2.5	Ibis Biosciences, Carlsbad, USA
ChemOffice2015	PerkinElmer, Waltham, USA
Clone-Manager 9.2	Scientific and Educational Software, Denver, USA

Software	Bezugsquelle			
i-control 1.11	TECAN Group Ltd. , Männedorf, Schweitz			
Mendeley Desktop	Mendeley Ltd. , London,	Großbritannien		
Microsoft Office 2010	Microsoft Corp. ,Redmond, USA			
OriginPro 9.0G	OriginLab Corp. , Northhampton, USA			
Online-Tools	URL	Referenz		
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/	(Altschul et al., 1990)		
BPROM	http://www.softberry.com/berry.phtml	(Solovyev und Salamov, 2011)		
Clustal omega	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/	(Sievers et al., 2011)		
Primer3Web	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/	(Untergasser et al., 2012)		
Pseudomonas GDB	http://www.pseudomonas.com/	(Winsor et al., 2015)		
SMS2, DNA Molecular Weight	http://www.bioinformatics.org/sms2/dna mw.html	(Stothard, 2000)		

## 2.11 Mikrobiologische Methoden

Die im Folgenden aufgelisteten Methoden behandeln den Umgang mit Reinkulturen eines bestimmten Organismus, eines bestimmten Stammes oder eines bestimmten Klones. Um Kontaminationen dieser Kulturen zu vermeiden wurden alle benutzten Puffer und Lösungen vor Gebrauch durch Autoklavieren oder Sterilfiltrieren sterilisiert. Benötigte Verbrauchsmaterialien wurden bereits steril bezogen oder durch Autoklavieren sterilisiert. Erlenmeyerkolben wurden mit Alufolie oder geeigneten Aluminiumdeckeln abgedeckt und durch eine ca. 12 h dauernde Hitzebehandlung (180 °C) sterilisiert. Arbeiten, bei denen ein Kulturgefäß oder eine Platte mit Festmedium geöffnet werden musste, wurden im sterilen Arbeitsbereich eines Bunsenbrenners oder unter einer Sicherheitswerkbank (HeraSafe™ KS12) durchgeführt.

#### 2.11.1 Nährmedien zur Anzucht von Bakterien

Die in dieser Arbeit für die Anzucht von verschiedenen Bakterien verwendeten Nährmedien wurden als Fertigmischungen bezogen (vgl. **Tab. 2.4**) und nach Hersteller-Angaben in VE-Wasser angesetzt. Die Zusammensetzung der Fertigmischungen ist in **Tab. 2.11** dargestellt. Bei der Erzeugung von Festmedien wurden 15 g/L Agar-Agar hinzugefügt; im Folgenden werden solche Festmedien als LB- oder TB-Agar bezeichnet. Zur Sterilisation wurden die Medien in geeigneten Gefäßen für 20 min bei 200 kPa und 121 °C autoklaviert (Systec VX-55).

Tab. 2.11: Übersicht der für Bakterien verwendeten Nährmedien

Medium	Zusammensetzung		
	Trypton	10 g/L	
LB-Medium (LB) (Lysogeny-Broth nach Miller)	Hefeextrakt	5 g/L	
(Lysogerry Broat Hasti Willer)	NaCl	10 g/L	
	Casein	12 g/L	
TB-Medium (TB)	Hefeextrakt	24 g/L	
(Terrific-Broth-Medium modifiziert)	K₂HPO₄	9,4 g/L	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,2 g/L	

#### 2.11.2 Antibiotika

Die in dieser Arbeit zur Selektion eingesetzten Antibiotika sowie die hierfür eingesetzten Konzentrationen sind in **Tab. 2.12** zusammengefasst, für die jeweilige Bezugsquelle vgl. **Tab. 2.4.** Zur Sterilisation wurden die Antibiotika-Lösungen steril filtriert (Spitzenvorsatzfilter, 0,2 μm). In flüssigem Nährmedium wurden sie direkt vor der Verwendung hinzugefügt, bei festem Nährmedium erfolgte die Zugabe nach dem Autoklaviervorgang direkt vor dem Gießen von Platten bei Temperaturen von unter 50 °C. Antibiotika-haltige Medien werden im Folgenden mit einem Index gekennzeichnet, beispielsweise LB<sub>Amp</sub> oder LB<sub>Amp</sub>-Agar.

Tab. 2.12: Übersicht der zur Selektion verwendeten Antibiotika und der genutzten Konzentrationen

	Stocklösung		Konzentration [µg/mL] im Medium	
Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration [μg/mL]	E. coli	P. putida
Ampicillin (Amp)	H <sub>2</sub> O	100	100	-
Gentamicin (Gm)	H <sub>2</sub> O	25	10	25
Irgasan (Irg)	70% EtOH	25	-	25
Kanamycin (Km)	H <sub>2</sub> O	50	50	25
Streptomycin (Sm)	H <sub>2</sub> O	400	-	80
Tetracyclin (Tc)	70% EtOH	50	10	50

### 2.11.3 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung der verschiedenen *E. coli* Stämme erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C, unter Schütteln mit 120 Umdrehungen pro Minute (UpM) und in zu 10 % mit LB (2.11.1) gefüllten Erlenmeyerkolben als Standardbedingungen. Auf Festmedium erfolgte die Inkubation auf LB-Agar bei 37 °C. Dem Medium wurde bei Bedarf entsprechend der in **Tab.** 2.12 angegebenen Konzentrationen ein oder mehrere Antibiotika zur Selektion beigefügt. Vorkulturen, die zur späteren Inokulation einer anderen Kultur genutzt wurden, werden im

Folgenden auch bei anderen Mikroorganismen, als ÜK (Übernachtkulturen) bezeichnet. Diese wurden entweder aus einer Einzelkolonie von LB-Agar oder aus einer Kryokultur (2.11.4) inokuliert und unter Standardbedingungen über Nacht (mindestens 16 h) angezogen. Die optische Dichte (OD) als Indikator für die Zelldichte von *E. coli* Kulturen wurde photometrisch mit einem GENESYS™ UV-Vis Spektrophotometer bei 580 nm bestimmt.

### 2.11.4 Kryokonservierung von *E. coli*

Zur dauerhaften Lagerung von *E. coli* wurden Kryokulturen hergestellt. Hierfür wurde 1 mL einer ÜK (**2.11.3**) mit 1 mL Glycerol (80 %, Endkonzentration 40 %) vermengt und in 2 mL Kryoröhrchen bei -80 °C eingelagert. Methode modifiziert nach Koh (2013).

### 2.11.5 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli-*Zellen

Die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte geringfügig modifiziert nach der Calciumchlorid/Magnesiumchlorid-basierten Methode (Hanahan, 1983). Aus einer ÜK (**2.11.3**) wurde eine Hauptkultur (100 mL LB) auf eine OD<sub>580nm</sub> von 0,05 inokuliert und unter *E. coli* Standardbedingungen bis zum Erreichen einer OD<sub>580nm</sub> von 0,5-0,7 inkubiert. Die Zellen der Kultur wurden pelletiert (5 min, 4000 UpM, 4 °C), anschließend in 10 mL gekühltem MgCl<sub>2</sub> (100 mM) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (5 min, 4000 UpM, 4 °C) wurde das Pellet in 4 mL gekühltem CaCl<sub>2</sub> (100 mM) resuspendiert und mit 1 mL gekühltem Glycerol (80 %) vermischt. Die chemisch-kompetente *E. coli* Suspension wurde in 100 μL Portionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 2.11.6 Kultivierung von *P. putida* und *S. marcescens*

Die Kultivierung von *P. putida* und *S. marcescens* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 30 °C, unter Schütteln mit 120 UpM und in zu 10 % mit LB (2.11.1) gefüllten Erlenmeyerkolben als Standardbedingungen. Auf Festmedium erfolgte die Inkubation auf LB-Agar bei 30 °C. Dem Medium wurde bei Bedarf entsprechend der in **Tab. 2.12** angegebenen Konzentrationen ein oder mehrere Antibiotika zur Selektion beigefügt. ÜK wurden entweder aus einer Einzelkolonie von LB-Agar oder aus einer Kryokultur (2.11.7) inokuliert und unter Standardbedingungen über Nacht (mindestens 16 h) angezogen. Die OD als Indikator für die Zelldichte von *P. putida* und *S. marcescens* Kulturen wurde photometrisch mit einem GENESYS™ UV-Vis Spektrophotometer bei 650 nm bestimmt.

### 2.11.7 Kryokonservierung von *P. putida*

Zur dauerhaften Lagerung von *P. putida* wurden Kryokulturen hergestellt. Hierfür wurden 1,8 mL einer ÜK (**2.11.6**) mit 135  $\mu$ L steril filtriertem (Spitzenvorsatzfilter, 0,2  $\mu$ m) DMSO (Endkonzentration 7 %) vermengt und in 2 mL Kryoröhrchen bei -80 °C eingelagert. Methode modifiziert nach Koh (2013).

### 2.11.8 Nährmedien zur Anzucht von Saccharomyces cerevisiae

Die für die Anzucht von *S. cerevisiae* verwendeten Nährmedien und ihre Zusammensetzung, modifiziert nach Sherman (2002), sind in **Tab. 2.13** zusammengefasst. Bei YPD-Medium (*yeast peptone dextrose*) handelt es sich um ein Vollmedium, SD-Medium (*synthetic dextrose*) ist ein zur Selektion gedachtes Minimalmedium. In dieser Arbeit wurde ausschließlich der für Uracil (Ura) auxotrophe Stamm VL6-48 (**Tab. 2.1**; Kouprina et al., 1998) verwendet, dem SD-Medium wurde zur Selektion also ein SC-Ura (*synthetic complete* ohne Uracil) Medienzusatz entsprechend der Kaiser-Mixtur beigefügt (**Tab. 2.4**; Kaiser et al., 1994). Die Medien wurden mit VE-Wasser angesetzt und zur Sterilisation in geeigneten Gefäßen für 20 min bei 200 kPa und 121 °C autoklaviert (Systec VX-55). Bei der Erzeugung von Festmedien wurden 20 g/L Agar-Agar hinzugefügt; im Folgenden werden solche Festmedien als YPD- oder SD-<sub>Ura</sub>-Agar bezeichnet. Bei SD-<sub>Ura</sub> Medium wurde die Glukose in Form einer 10-fach Stocklösung (200 g/L) separat autoklaviert und nach dem Autoklaviervorgang hinzugefügt.

Tab. 2.13: Übersicht der für S. cerevisiae verwendeten Nährmedien

Medium	Zusammensetzung		
	Pepton	20 g/L	
YPD-Medium (YPD)	Hefeextrakt	10 g/L	
	Glukose	20 g/L	
	YNB	6,7 g/L	
SD-Medium ohne Uracil (SD <sub>-Ura</sub> )	SC -Ura	1,926 g/L	
	Glukose	20 g/L	

### 2.11.9 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 30 °C, unter Schütteln mit 120 UpM und in 10 % mit YPD (**2.11.8**) gefüllten Erlenmeyerkolben als Standardbedingungen. Auf Festmedium erfolgte die Inkubation auf YPD-Agar bei 30 °C. Sowohl auf Festmedium als auch in Flüssigmedium erfolgte die Kultivierung im Dunkeln.

Plasmid-tragende *S. cerevisiae* wurden in SD<sub>-Ura</sub> (**2.11.8**) Selektionsmedium (flüssig oder fest) unter ansonsten gleichen Bedingungen angezogen. ÜK wurden entweder aus einer Einzelkolonie von YPD-Agar oder aus einer Kryokultur (**2.11.10**) inokuliert und unter Standardbedingungen über Nacht (mindestens 24 h) angezogen. Die OD von *S. cerevisiae* Kulturen wurde photometrisch mit einem GENESYS™ UV-Vis Spektrophotometer bei 600 nm bestimmt.

### 2.11.10 Kryokonservierung von *S. cerevisiae*

Zur dauerhaften Lagerung von *S. cerevisiae* wurden Kryokulturen hergestellt. Hierfür wurden 850  $\mu$ L einer ÜK (**2.11.9**) mit 150  $\mu$ L durch Autoklavieren sterilisiertem Glycerol (Endkonzentration 15 %) vermengt und in 2 mL Kryoröhrchen bei -80 C eingelagert. Methode modifiziert nach Koh (2013).

## 2.12 Molekularbiologische Methoden

#### 2.12.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation chemisch-kompetener *E. coli*-Zellen erfolgte geringfügig modifiziert nach der Hitzeschock-Methode (Hanahan, 1983). Ein Aliquot von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen (**2.11.5**) wurde auf Eis aufgetaut, mit bis zu 10  $\mu$ L eines Ligationsansatzes (**2.12.12**) oder 5-500 ng isolierter Plasmid-DNA (**2.12.4** oder **2.12.5**) versetzt und für 30-60 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz einem Hitzeschock von 42 °C für 60-120 s ausgesetzt, anschließend mit 700  $\mu$ L LB versetzt und für die phänische Expression für 1,5 h bei 37 °C am Rotator inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1 min, maximale UpM), das Pellet in 100  $\mu$ L LB aufgenommen und auf mit zur Selektion auf das transformierte Plasmid geeigneten Antibiotika versetztem LB-Agar ausgestrichen.

### 2.12.2 *In vivo* Rekombination von DNA in *S. cerevisiae*

Zur *in vivo* Rekombination von DNA in *S. cerevisiae* wurden Hefezellen mit DNA-Fragmenten transformiert, deren homologe Bereiche (HB) intrazellulär zu vollständigen Plasmiden rekombiniert wurden.

#### 2.12.2.1 Transformation von S. cerevisiae

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte modifiziert nach der LiAc/SS carrier DNA/PEG Methode (Gietz und Schiestl, 2007). Aus einer ÜK (**2.11.9**) in YPD wurde eine 50 mL

Hauptkultur in YPD auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,25 inokuliert und unter Standardbedingungen bis zum Erreichen einer  $OD_{600nm}$  von 0,8-1,0 inkubiert. Die Zellen der Kultur wurden pelletiert (5 min, 4000 UpM, 4 °C), anschließend in 25 mL VE-Wasser resuspendiert und erneut pelletiert (5 min, 4000 UpM, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 mL LiAc (100 mM) resuspendiert, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (1 min, maximale UpM) und anschließend in 500  $\mu$ L LiAc (100 mM) resuspendiert. Die LiAc-kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen wurden in Aliquots zu je 50  $\mu$ L portioniert und bis zur Transformation (maximal 2 Tage) bei 4 °C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot der LiAc-kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen durch Zentrifugation (1 min, maximale UpM) sedimentiert und in 36  $\mu$ L LiAc (1 M) resuspendiert. Anschließend wurden 240  $\mu$ L PEG 3350 (50 % w/v), 50  $\mu$ L Carrier DNA (2 mg/mL Lachssperma SS DNA in TE-Puffer (**Tab. 2.5**), vor der Benutzung 10 min bei 99 °C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt), sowie die zu transformierende DNA, gelöst in 34  $\mu$ L VE-Wasser, hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde gut durchmischt und für 30 min bei 30 °C am Rotator inkubiert. Danach erfolgte für 30 min der Hitzeschock bei 42 °C, anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1 min, maximale UpM) und das entstandene Pellet in 200  $\mu$ L VE-Wasser resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 180 und 20  $\mu$ L aufgeteilt und jeweils auf Selektionsmedium (SD-Ura-Agar, **2.11.8**) ausplattiert und 48 h bei 30 °C inkubiert.

### 2.12.2.2 Verwendete Parameter für die homologen Rekombination von DNA-Fragmenten

In dieser Arbeit wurden durch Hydrolyse mittels Restriktionsendonukleasen sowie durch PCR erzeugte DNA-Fragmente zur *in vivo* Rekombination eingesetzt. Dabei wurden 30-40 bp lange BH für die Ermöglichung der homologen Rekombination genutzt. Bei der Nutzung von PCR-Fragmenten wurden diese Bereiche über die verwendeten Oligonukleotide integriert. Für die homologe Rekombination wurden 0,1-1 µg jedes DNA-Fragmentes, wie in **2.12.2.1** beschrieben in *S. cerevisiae* eingebracht. Dabei wurden die DNA Mengen so gewählt, dass jeweils etwa die gleiche Anzahl an Fragmenten transformiert wurde.

### 2.12.3 Plasmid-Übertragung von E. coli zu P. putida durch Konjugation

Zur Plasmid-Übertragung wurde der *E. coli* Stamm S17-1 (Simon et al., 1983) als Donorstamm verwendet. Chemisch kompetente Zellen dieses Stammes (**2.11.5**) wurden mit dem zu übertragenden Plasmid transformiert (**2.12.1**). Die eigentliche Konjugation erfolgte

modifiziert nach Simon et al. (1983, 1986). Es wurden ÜKs des mit dem zu übertragenden Plasmid transformierten Donorstammes sowie des Rezipientenstammes *P. putida* KT2440 angezogen. Je Stamm wurden 500 μL beider Kulturen in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vermischt, durch Zentrifugation (1 min, maximale UpM) sedimentiert, in 1 mL LB gewaschen, erneut sedimentiert (1 min, maximale UpM) und in 150 μL LB resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf eine, zuvor auf einer LB-Agar Platte ausgelegte, Celluloseacetat-Membran (0,2 μm, ø 25 mm) gegeben und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1 mL LB in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß von der Celluloseacetat-Membran gelöst, die entstandene Zellsuspension wurde zentrifugiert (1 min, maximale UpM). Das entstandene Pellet wurde in 200 μL LB resuspendiert und auf LB-Agar ausplattiert. Die LB-Agar Platten enthielten neben dem oder den zur Selektion verwendeten Antibiotika auch Irgasan (Irg), welches das Wachstum von *E. coli* S17-1 verhindert, das Wachstum von *P. putida* KT2440 jedoch nicht beeinflusst.

### 2.12.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem innuPREP Plasmid Mini Kit oder dem NucleoBond® Xtra Midi Kit, jeweils nach Herstellerangaben. Beide Kits funktionieren nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit Nuklease-freiem Wasser. So isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.12.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte in einer Kombination der Kits innuPREP Plasmid Mini und Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II. Diese Kombination der beiden Kits wurde in dieser Arbeit etabliert, da durch sie eine höhere Ausbeute an isolierter Plasmid-DNA erreicht werden konnte. Beide Kits funktionieren nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

Aus einer Kultur von transformierten *S. cerevisiae*-Zellen in SD<sub>-Ura</sub> wurden nach einer Inkubation von 8-12 h bei Standardbedingungen (**2.11.9**) Zellen aus 2 mL Kulturvolumen durch Zentrifugation (1 min, maximale UpM) sedimentiert. Das Pellet wurde in 250 μL Lösung I aus dem Zymoprep™ Kit resuspendiert, die Suspension wurde mit 2,5 μL Zymolyase (5 U/μL) vermischt und für 1,5 h bei 37 °C am Rotator inkubiert. Hiernach wurde die Suspension erneut durch Zentrifugation (1 min, maximale UpM) sedimentiert. Das Pellet

wurde mit dem innuPREP Plasmid Mini Kit, den Herstellerangaben folgend, weiter bearbeitet. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit Nuklease-freiem Wasser. So isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.12.6 Isolierung von genomischer DNA aus *P. putida*

Die Isolierung von genomischer DNA aus *P. putida* erfolgte mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit nach Herstellerangaben. Die Elution der genomischen DNA erfolgte mit Nuklease-freiem Wasser. So isolierte genomische DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.12.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur gezielten *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde in dieser Arbeit die PCR (Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) eingesetzt. Sämtliche PCRs dieser Studie wurden in einem Tprofessional Basis Gradient Thermocycler (Biometra) unter Nutzung der Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase durchgeführt. Eine Liste der zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendeten Oligonukleotide ist in (**Tab. 2.3**) angegeben.

Es wurden PCR-Ansätze auf Basis eines Standardprotokolls verwendet (**Tab. 2.14**), die bei Bedarf adaptiert wurden. Als Template für eine Standard-PCR fungierte entweder Plasmid-DNA oder genomische DNA (verdünnt auf 20-100 ng/ $\mu$ L). Für eine Kolonie-PCR fungierte eine Verdünnung einer ÜK (10  $\mu$ L ÜK + 290  $\mu$ L H<sub>2</sub>O), welche für 10 min auf 99 °C inkubiert wurde, als Template.

Tab. 2.14: Basisprotokoll für PCR-Ansätze

Komponente	20 μl Ansatz	50 μl Ansatz
HF-/GC-Puffer (5x)	4 μΙ	10 µl
dNTP Mix (10mM)	0,4 µl	1 μΙ
Primermix (10 pmol)	0,4 µl	1 μΙ
DMSO (optional, 0 bis 10 %)	0-2 µl	0-5 µl
Template	1 μΙ	1 μΙ
Phusion <sup>®</sup> Polymerase	0,2 μΙ	0,5 μΙ
H₂O	Auf 20 μl auffüllen	Auf 50 μl auffüllen

PCR-Programme wurden ausgehend von einem Basis-Programm (**Tab. 2.15**) entsprechend des jeweils verwendeten Templates, der Oligonukleotid-Primer sowie der Amplikon-Länge adaptiert. Die Hybridisierungstemperatur (Tm) wurde nach Angaben des Oligonukleotid- und des Polymerase-Herstellers gewählt. Zusätzlich zum üblichen 3-*Step* Protokoll (welches Phasen der Denaturierung, Hybridisierung und Elongation beinhaltet) wurde bei hohen

Primer-Schmelztemperaturen ein sogenanntes 2-Step Protokoll durchgeführt, bei dem ein separater Hybridisierungsschritt entfällt (**Tab. 2.15**).

Tab. 2.15: Basis-Progra	amm zur Adaptierun	ig individueller PO	CR-Programme

Schritt		Bezeichnung	Temperatur	2-Step	3-Step
	1.	Initiale Denaturierung	98 °C	1-5 min	1-5 min
2.	25-45 Zyklen	Denaturierung	98 °C	10-30 s	10-30 s
3.		Hybridisierung	Tm	X	10-20 s
4.		Elongation	72 °C	15-45 s pro kb	15-60 s pro kb
	5.	Finale Elongation	72 °C	10 min	10 min

### 2.12.8 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentration isolierter DNA und RNA wurde mit den jeweils passenden Messeinstellungen photometrisch über die Absorption (A) bei einer Wellenlänge von 260 nm im NanoDrop 2000c Spektralphotometer bestimmt. Das NanoDrop 2000c misst neben der Konzentration isolierter DNA und RNA auch eventuelle Verunreinigungen der Proben. Hierzu werden neben A 260 nm, auch A 280 nm und A 230nm gemessen. Der Quotient 260/280 nm zeigt Proteinverunreinigungen (Herstellerangaben: ca. 1,8 für reine DNA, ca. 2,0 für reine RNA), während der Quotient der 260/230 nm eine Verunreinigung mit Salzen oder Lösungsmitteln anzeigt (Herstellerangaben: 1,8-2,2 für reine DNA/RNA).

### 2.12.9 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Die in dieser Arbeit zur DNA-Hydrolyse verwendeten Typ II Restriktionsendonukleasen (2.6) wurden jeweils in den vom Hersteller beigelegten Puffern und unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Bei der Kombination von mehreren Restriktionsendonukleasen wurde das Online-Tool DoubleDigest Calculator (Thermo Scientific) zur Bestimmung des für diese Kombination optimalen Puffers genutzt. Erkennungssequenzen für Typ II Restriktionsendonukleasen wurden mit der Clone-Manager 9.2 Software in geeigneten Plasmidkarten ermittelt.

#### 2.12.10 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe durch Agarosegelelektrophorese, modifiziert nach Green und Sambrook (2012), wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 1 % (w/v) Agarose in 0,5x TBE-Puffer (**Tab. 2.5**) genutzt, denen zur Detektion von DNA-Fragmenten unter UV-Licht 10 μL Ethidiumbromid-

Lösung (10 mg/ml in Ethanol) hinzugefügt wurden. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 des Gesamtvolumens an 5x DNA-Probenpuffer (**Tab. 2.5**) versetzt und in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard diente die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher). Die Elektrophorese erfolgte in Wide Mini-Sub Cell GT horizontalen Elektrophorese-Kammern (Bio-Rad) in 0,5x TBE-Puffer (**Tab. 2.5**) bei einer Spannung von 135 V für 30-60 min. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde das Agarosegel mit einem Eagle Eye II-System (Stratagene) mit UV-Licht (Wellenlänge 254-366 nm) belichtet und die Emission des in der DNA-Doppelhelix interkalierenden Ethidiumbromids bei einer Wellenlänge von 590 nm detektiert und Foto-dokumentiert.

### 2.12.11 Reinigung von DNA-Fragmenten

Zur Weiterverwendung von DNA-Fragmenten wurden diese aus Gemischen, die beispielsweise Enzyme, Puffer-Salze oder andere DNA-Fragmente enthielten, isoliert.

### 2.12.11.1 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten (2.12.7) erfolgte mit dem innuPREP DOUBLEpure Kit nach Herstellerangaben. Die Elution der gereinigten PCR-Produkte erfolgte mit Nuklease-freiem Wasser. So gereinigtes PCR-Produkt wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.12.11.2 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Reinigung von DNA nach erfolgter Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese (2.12.10) erfolgte mit dem innuPREP DOUBLEpure Kit nach Herstellerangaben. Das Kit funktionieren nach dem modifiziert Prinzip von Vogelstein und Gillespie (1979). Die Elution der gereinigten DNA-Fragmente erfolgte mit Nuklease-freiem Wasser. So gereinigte DNA-Fragmente wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.12.12 *In vitro* Rekombination von DNA-Fragmenten durch Ligation

Die *in vitro* Rekombination von DNA-Fragmenten durch Ligation erfolgte mit der T4 DNA Ligase (Weiss et al., 1968) nach Herstellerangaben oder unter alternativen Inkubationsbedingungen von 16 °C über Nacht. Bei Bedarf wurden bestimmte DNA-Fragmente vor der *in vitro* Rekombination mit der FastAP Alkaline Phosphatase nach Herstellerangaben dephosphoryliert, um eine Religation des Vektorfragments mit sich selbst zu verhindern.

#### 2.12.13 DNA-Sequenzierungen

Die für diese Arbeit benötigten DNA-Sequenzierungen wurden auf Auftragsbasis von den Firmen Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) oder Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Deutschland) durchgeführt. Zur Untersuchung der erhaltenen Chromatogramme wurde die Software Bioedit genutzt. Zum Abgleich der Sequenzen wurden BLAST (Altschul et al., 1990), Clustal Omega (Sievers et al., 2011) oder die im Clone-Manager 9.2 implementierte Alignment Software genutzt.

### 2.12.14 Transkriptnachweis durch RT-qPCR

Für Arbeiten zum Transkriptnachweis durch RT-(reverse Transkription) qPCR (quantitative *real-time* PCR) wurden nur RNase-freie Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien verwendet. Methoden mit Bezug zur qPCR wurden modifiziert nach Loeschcke (2012) durchgeführt.

### 2.12.14.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus P. putida und DNA-Degradation

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus *P. putida* wurde eine aus einer ÜK (**2.11.6**) inokulierte 1 mL Kultur in TB in einer Flowerplate® bei 1400 UpM und 20 °C für 8 h im ThermoMixer®C angezogen. Aus dieser sich im logarithmischen Wachstum befindlichen Kultur wurde eine Zellmenge entsprechend einer OD<sub>650nm</sub> von 1,5 durch Zentrifugation (1 min, maximale UpM) geerntet. Aus dieser Zellmenge erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA mit dem NucleoSpin® RNA Kit (Macherey-Nagel) weitestgehend entsprechend der Herstellerangaben. Um DNA-Kontaminationen entgegenzuwirken, wurde zusätzlich eine weitere DNase Behandlung auf der NucleoSpin® RNA Säule mit dem RNase-Free DNase Set durchgeführt. Hierfür wurde nach der bereits im NucleoSpin® RNA Kit vorgesehenen DNase Behandlung die NucleoSpin® RNA Säule zentrifugiert (15 s, 11000 g) und mit 80 μL DNasel-Mix (10 μL DNasel Stock + 70 μL RDD-Puffer) aus dem RNase-Free DNase Set (Quiagen) für 15 min inkubiert. Anschließend wurde weiter entsprechend der Herstellerangaben des NucleoSpin® RNA Kits vorgegangen. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte mit 47 μL Nuklease-freiem Wasser.

Schließlich wurde eine dritte DNase Behandlung im Eluat durchgeführt. Hierfür wurde das DNA-free™ DNA Removal Kit (Life Technologies) nach Herstellerangaben verwendet. Nach der Behandlung wurden 50 µL der dreifach DNase behandelten RNA in ein frisches RG überführt und bei -80 °C gelagert.

#### 2.12.14.2 Reverse Transkription

Um einen Vergleich verschiedener Proben zu ermöglichen, wurden bei der reversen Transkription (RT) gleiche Mengen RNA in cDNA transkribiert. Hierfür wurde die Konzentration der isolierten RNA nach der dritten DNase Behandlung (**2.12.14.1**) wie in **2.12.8** beschrieben bestimmt. Die RT wurde mit 1000 ng RNA als Template mithilfe des Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (ThermoFisher) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Durchführung wurden 72 µL Nuklease-freies Wasser zur Probe (20 µL) gegeben und diese bei -80 °C gelagert.

### 2.12.14.3 Quantitative real-time PCR

Die Primer für die quantitative *real-time* PCR (qPCR) wurden mit dem Online-Tool Primer3Web (Untergasser et al., 2012) erstellt. Für einen 20 μL qPCR Ansatz wurden 9,2 μL cDNA-Template (**2.12.14.2**) eingesetzt (was cDNA aus 100 ng RNA Template bei der RT entspricht), hierzu wurden 10 μL Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) sowie 0,8 μL Primer-Mix (je 10 pmol pro Oligonukleotid) gegeben. Als Kontrolle wurde für jede Probe zusätzlich ein Ansatz mit den Primern für das Haushaltsgen *rpoD* gemessen. Die qPCR wurde im 7900HT Fast Real-Time PCR System mit 30 Zyklen durchgeführt.

### 2.12.14.4 Absolute Transkript-Quantifizierung der qPCR

Zur Erstellung der Eichgerade wurde eine qPCR mit den Pimern für die Gene *pigA* und *pigN* auf definierten Konzentrationen (1x10<sup>-3</sup> bis 1000 ng) des Plasmids pPIG durchgeführt. Anhand der Konzentration wurden mit dem DNA *Molecular Weight calculator* (Stothard, 2000) die Anzahl der Transkriptkopien bestimmt. Zunächst wurde der lineare Messbereich für *pigA* zwischen Zyklus 13 und 26 sowie für *pigN* zwischen 11 und 23 ermittelt. Die im linearen Messbereich liegenden CT-Werte wurden in Bezug zur Anzahl der Transkriptkopien gesetzt. Anhand der hieraus entstandenen Eichgerade (**Abb. 2.1**) kann der in der qPCR ermittelte CT-Wert, welcher zur Abweichung des CT-Werts der *rpoD* Kontrolle vom MW relativiert wurde, in die Anzahl an Transkriptkopien umgerechnet werden.

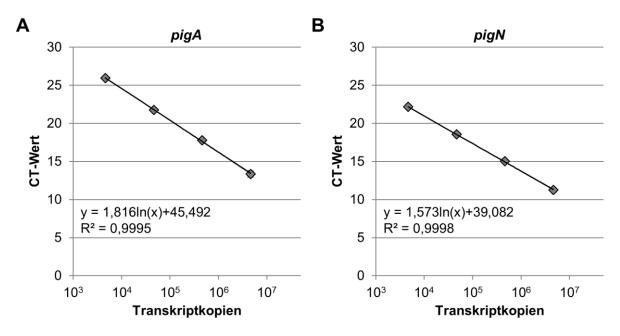


Abb. 2.1: Verhältnis von Transkriptkopien zu CT-Werten

Auftragung der Transkriptkopien (x-Achse (ln)) gegen den jeweiligen CT-Wert (y-Achse) für pigA (**A**) und pigN (**B**). Dargestellt sind jeweils der lineare Bezug y = m ln(x)+a, aus dem die Transkriptkopien über den CT-Wert ermittelt werden können, sowie das Bestimmtheitsmaß  $R^2$ .

### 2.13 Analytik von Prodigiosin

### 2.13.1 Aufnahme von Absorptionsspektren von Prodigiosin aus Bakterien

Zur Aufnahme eines Absorptionsspektrums von Prodigiosin wurde eine Zellmenge entsprechend einer OD<sub>650nm</sub> von 1 durch Zentrifugation (2 min, maximale UpM) geerntet. Das Pellet wurde in 1 mL angesäuertem Ethanol (4 % 1 M HCl) resuspendiert und aufgeschlossen, Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (2 min, maximale UpM) sedimentiert. Anschließend wurde ein Absorptionsspektrum des Überstandes am GENESYS™ Spektrophotometer von 300-700 nm aufgenommen.

### 2.13.2 Quantifizierung von Prodigiosin in Bakterien

Für die Quantifizierung von Prodigiosin in *P. putida* oder *S. marcescens* Kulturen wurden entweder eine  $OD_{650nm}$  von 1 (bei Kultivierung in Erlenmeyerkolben) oder  $100 \,\mu\text{L}$  (bei Kultivierung in Mikrotiterplatten (MTPs oder Flowerplates®)) durch Zentrifugation geerntet (2 min, maximale UpM). Das Pellet wurde in 1 mL angesäuertem Ethanol (4 % 1 M HCl) resuspendiert und aufgeschlossen, Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (2 min, maximale UpM) sedimentiert. Die Absorption des Überstandes wurde photometrisch im GENESYS™ Spektrophotometer bei 535 nm ( $A_{535}$ ) bestimmt. Mithilfe des molaren Extinktionskoeffizienten in angesäuertem Ethanol (4 % 1 M HCl)  $\epsilon_{535}$  = 139.800 ± 5.100

M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Domröse et al., 2015) sowie der Molaren Masse von Prodigiosin MW = 323,43 g mol<sup>-1</sup> wurde anhand der folgenden Formel der Prodigiosin-Gehalt pro Extrakt bestimmt.

$$Prodigiosin \ Gehalt[mg/Extrakt] = \frac{A_{535}}{\varepsilon [M^{-1}cm^{-1}]} \times MW \ [g \ mol^{-1}]$$

Mithilfe dieses Werts wurde unter Berücksichtigung des extrahierten Kulturvolumens der Prodigiosin-Titer in der Kulturbrühe [mg/L] bestimmt. Außerdem wurden Prodigiosin-Ausbeuten pro Zelltrockenmasse (DCW) ermittelt. Um diese Angabe direkt über Zelldichtemessungen machen zu können, wurde eine Eichung vorgenommen, bei der die OD<sub>650nm</sub> in Korrelation zur Zelltrockenmasse (Gewicht getrockneter Zellpellets) bestimmt wurde (**Abb. 2.2**). Hieraus wurde bestimmt, dass eine 1 mL Zellkultur mit einer OD<sub>650nm</sub> von 1 für *P. putida* 0,72 mg und für *S. marcescens* 0,74 mg Zelltrockenmasse entspricht. Mithilfe dieser Eichung konnte die Prodigiosin-Ausbeute in [mg/gDCW] anhand von Zelldichtemessungen und ermittelten Prodigiosin-Konzentrationen in Ethanol-Extrakten dargestellt werden. Die Quantifizierung erfolgte modifiziert nach Domröse et al. (2015).

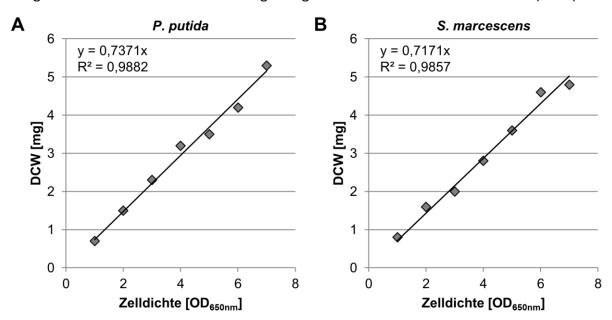


Abb. 2.2: Verhältnis von Zelldichte [OD<sub>650nm</sub>] zu DCW [mg]

Auftragung der Zelldichte in  $OD_{650nm}$  (x-Achse) gegen das jeweilige Zelltrockengewicht (DCW) in mg (y-Achse), für *P. putida* (**A**) und *S. marcescens* (**B**). Dargestellt ist jeweils der lineare Bezug y = m x, wobei die Steigung m das Verhältnis von  $OD_{650nm}$  zu DCW [mg] angibt, sowie das Bestimmtheitsmaß R<sup>2</sup>.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 TREX-vermittelte Prodigiosin-Produktion in P. putida

Das TREX-System wurde bereits erfolgreich für die Expression verschiedener Gencluster in unterschiedlichen Wirtsorganismen eingesetzt (Loeschcke, 2012; Loeschcke et al., 2013). Hierbei lag der Focus auf der Nutzung des TREX-Systems als *screening tool*, um möglichst schnell eine größere Anzahl an Genclustern sowie Wirtsorganismen testen zu können und somit den Zugang zu vielversprechenden Sekundärmetaboliten grundsätzlich zu ermöglichen. Die prinzipielle Anwendung des TREX-Systems ist in **1.5.2** im Detail beschrieben.

Mithilfe des TREX-Systems konnte in Loeschcke et al. (2013) gezeigt werden, dass der nicht pathogene Stamm *P. putida* KT2440 einen vielversprechenden Wirt für die Produktion des pharmazeutisch wertvollen Sekundärmetaboliten Prodigiosin (vgl. **1.2**) darstellt. Dieser Organismus bietet auch allgemein sehr gute Voraussetzungen für die Produktion von Naturstoffen (vgl. **1.4**). Die bisher erreichten Ausbeuten dieses Sekundärmetaboliten waren jedoch nur sehr gering (unter 1 mg/L; Loeschcke et al., 2013). Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass unterschiedliche Insertionsorte des Genclusters im Wirtsgenom, erzeugt durch die zufällige Tn5-Transposition des TREX-Transposons, in unterschiedlichen Produktionsausbeuten resultieren können (Loeschcke, 2012; Loeschcke et al., 2013).

In dieser Arbeit sollte daher zunächst untersucht werden, ob sich aufgrund dieser Beobachtung mit dem TREX-System neue *P. putida* Produktionsstämme erzeugen lassen, die im Vergleich zu anderen heterologen Prodigiosin-Produktionsansätzen kompetitive Mengen produzieren können. Dies ist entweder durch eine T7RP-gestützte Expression der *pig*-Gene möglich oder durch die Insertion des *pig*-Genclusters hinter einen starken nativen Promotor im Genom von *P. putida* realisierbar. Letzteres ist möglich, da alle Gene des *pig*-Genclusters unidirektional in einem gemeinsamen Operon angeordnet sind (vgl. **Abb. 1.2** A; Harris et al., 2004).

### 3.1.1 TREX-vermittelte Erzeugung Prodigiosin-produzierender P. putida Stämme

Um eine Bibliothek aus verschiedenen *P. putida* Stämmen mit randomisiert integriertem TREX-*pig*-Transposon zu generieren, wurden die bereits in Loeschcke et al. (2013) erzeugten TREX-*pig*-Plasmide pTREX-LpigR und pTREX-RpigL (**Abb. 3.1**) verwendet. Diese Plasmide

enthalten jeweils das TREX-markierte, für den Prodigiosin-Biosyntheseweg kodierende, 21 kb große und aus 14 Genen bestehende *pig*-Gencluster. Sie unterscheiden sich nur durch die Anordnung der TREX-Kassetten: Während in pTREX-LpigR die L-TREX-Kassette (orange) dem *pig*-Gencluster in Leserichtung zugewandt ist, ist es in pTREX-RpigL die R-TREX-Kassette (grün).

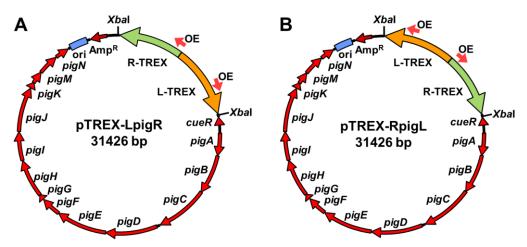


Abb. 3.1: Vektoren pTREX-LpigR und pTREX-RpigL

Die Vektoren pTREX-LpigR (A) und pTREX-RpigL (B) (Loeschcke et al., 2013) enthalten jeweils beide TREX-Kassetten (L-TREX oranger Pfeil, R-TREX grüner Pfeil) sowie das die 14 Gene *pigA-N* (rote Pfeile) enthaltende Prodigiosin-Gencluster aus *S. marcescens* W838. Die OE (pinke Pfeile) markieren den TREX-*pig*-Transposon-Bereich. Amp<sup>R</sup> = Ampicillin-Resistenzgen, ori = *origin of replication*, *Xbal* = Erkennungssequenz der *Xbal* Restriktionsendonuklease.

Die beiden TREX-*pig*-Plasmide wurden, wie in **2.12.3** beschrieben, über Konjugation in *P. putida* KT2440 übertragen. Durch den Aufbau des TREX-Systems konnte anschließend mit Gentamicin direkt auf erfolgreiche Transposition des TREX-*pig*-Transposons selektiert werden (vgl. **1.5.2**). Bereits beim *screening* der Selektionsnährmedien konnten Kolonien identifiziert werden, welche in Abwesenheit einer T7RP (T7 RNA Polymerase) einen roten Phänotyp aufwiesen. Insgesamt wiesen allerdings lediglich zwei von etwa 2000 Kolonien nach der Konjugation mit dem Plasmid pTREX-LpigR (**Abb. 3.1** A) diesen konstitutiv roten Phänotyp auf, wohingegen bei pTREX-RpigL (**Abb. 3.1** B) von ebenfalls etwa 2000 Kolonien keine diesen Phänotyp zeigte. Die Rotfärbung der rekombinanten *P. putida* Stämme *Pp* pigr1 und *Pp* pig-r2 ist im Vergleich zum Wildtyp (*Pp* KT2440) klar erkennbar (**Abb. 3.3** A). Diese Pigmentierung weist auf die Produktion des roten Sekundärmetaboliten Prodigiosin hin und bestätigt somit die Vermutung, dass durch einen passenden Insertionsort auf dem Genom die Expression der *pig*-Gene unter die Kontrolle eines starken nativen *P. putida* Promotors gestellt werden kann.

Um nachzuweisen, dass es sich bei der produzierten roten Substanz um Prodigiosin handelt, wurden zunächst, wie in 2.13.1 beschrieben, dessen spektroskopische Eigenschaften untersucht. In Abb. 3.2 sind die Absorptionsspektren von Extrakten (aus Zellmengen entsprechend OD<sub>650nm</sub> von 1, vgl. **2.13.1**) der Stämme *P. putida* pig-r1 (A) und pig-r2 (B) dargestellt. Die Spektren zeigen den Verlauf der Absorption des Pigments von 400 bis 600 nm auf, ein distinktes Absorptionsmaximum ( $\lambda_{max}$ ) liegt bei 535 nm. Neben einem Absporptionsspektrum von auf gleiche Weise aus S. marcescens extrahiertem Prodigiosin (C) wurde von Andreas Sebastian Klein (Institut für Bioorganische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) synthetisch hergestelltes Prodigiosin (D) als Referenzsubstanz genutzt. Die Absorptionsspektren der Kontrollen (Abb. 3.2 C und D) weisen im Vergleich zu denen der Extrakte von P. putida pig-r1 und pig-r2 (Abb. 3.2 A und B) einen fast identischen Verlauf sowie das gleiche Absorptionsmaximum bei 535 nm auf. Dies deutet stark darauf hin, dass es sich bei der produzierten Substanz tatsächlich um Prodigiosin handelt. Dieser Schnelltest wurde fortan bei jeder Produktion durchgeführt. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde von Andreas Sebastian Klein daraufhin eine genaue Analyse des extrahierten roten Pigments durchgeführt. Er unterzog die Proben dafür einer Analyse durch HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) und HRMS (Hochauflösende Massenspektrometrie). Für nähere Informationen zu den durchgeführten Analysemethoden sowie zu der von Andreas Sebastian Klein durchgeführten Synthese von Prodigiosin siehe Domröse et al. (2015) sowie das dazugehörige supplementary material. In allen angewandten Analyseverfahren konnte die rote Substanz eindeutig als Prodigiosin identifiziert werden.

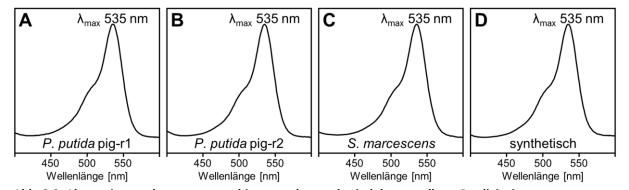


Abb. 3.2: Absorptionsspektren von extrahiertem oder synthetisch hergestelltem Prodigiosin Absorptionsspektren von aus P. putida pig-r1 (A) und pig-r2 (B) extrahiertem Prodigiosin, sowie von aus S. marcescens (C) extrahiertem und von Andreas Sebastian Klein synthetisch hergestelltem (D) Prodigiosin als Referenzsubstanzen. Alle Absorptionsspektren wurden in angesäuertem Ethanol (4 %, 1 M HCl) entsprechend der Angaben in P. 13.1 aufgenommen, dargestellt ist der Wellenlängenbereich von 400 bis 600 nm sowie die Wellenlänge des jeweiligen Absorptionsmaximums (A. 1 max).

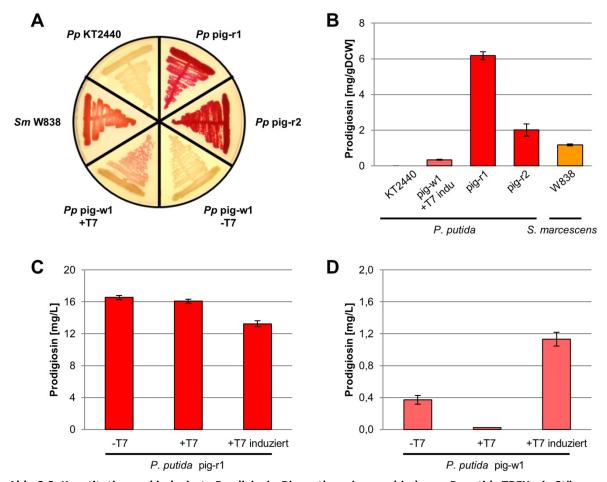


Abb. 3.3: Konstitutive und induzierte Prodigiosin-Biosynthese in verschiedenen *P. putida* TREX-*pig*-Stämmen A: Farb-Phänotypen des nativen Prodigiosin-Produzenten *S. marcescens* W838 (*Sm* W838), verschiedener mit dem TREX-System erzeugter, das *pig*-Gencluster tragender *P. putida* (*Pp*) Stämme, Pp pig-r1 und -r2 als T7RP-unabhängige Produzenten, pig-w1 mit und ohne T7RP als T7RP-abhängiger Produzent, sowie *Pp* KT2440 als Wildtyp-Kontrolle. B: Prodigiosin-Ausbeute in mg pro Gramm Zelltrockengewicht [mg/gDCW] nach 24h Anzucht unter Standardbedingungen in Flüssigmedium für *P. putida* pig-r1 und -r2, bei denen die Prodigiosin-Biosynthese konstitutiv erfolgte, sowie -w1, bei dem die Prodigiosin-Biosynthese durch Zugabe von T7RP und 0,5 mM IPTG als Induktor induziert wurde. Dazu zum Vergleich *S. marcescens* W838, angezogen auf Festmedium, sowie KT2440 als Wildtyp-Kontrolle. C und D: Prodigiosin-Titer [mg/L] nach 24h Anzucht unter Standardbedingungen in Flüssigmedium für *P. putida* pig-r1 (C) und -w1 (D) jeweils ohne (-T7) bzw. mit (+T7) dem T7RP-kodierenden Plasmid pML5-T7 sowie mit durch 0,5 mM IPTG induzierter T7RP-Expression (+T7 induziert). Die Säulen in B, C und D entsprechen jeweils dem Mittelwert einer biologischen Dreifachbestimmung, hierbei ist die Standardabweichung jeweils als Fehlerbalken angegeben.

Um einen direkten Vergleich der Prodigiosin-Ausbeuten der Prodigiosin-Produktionsstämme pig-r1 und -r2 mit T7RP-abhängigen Produktionsstämmen zu ermöglichen, wurden auch derartige Stämme unter Verwendung eines T7RP-kodierenden Plasmids erzeugt. Hierzu wurde das T7RP-kodierende Plasmid pML5-T7 (Arvani et al., 2012) in *P. putida* Stämme, die nach der TREX-*pig*-Transposition den farblosen-Phänotyp des WT beibehielten, übertragen. So konnte ein Stamm (*Pp* pig-w1) erzeugt werden, welcher auf Nährmedienplatten mit durch Zugabe von 0,5 mM des Induktors IPTG induzierter T7RP-Expression dazu in der Lage war,

Prodigiosin zu produzieren. Der rote Phänotyp dieses Stammes war hierbei jedoch viel schwächer ausgeprägt als bei pig-r1 und -r2 (**Abb. 3.3** A, *Pp* pig-w1+T7).

Die Prodigiosin-Produktion der erzeugten Stämme wurde nun untereinander und mit dem nativen Produzenten S. marcescens W838 verglichen. Hierfür wurden die verschiedenen Stämme unter Standardbedingungen in LB-Flüssigmedium bei 30 °C und 120 UpM in 100 mL Erlenmeyerkolben über 24 h kultiviert, zur Induktion der T7RP-Bildung wurden bei Pp pig-w1 6 h nach der Inokulation 0,5 mM IPTG hinzugefügt. Die Prodigiosin-Produktion wurde jeweils, wie in 2.13.2 beschrieben, photometrisch unter Nutzung des in Kooperation mit Andreas Sebastian Klein bestimmten Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{535}$  [M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>] = 139.800 ± 5.100 in angesäuertem Ethanol (4 %, 1 M HCl) als Lösungsmittel) ermittelt und ist in Abb. 3.3 B dargestellt. Die konstitutiven Stämme erreichten Prodigiosin-Ausbeuten von 6,2 ± 0,2 (pigr1) bzw. 2,0 ± 0,1 (pig-r2) mg pro Gramm Zelltrockengewicht [mg/gDCW], wohingegen der T7RP-abhängige Stamm pig-w1 mit  $0.35 \pm 0.02$  mg/gDCW nur eine um etwa den Faktor 17 niedrigere Ausbeute als dieser erzielte. Für S. marcescens W838 ist kein direkter Vergleich der Produktion möglich, da es unter verschiedenen getesteten Bedingungen für Temperatur, Medium, Inkubationszeitraum und Sauerstoffeintrag nicht möglich war, in flüssigem Medium eine Prodigiosin-Produktion nachzuweisen. Auf festem Nährmedium ist jedoch eindeutig ein roter Phänotyp, wenn auch schwächer ausgeprägt als bei pig-r1 oder pig-r2, erkennbar (Abb. **3.3** A, Sm W838). Um zumindest einen näherungsweisen Vergleich zu ermöglichen, wurden S. marcescens W838 Zellen von festem Nährmedium geerntet und auf ihren Prodigiosin-Gehalt hin untersucht. Hierbei wurde eine Ausbeute von 1,2 ± 0,3 mg/gDCW ermittelt, was etwa einem Fünftel der Prodigiosin-Ausbeute von pig-r1 entspricht. Der deutliche Unterschied in der Prodigosin-Ausbeute zwischen dem T7RP-abhängigen Stamm pig-w1 und dem T7RP-unabhängigen Stamm pig-r1 ist ein erster Hinweis auf das große Potential solcher T7RP-unabhängiger Produktionsstämme.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob eine zusätzliche T7RP-abhängige Expression die Prodigiosin-Produktion in den Stämmen mit konstitutiver pig-Genexpression noch weiter steigern kann. Dazu wurde das T7RP-kodierende Plasmid pML5-T7 (Arvani et al., 2012) in den Stamm pig-r1 übertragen. Der Prodigiosin-Produktionstiter wurde unter Standardbedingungen, wie bereits beschrieben, bestimmt und ist in **Abb. 3.3** C in mg/L dargestellt. Bei pig-r1 ohne T7-Plasmid lag die Produktion bei 16,6  $\pm$  0,3 mg/L, diese änderte sich durch die Präsenz des T7-Plasmids nicht (16,1  $\pm$  0,2 mg/L), während eine Induktion der

T7RP-Expression zu einer Verringerung der Produktion um etwa 20 % auf  $13,2\pm0,4\,$  mg/L führte. Diese Verringerung der Prodigiosin-Akkumulation könnte auf die bereits von A. Markert (2008) beschriebene Problematik der geringeren Anzahl von Transkriptkopien bei konvergenter Transkription unidirektionaler Gencluster durch die T7RP zurückzuführen sein. Zum direkten Vergleich sind in **Abb. 3.3** D die Produktionstiter des T7RP-abhängigen Stammes pig-w1 dargestellt, welcher unter gleichen Bedingungen angezogen wurde. Hier lag die Produktion ohne T7-Plasmid bei  $0,4\pm0,1\,$  mg/L, sank in Anwesenheit des T7-Plasmids auf  $0,02\pm0,00\,$  und wurde durch Induktion etwa um den Faktor 3 auf  $1,1\pm0,1\,$  gesteigert. Insgesamt ist der Produktionstiter von pig-w1 bei induzierter T7RP-abhängiger Expression der *pig*-Gene um den Faktor 15 niedriger als der von pig-r1 in Abwesenheit einer T7RP. Hier wurde gezeigt, dass mit dem TREX-System neben T7RP-abhängigen Stämmen auch in der Produktion weitaus effizientere T7RP-unabhängige Stämme erzeugt werden können. Diese potentiell dauerhaft stabilen Produktionsstämme wurden im Folgenden in Hinblick auf die Steigerung ihrer Prodigiosin-Produktion untersucht.

### 3.1.2 Optimierung der Prodigiosin-Produktion von P. putida pig-r1

Die beiden erzeugten T7RP-unabhängigen Produktionsstämme erreichten bereits unter Standardbedingungen deutlich höhere Prodigiosin-Ausbeuten als die T7RP-abhängigen Stämme, die in dieser Studie sowie in Loeschcke et al. (2013) erzeugt wurden. Hierbei produziert pig-r1 etwa um den Faktor 3 mehr Prodigiosin als pig-r2. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob verschiedene Kultivierungs-Paramenter, wie Temperatur, Medienzusammensetzung, Sauerstoffanreicherung sowie Kultivierungsdauer, einen positiven Einfluss auf die Produktionsleistung des Stammes *P. purida* pig-r1 haben.

Es wurden insgesamt drei Temperaturen (30 °C, 25 °C, 20 °C), zwei Medien (LB und das nährstoffreichere TB) sowie vier verschiedene Arten des Sauerstoffeintrags über eine Kultivierungszeit von 72 h getestet, wobei jeweils nach 6, 24, 48 und 72 h Proben entnommen wurden. Da die Gesamtkultivierungszeit 72 h betrug, wurde das Volumen der Erlenmeyerkolben auf 500 mL erhöht, um ein größeres Kulturvolumen zu ermöglichen. Dadurch sollte die Kultur trotz mehrfacher Probenentnahme und der bei der Kultivierung auftretenden Verdunstung über einen längeren Zeitraum stabil bleiben. Die verschiedenen Mengen an Gelöstsauerstoff im Medium wurden durch unterschiedliche Füllhöhen des Mediums im Kolben (Medienfüllung zu 10 % oder 20 % des Kolbenvolumens) sowie den

Einsatz von Kolben mit und ohne Schikanen erzeugt. Hierbei wird davon ausgegangen, dass eine höhere Füllhöhe bei gleicher Schüttelfrequenz einen niedrigeren Sauerstoffeintrag ins Medium bedingt und der Einsatz von Schikanen einen höheren. Zu jedem Messzeitpunkt wurde neben dem Prodigiosin-Produktionstiter in mg/L (2.13.2) auch die Zelldichte photometisch bei 650 nm bestimmt, um das Wachstum der Zellen über die Dauer der Kultivierung zu verfolgen. Die Ergebnisse aller Experimente sind in Abb. 3.4 dargestellt.

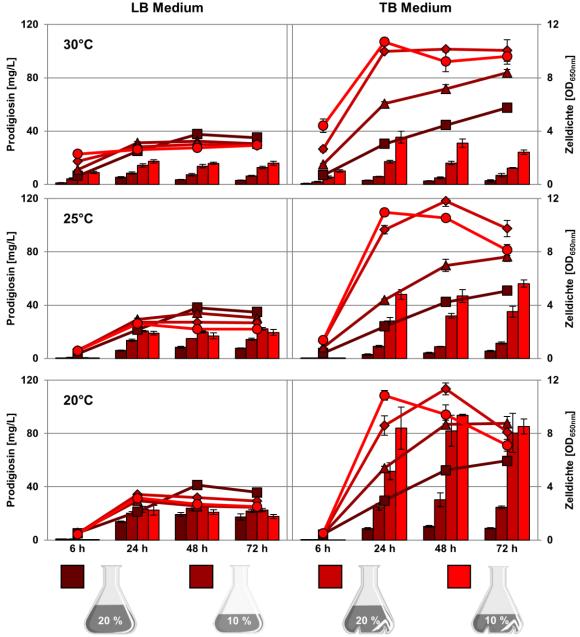


Abb. 3.4: Wachstum und Prodigiosin-Produktion von *P. putida* pig-r1 unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

Die Säulen stellen die Prodigiosin-Produktion (linke Vertikalachse) in [mg/L] und die Messpunkte die Zelldichte gemessen an der OD<sub>650nm</sub> (rechte Vertikalachse) dar. Die Kulturen wurden in LB-Medium (links) und TB-Medium (rechts) jeweils bei drei verschiedenen Temperaturen (30 °C oben, 25 °C Mitte und 20 °C unten) angezogen.

Hierbei wurden jeweils vier unterschiedliche Arten der Sauerstoffanreicherung, skizzierte Kolben unter den Graphen, untersucht (Rotfärbungen). Gemessen wurde jeweils an vier Zeitpunkten 6 h, 24 h, 48 h und 72 h. Die Säulen und Messpunkte entsprechen jeweils dem Mittelwert einer biologischen Dreifachbestimmung, hierbei ist die Standardabweichung jeweils als Fehlerbalken angegeben.

Wie erwartet erreichten die Kulturen im nährstoffreicheren TB-Medium grundsätzlich deutlich höhere Zelldichten als im LB-Medium (Abb. 3.4, Messpunkte rechte Vertikalachse). Bei hoher Sauerstoffanreicherung wurde die stationäre Wuchsphase generell früher erreicht als bei niedriger. So wurde die stationäre Wuchsphase in Kolben mit Schikanen unter den meisten Bedingungen nach 24 h erreicht, wohingegen sie in Kolben ohne Schikanen frühestens nach 48 h erreicht wurde. In TB-Medium wirkte sich der erhöhte Sauerstoffeintrag durch Schikanekolben bei allen Temperaturen sehr positiv auf das Wachstum und die maximal erreichte Zelldichte von pig-r1 aus. In LB-Medium resultierte interessanterweise das Wachstum in Kolben ohne Schikanen mit 20 % Medienfüllung bei allen getesteten Temperaturen in den insgesamt höchsten Zelldichten, wohingegen diese Art des Sauerstoffeintrages in TB-Medium das schlechteste Wachstum erbrachte. Ein guter Sauerstoffeintrag scheint sich also bei TB-Medium positiv auf das Zellwachstum auszuwirken, während bei LB-Medium ein niedrigerer Sauerstoffeintrag zu einer insgesamt höheren Zelldichte führt, das Wachstum jedoch leicht verlangsamt.

Wird in diese Betrachtung die Prodigiosin-Produktion (**Abb. 3.4**, Säulen linke Vertikalachse) einbezogen, ist direkt erkennbar, dass Kolben mit Schikanen in beiden Medien und bei allen Temperaturen insgesamt zu höheren Prodigiosin-Titern führen. Einzig bei 20 °C in LB-Medium erreichte die Produktion nach 72 h in Kolben ohne Schikanen mit 10 % Medienfüllung mit 22 ± 1 mg/L einen leicht höheren Titer als bei Kolben gleicher Füllhöhe mit Schikanen, in denen nur ein Titer von 18 ± 2 mg/L erzielt wurde. Die Prodigiosin-Titer scheinen also insgesamt bei einem Sauerstoffeintrag durch Schikanen höher zu sein. Um dies beurteilen zu können, muss jedoch zuvor ein direkter Bezug zwischen Zelldichte und Prodigiosin-Produktion betrachtet werden, denn die höhere Produktionsleistung bei TB-Medium in Kolben mit Schikanen könnte auch auf eine höhere Biomasse zurückzuführen sein. Zu diesem Zweck wurde die Produktion in direkten Bezug zur Biomasse gesetzt (**2.13.2**) und im Anhang in **Tab. 8.1** in mg/gDCW angegeben. Daraus geht hervor, dass in LB-Medium tendenziell höhere Werte für die Produktion pro Biomasse erreicht wurden, jedoch zeigt die Kultur mit dem höchsten Titer von 94 ± 1 mg/L (bei 20 °C, in einem zu 10 % mit TB-Medium gefüllten Schikanekolben nach 48 h) mit 14 ± 1 mg/gDCW auch die zweithöchste Ausbeute

pro Biomasse. Anzumerken ist hierbei jedoch, dass bei dieser Kultur rechnerisch nach 72 h eine höhere Ausbeute pro gDCW erreicht wurde. Dieses Phänomen ist bei TB-Medium für 20 und 25 °C in Schikanekolben durchgehend zu beobachten. Da dies in diesen Kulturen jedoch aus der abfallenden Zelldichte bei etwa gleichbleibendem Prodigiosin-Gehalt (vgl. Abb. 3.4) resultiert, sollte dies nicht in die Gesamtbetrachtung einfließen. Das Erreichen einer hohen Biomasse bewirkt also nicht zwangsläufig eine hohe Prodigiosin-Produktion, vielmehr ist die Produktion pro Biomasse in Kulturen mit geringer maximaler Zelldichte tendenziell höher.

Bei der Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Temperaturen auf die Prodigiosin-Produktion ist klar erkennbar, dass niedrige Temperaturen bei allen Bedingungen zu einer Steigerung der Produktion führen. Die Steigerung zeigt sich jedoch erst ab einer Inkubationszeit von 24 h, nach 6 h werden bei 30 °C Inkubationstemperatur im Vergleich höhere Prodigiosin-Ausbeuten erreicht. Dies ist wahrscheinlich auf das langsamere Wachstum bei niedrigeren Temperaturen zurückzuführen, die erreichten Zelldichten nach 6 h lagen bei 20 und 25 °C deutlich unter denen bei 30 °C. In LB-Medium erreichten die Kulturen bei 30 °C Titer bis  $17 \pm 1 \text{ mg/L}$ , bei 25 °C bereits bis  $22 \pm 1 \text{ mg/L}$  und bei 20 °C maximal 26 ± 1 mg/L in zu 20 % gefüllten Kolben mit Schikanen. In TB-Medium ist die Steigerung sogar noch deutlicher erkennbar, bei 30 °C lag die höchste Produktion bei  $35 \pm 5$  mg/L, bei 25 °C dann bei  $56 \pm 3$  mg/L und bei 20 °C sogar bei  $94 \pm 1$  mg/L in zu 10 % gefüllten Kolben mit Schikanen, was auch den insgesamt höchsten Produktionswert in dieser Versuchsreihe darstellt. Hierzu sollte noch erwähnt werden, dass 94 ± 1 mg/L erst nach 48 h erreicht wurden. Es ist aber unter Einbeziehung der Standardabweichung davon auszugehen, dass ein vergleichbar hoher oder sogar höherer Produktionstiter wahrscheinlich schon nach 24 h unter gleichen Bedingungen erreicht wurde, dieser beträgt in der hier gezeigten Versuchsreihe 84 ± 16 mg/L. In TB-Medium konnte somit ausgehend von den Standardbedingungen, welche in dieser Versuchsreihe zu einer Produktion von 8,5 ± 0,8 mg/L führten, eine Steigerung der Prodigiosin-Produktion um etwa den Faktor 11 auf 94 ± 1 mg/L erreicht werden.

Bei der Betrachtung aller Produktionstiter in **Abb. 3.4** ist klar erkennbar, dass sowohl bei LB-Medium (links) als auch bei TB-Medium (rechts) zu späteren Zeitpunkten als nach 24 h keine große Steigerung in der Produktionsausbeute mehr messbar ist. Die meisten Produktionstiter bleiben unter Einbezug der Standardabweichung etwa gleich oder sinken

sogar, von einer Kultivierung über einen längeren Zeitraum als 24 h kann also abgesehen werden.

Zusammenfassend erwies sich in diesen Experimenten eine Inkubation bei 20 °C in zu 10 % mit TB-Medium gefüllten Kolben mit Schikanen als die beste Kultivierungsvariante für die Prodigiosin-Produktion in P. putida pig-r1. Unter diesen Bedingungen konnte die Produktion im Vergleich zu den Standardbedingungen um etwa den Faktor 11 auf 94  $\pm$  1 mg/L gesteigert werden.

#### 3.1.3 Einfluss von Prodigiosin auf die Vitalität von P. putida

Wie bereits in **1.2** beschrieben zeigt Prodigiosin eine antimikrobielle Wirkung gegen eine Vielzahl von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Auch die Wirkung gegen verschiedene Spezies der Gattung *Pseudomonas* wurde bereits nachgewiesen, etwa gegen *P. aeruginosa* (Gulani et al., 2012; Sumathi et al., 2014) und die nicht näher bestimmte Spezies *Pseudomonas sp.* (Priya et al., 2013; Samrot et al., 2011). Die Wirkung auf den hier zur Produktion von Prodigiosin genutzten Stamm *P. putida* KT2440 wurde allerdings noch nicht gezeigt. Im Folgenden wurde also analysiert, inwieweit die Prodigiosin-Produktion Auswirkungen auf die Vitalität des Stammes hat.

Zunächst wurde untersucht, wie sich die Zugabe von Prodigiosin auf das Wachstum von *P. putida* KT2440 auswirkt. *P. putida* KT2440 Kulturen wurden in einer 96 Well MTP in 150 μL LB-Medium inokuliert und mit Prodigiosin (gelöst in DMSO, die Endkonzentration von DMSO in der Kultur betrug 5 %) in Endkonzentrationen zwischen 0 und 500 mg/L versetzt. Als Kontrolle fungierte *P. putida* KT2440 ohne Zugabe von DMSO oder Prodigiosin. Nach 6 und 24 h Anzuchtzeit wurden Proben genommen und das Wachstum über den Verlauf der Zelldichte (OD<sub>650nm</sub>) bestimmt. Die Daten sind in **Abb. 3.5** aufgetragen. Zu beiden Messzeitpunkten wiesen die Proben, welche Prodigiosin und/oder DMSO enthielten, alle eine geringere Zelldichte auf als die Kontrolle. Es fällt jedoch auch auf, dass sich die Proben, die zusätzlich zum DMSO auch Prodigiosin, egal welcher Konzentration, enthielten, nur geringfügig von der Lösemittelkontrolle unterscheiden. Lediglich nach 6 h gibt es einen Unterschied, hier erreichten die Prodigiosin-Proben nur bis zu 74 % der in der Lösemittelkontrolle ermittelten Zelldichte. Aber nach 24 h waren die Zelldichten in allen Proben im Rahmen der Standardabweichung etwa gleich. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass Prodigisin scheinbar nur in der frühen Phase einen geringen Einfluss auf das Wachstum

von *P. putida* KT2440 hat. Die Ergebnisse sind jedoch nicht quantitativ in Bezug auf die eingesetzte Prodigiosinmenge zu betrachten, da während der experimentellen Durchführung beobachtet werden konnte, dass ein Teil des hinzugefügten Prodigiosins ausgefallen ist. Hierdurch ist nicht ermittelbar, wieviel Prodigiosin tatsächlich gelöst im LB-Medium vorlag. Einen Hinweis darauf bietet nur die Tatsache, dass erst ab einer Konzentration von 100 mg/L ausgefallenes Prodigiosin zu beobachten war. Trotz dieses Problems bleibt die Beobachtung, dass das im Medium gelöste Prodigiosin kaum einen Einfluss auf das Wachstum von *P. putida* KT2440 hat, bestehen.

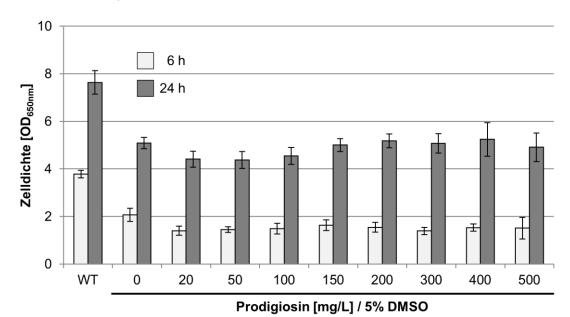


Abb. 3.5: Toleranz von P. putida KT2440 gegen das antibakterielle Prodigiosin

Auswirkungen auf das Wachstum von *P. putida* KT2440 nach der Zugabe verschiedener Prodigiosin-Konzentrationen (0-500 mg/L) bei der Inokulation. Die Zelldichte wurde photometrisch bei 650 nm nach 6 bzw. 24 h bestimmt. WT zeigt zum Vergleich die Wildtyp-Kontrolle ohne Prodigiosin und ohne 5 % DMSO. Die Säulen entsprechen jeweils dem Mittelwert von neun biologischen Replikaten, hierbei ist die Standardabweichung jeweils als Fehlerbalken angegeben.

Durch die in **3.1.1** beschriebene Erzeugung von Prodigiosin-Produktionsstämmen auf Basis von *P. putida* KT2440, welche dauerhaft Prodigiosin produzieren, ergab sich eine weitere wichtige Fragestellung: Wirkt sich vom Organismus selbst produziertes Prodigiosin auf dessen Vitalität aus? Gerade weil, wie in **3.1.2** beschrieben, unter bestimmten Bedingungen mit  $94 \pm 1$  mg/L nicht unerhebliche Mengen Prodigiosin produziert werden können, ist diese Fragestellung auch im Hinblick auf die Untersuchung weiterer Möglichkeiten zur Produktionssteigerung interessant.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde das Wachstum von *P. putida* pig-r1 also im Vergleich zum *P. putida* KT2440 Wildtyp untersucht. Hierfür wurden beide Stämme unter

den in **3.1.2** aufgeführten, bis jetzt bekannten besten Prodigiosin-Produktionsbedingungen über 48 h angezogen. Dabei wurden regelmäßig Proben entnommen und deren Zelldichte bei 650 nm photometrisch bestimmt, die hieraus resultierende Wachstumskurve ist in **Abb. 3.6** dargestellt. Wie am Verlauf der beiden Kurven klar zu erkennen ist, gibt es keine deutlichen Unterschiede beim Wachstum der Stämme KT2440 (grau) und pig-r1 (rot) (**Abb. 3.6**). Einzig in den ersten 8 h des Wachstums zeigte pig-r1 eine unbedeutend geringere Teilungsrate, erreichte aber mit geringen Zeitversatz die gleiche maximale Zelldichte. Dieses Ergebnis deckt sich sehr gut mit den Beobachtungen aus dem Experiment mit manuell zugegebenem Prodigiosin (vgl. **Abb. 3.5**). Somit konnte gezeigt werden, dass auch von einem Stamm, wie pig-r1, dauerhaft produziertes Prodigiosin keinen wesentlichen Einfluss auf die Vitalität dieses Bakteriums hat.

Desweiteren scheint auch der Einbau des TREX-*pig*-Transposons ins Genom die Vitalität von pig-r1 nicht nachhaltig zu beeinflussen. Dieses Ergebnis lässt sich jedoch nicht uneingeschränkt auf andere Stämme ausweiten. Da es sich bei der durch das TREX-System ermöglichten Tn5-Transposition um eine zufällige Transposition handelt, können verschiedene Stämme auch unterschiedliche Insertionsorte aufweisen, die sich wiederum unterschiedlich auf das Wachstum des Bakteriums auswirken könnten.

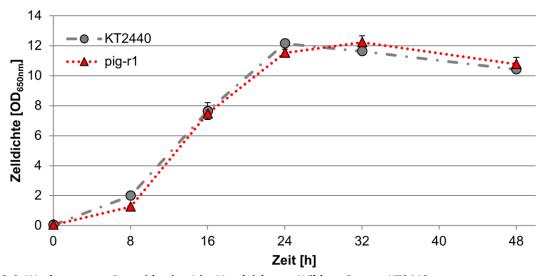


Abb. 3.6: Wachstum von *P. putida* pig-r1 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm KT2440

Darstellung des Wachstums von pig-r1 im Vergleich zum Wildtyp KT2440 anhand der Zelldichte, beide aus Vergleichszwecken unter den bis hierhin bekannten besten Prodigiosin-Produktionsbedingungen (20 °C, TB-Medium, zu 10 % gefüllte Erlenmeyerkolben mit Schikanen) über 48 h angezogen. Die Zelldichte wurde photometrisch bei 650 nm bestimmt. Die Messpunkte entsprechen jeweils dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung, hierbei ist die Standardabweichung jeweils als Fehlerbalken angegeben.

Zusammenfassend ist anhand der Ergebnisse der vorliegenden Experimente anzunehmen, dass Prodigiosin keinen wesentlichen Einfluss auf die Vitalität von *P. putida* KT2440 nimmt,

weder bei manueller Zugabe noch bei heterologer Produktion im Organismus. Lediglich in frühen Phasen des Wachstums scheint die Teilungsrate in der Anwesenheit von Prodigiosin geringer zu sein.

#### 3.1.4 Stabilität der konstitutiven Produktionsstämme über lange Zeitperioden

Für Produktionsstämme ist es gerade im industriellen Umfeld wünschenswert, dass sie eine hohe Stabilität aufweisen und über längere Zeiträume genutzt werden können. In diesem Kapitel wurde überprüft, ob die hier erzeugten Prodigiosin-Produktionsstämme pig-r1 und pig-r2 (vgl. **3.1.1**) in Bezug auf das Wachstum und die Prodigiosin-Produktion über längere Zeitperioden stabil bleiben. Gründe für eine schlechtere Produktion könnten z.B. der Verlust des TREX-pig-Transposons oder Mutationen im Genom des Stammes sowie den pig-Genen sein. Solche Mutationen könnten beispielsweise aus Selektionsdruck durch das dauerhaft vorliegende Prodigiosin begünstigt werden und sich ebenfalls negativ auf das Wachstum des Stammes auswirken. Denkbar wäre aber auch der umgekehrte Fall, dass Mutationen die Prodigiosin-Produktion und/oder das Wachstum fördern.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden nach der Erzeugung der T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionstämme pig-r1 und pig-r2 Kyrokulturen (2.11.7) angefertigt und eingelagert. Parallel wurden beide Stämme über den Zeitraum von ungefähr zwei Jahren einmal pro Monat durch Überstreichen auf neue Nähragarplatten (LB<sub>Gm/Irg</sub>) passagiert. Nach diesen zwei Jahren wurden frische Kulturen mit den kryokonservierten Zellen erzeugt. Diese wurden parallel zu Kulturen der passagierten Zellen in 1000 μL TB-Medium in Flowerplates® inokuliert und bei 1400 UpM und 20 °C im ThermoMixer®C (Eppendorf AG) über 24 h inkubiert. Während der ersten 12 h wurden den Kulturen alle 2 h Proben entnommen und deren Zelldichten bei 650 nm photometrisch bestimmt, die daraus resultierenden Wachstumskurven sind in Abb. 3.7 A (pig-r1) und C (pig-r2) dargestellt. Zusätzlich wurde nach 24 h die Prodigiosin-Ausbeute als Titer in mg/L wie in 2.13.2 beschrieben bestimmt, die Ergebnisse hierraus wurden in Abb. 3.7 B für pig-r1 und D für pig-r2 dargestellt.

Wie am Verlauf der Wachstumskurven klar zu erkennen ist (**Abb. 3.7** A und C), weichen beide passagierten Stämme jeweils kaum von ihrer kryokonservierten Version ab. Bei der Prodigiosin-Produktion gibt es ebenfalls nur eine geringfügige Abweichung bei pig-r1, hier erreichte der passagierte Stamm mit  $59.8 \pm 1.1$  mg/L eine etwas höhere Ausbeute als die kryokonservierte Version, welche  $55.2 \pm 1.1$  mg/L erzielte. Bei pig-r2 sind die Produktionen

mit  $30,4\pm0,5$  bzw  $30,7\pm1,2$  mg/L in Anbetracht der Standardabweichung nahezu deckungsgleich.

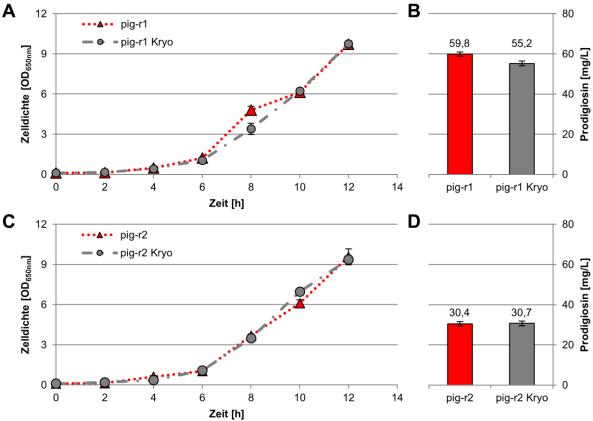


Abb. 3.7: Stabilität der konstitutiven Prodigiosin-Produktionsstämme P. putida pig-r1 und pig-r2

A und C: Darstellung des Wachstums durch die Zelldichte gemessen an der OD<sub>650nm</sub> über den Zeitraum von 12 h. B und D: Darstellung der Prodigiosin-Produktion in [mg/L] nach 24 h Kultivierung. Verglichen werden jeweils Kulturen, die mit Zellen von über zwei Jahre passagiertem pig-r1 bzw. –r2 (rot pig-r1 und pig-r2) oder kryokonserviertem pig-r1 bzw. –r2 inokuliert wurden (grau pig-r1 Kryo und pig-r2 Kryo). Die Säulen und Messpunkte entsprechen jeweils dem Mittelwert einer biologischen Dreifachbestimmung, hierbei ist die Standardabweichung jeweils als Fehlerbalken angegeben.

Durch die Experimente konnte klar gezeigt werden, dass auch eine fortwährende Überimpfung und Zellteilung auf festem Nährmedium die Stabilität der konstitutiven Stämme weder in Bezug auf die Prodigiosin-Produktion noch auf das Wachstum negativ beeinflusst. Auch ein positiver Effekt konnte nicht gezeigt werden. Hierdurch lassen sich Mutationen zwar nicht insgesamt, wohl aber solche mit Einfluss auf die Prodigiosin-Produktion und/oder das Wachstum des Bakteriums ausschließen. Die Ergebnisse spiegeln auch die hohe Stabilität der Integration des TREX-pig-Transposons ins Wirtsgenom wieder, der Verlust des Transposons hätte sich deutlich auf die Prodigiosin-Produktion ausgewirkt.

### 3.1.5 Polyurethan als effektive Trägersubstanz zur Prodigiosin-Extraktion

Aufgrund des hohen Bedarfs an Prodigiosin für bestimmte Experimente und des recht aufwendigen Extraktionsprozesses aus den Kulturen wurde anschließend versucht, einen schnelleren und einfacheren Extraktionsweg zu etablieren.

Hierfür wurde die bereits bekannte Eigenschaft von Prodigiosin genutzt, sich aufgrund seiner Hydrophobizität direkt in situ an hydrophobe Oberflächen von Kunstharzen wie HP-20 Resin anzulagern (Bae et al., 2001; Juang und Yeh, 2014; Song et al., 2006). Es wurde Polyurethan (PU)-Schaumstoff als kostengünstiges, ebenfalls hydrophobes Material zur Extraktion ausgewählt, zum einen weil innerhalb des Instituts bereits positive Erfahrungen mit diesem Material erzielt wurden (unpublizierte Daten), zum anderen, weil es schon erfolgreich zur in situ Extraktion von Pigmenten eingesetzt worden ist (Heyes et al., 2003). Der PU-Schaum wurde in Würfel mit etwa 1 cm Kantenlänge zerschnitten und direkt in die Kultur gegeben. Die PU-Würfel erwiesen sich als hervorragend geeignet, um Prodigiosin zu binden, diese Bindung konnte klar durch den Farbwechsel der PU-Würfel von weiß zu rot beobachtet werden (vgl. Abb. 3.8). In den Kulturen selbst konnte die geringere Menge an im Medium enthaltenen Prodigiosin ebenfalls klar optisch wahrgenommen werden. Abb. 3.8 A zeigt eine Kultur ohne PU-Würfel, die noch eine starke Rotfärbung aufweißt, wohingeben in der Kultur mit 5 g PU-Würfeln (Abb. 3.8 B) das Medium deutlich weniger rot erscheint. Des Weiteren wurde beobachtet, dass sich die Schaumbildung in Kulturen mit PU-Würfeln merklich reduziert. Diese in situ Extraktion durch PU-Würfel ist sehr effektiv, nach den in Abb. 3.8 C gezeigten Ernten der PU-Würfel durch ein Sieb verbleiben in einer 500 mL Kultur weniger als 1 mg/L Prodigiosin. Die geringen Mengen von in der Kultur zurückbliebendem Prodigiosin sind auch ein erster Hinweis darauf, dass das produzierte Prodigiosin bei den Stämmen P. putida pig-r1 und pig-r2 fast vollständig ins Medium abgegeben wird. Andreas Sebastian Klein führte nach dem Ernten der Prodigiosin-bindenen PU-Würfel einen sogenannten Soxhlet-Prozess durch (vgl. Abb. 3.8 D), um das gebundene Prodigiosin aus den PU-Würfeln zu extrahieren. In diesem größtenteils selbstständig ablaufenden Prozess wurde mit angesäuertem Ethanol (4 % 1M HCl) das Prodigiosin aus den PU-Würfeln extrahiert, die Extraktion kann durch die Entfärbung der Würfel (vgl. Abb. 3.8 D rechts und links) nachvollzogen werden.







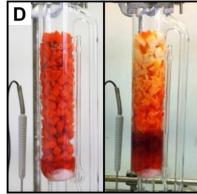


Abb. 3.8: Arbeitsablauf der Prodigiosin-Extraktion aus einer *P. putida* pig-r1 Kultur mit PU-Würfeln *P. putida* pig-r1 Kultur nach 24 h Prodigiosin-Produktion ohne (A) und mit 5 g PU-Würfeln (B). C: Durch ein Sieb aus Kultur geerntete Prodigiosin-bindende PU Würfel. D: (links) Soxhlet-Aufsatz beladen mit Prodigiosin-bindenden PU-Würfeln, (rechts) die gleichen PU-Würfel während des Soxhlet Prozesses mit angesäuertem Ethanol (4 % 1 M HCl).

In **Tab. 3.1** ist dargestellt, inwieweit sich die Extraktion von Prodigiosin durch den Einsatz von PU-Würfeln verändert. Zum einen verringern sich sowohl die Kosten (um über 80 %) als auch der Zeitaufwand (um über 50 %), zum anderen erhöht sich die Reinheit des Rohextraktes von  $9 \pm 2$  % ohne PU auf  $37 \pm 1$  % mit PU. Darüber hinaus erreichen Kulturen mit PU-Würfeln scheinbar eine höhere Prodigiosin-Ausbeute. Im in der Tabelle dargestellten Beispiel konnten aus Kulturen mit PU-Würfeln  $47 \pm 6$  mg/L extrahiert werden, wohingegen aus Kulturen ohne PU nur  $23 \pm 9$  mg/L gewonnen werden konnten. Die Quantifizierung der Prodigiosin-Ausbeuten in Kultur als auch im Rohextrakt erfolgte wie in **2.13.2** beschrieben. Die Bestimmung der Reinheit wurde von Andreas Sebastian Klein über den Gewichtsanteil von Prodigiosin im getrockneten Rohextrakt ermittelt.

Tab. 3.1: Vergleich der Extraktion von Prodigiosin aus einer P. putida pig-r1 Kultur mit und ohne PU

Auflistung verschiedener Punkte bei der Prodigiosin-Extraktion aus einer *P. putida* pig-1 Kultur, bei denen ein deutlicher Unterschied zwischen der Extraktion mit und ohne PU-Würfel erkennbar ist. Der Prodigiosin-Gehalt in Kultur mit PU konnte nur abgeschätzt werden (aus der Summe des in Kultur zurückbleibenden Prodigiosin-Gehaltes (<1 mg/L) und des aus den PU-Würfeln extrahierten Prodigiosin), Verluste bei der Extraktion konnten nicht gemessen werden. Der Zeitaufwand beschreibt den tatsächlichen Arbeitsaufwand einer Person, automatisch ablaufende Prozesse wie der Soxhlet Vorgang oder Zentrifugationszeit, die nur der Aufsicht benötigen, wurden nicht berücksichtigt.

	Mit PU	Ohne PU
Prodigiosin-Gehalt in Kultur	~48 mg/L	24 ± 8 mg/L
Prodigiosin-Gehalt im Rohextrakt	47 ± 6 mg/L	23 ± 9 mg/L
Reinheit des Rohextraktes	37 ± 1 %	9 ± 2 %
Zusätzliche Kosten pro 500 mL Kultur	PU: 0,14 €	Zentrifugen RGs: 1,20€
Zeitaufwand pro 500 mL Kultur	ca. 45 min	ca. 95 min

Es konnte klar gezeigt werden, dass PU-Würfel ein effektives Mittel für die *in situ* Extraktion von Prodigiosin sind. Die PU-vermittelte Extraktion von Prodigiosin erlaubt somit eine schnellere und kostengünstigere Aufarbeitung, die in einem viel reineren Rohextrakt resultiert, was die spätere Reinigung zusätzlich erleichtert. Außerdem weist die geringe Menge an in der Kultur zurückbleibendem Prodigiosin darauf hin, dass es von den das *pig*-Gencluster konstitutiv exprimierenden Stämmen *P. putida* pig-r1 und pig-r2 fast vollständig ins Medium abgegeben wird.

Zusammenfassend wurden in diesem Teil der Arbeit mit dem TREX-System erfolgreich neue Prodigiosin-Produktionsstämme auf Basis von *P. putida* KT2440 erzeugt. Diese Stämme zeigten mit bis zu 94 mg/L gute Prodigiosin-Ausbeuten und wiesen darüber hinaus eine hohe Stabilität über die Zeit auf. Zudem konnte eine hohe natürliche Toleranz von *P. putida* KT2440 gegenüber exogen zugefügtem und endogen erzeugtem Prodigiosin nachgewiesen werden.

# 3.2 Analyse des zur T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktion führenden Genomlocus

Wie in **3.1.1** beschrieben, kann durch die Anwendung des TREX-Systems sowohl eine T7RP-abhängige als auch -unabhängige Prodigiosin-Produktion erreicht werden. Bei T7RP-unabhängigen Produktionsstämmen wird die Expression der Gene des *pig*-Genclusters vermutlich durch einen starken nativen Promotor ermöglicht, welcher sich stromaufwärts des TREX-*pig*-Transposon-Integrationsorts im Genom des Wirtsorganismus befindet. Die beiden hier erzeugten T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämme *P. putida* pig-r1 und -r2 weisen hierbei im direkten Vergleich zu Stämmen mit T7RP-abhängiger Produktion deutlich höhere Prodigiosintiter auf (**Abb. 3.3** B,C und D). Daher erscheint eine Bestimmung der Insertionsorte sehr interessant, um den oder die für diese starke Produktionsleistung verantwortlichen Promotor/en identifizieren zu können.

Im Folgenden sollte daher zunächst der Insertionsort des TREX-pig-Transposons in den Genomen von *P. putida* pig-r1 und -r2 bestimmt sowie die damit verbundenen für die Expression des pig-Genclusters verantwortlichen Promotoren näher charakterisiert werden. Die hierdurch gewonnenen Informationen könnten in zweierlei Hinsicht auf andere Anwendungen übertragen werden. Zum einen könnten gezielt *P. putida* Stämme durch die Integration von unidirektionalen Genclustern in diese Loci erzeugt werden, welche dann dazu in der Lage sein könnten, alle Gene des jeweiligen Clusters konstitutiv zu exprimieren. Zum anderen könnte eine Anwendung der identifizierten Promotorsequenzen für die Konstruktion von neuartigen *P. putida* Expressionsplasmiden sinnvoll sein.

## 3.2.1 Bestimmung des Integrationsortes von TREX-pig in P. putida pig-r1 und P. putida pig-r2

Zunächst wurde der chromosomale Insertionsort des TREX-pig-Transposons in den beiden T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämmen P. putida pig-r1 und -r2 durch einen sogenannten plasmid-rescue (Perucho et al., 1980) ermittelt. Bei einem plasmid-rescue wird die genomische DNA des Organismus mit geeigneten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und anschließend ligiert. Enthalten die zirkulären DNA-Fragmente nun einen Replikationsursprung, sowie einen Selektionsmaker, entsteht ein replikationsfähiges Plasmid welches anschließend näher untersucht werden kann. Ein solcher plasmid-rescue ist in Stämmen mit integriertem TREX-Transposon möglich und wurde bereits von A. Loeschcke

(2012) erfolgreich angewandt. Der Ablauf eines plasmid-rescue für einen Stamm mit integriertem TREX-pig-Transposon ist in Abb. 3.9 übersichtlich dargestellt. Zunächst musste, wie in 2.12.6 beschrieben, die genomischen DNA aus den beiden Stämmen P. putida pig-r1 und -r2 (Abb. 3.9 A) isoliert werden. Im TREX-pig-Transposon liegen geeignete Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen Mlul und Ncol vor (Abb. 3.9 B). Nach der Hydrolyse mit einer der beiden Restriktionsendonukleasen entsteht ein DNA-Fragment, welches neben einem Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker auch einen geeigneten Replikationsursprung für die Replikation in E. coli enthält. Dies ist in Abb. 3.9 C am Beispiel der Restriktion mit Ncol gezeigt. Mit der vollständig hydrolysierten genomischen DNA wurde eine Ligation durchgeführt (2.12.12) und der Ligations-Ansatz anschließend komplett in *E. coli* DH5α eingebracht (**2.12.1**). Durch Verwendung eines Selektionsmediums mit Ampicillin konnte auf erfolgreich gebildete rescue Plasmide selektiert werden (Abb. **3.9** D). Für beide Stämme konnte mit dieser Strategie erfolgreich ein rescue Plasmid erzeugt werden. Aus der genomischen DNA von P. putida pig-r1 wurde nach einem Ncol Restriktionsendonuklease-Verdau das Plasmid pig-r1-Ncol-PR und aus der von P. putida pigr2 nach einem Mlul Restriktionsendonuklease-Verdau das Plasmid pig-r2-Mlul-PR erzeugt (vgl. Anhang Abb. 8.1). Beide Plasmide wurden ausgehend vom Oligonukleotid AD16, welches nahe dem OE der R-TREX Kassette bindet (Abb. 3.9 D), sequenziert. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden unter Benutzung von BLAST (Altschul et al., 1990) und der Pseudomonas Genome DB (Winsor et al., 2015) mit dem Genom von P. putida KT2440 (Nelson et al., 2002) abgeglichen. Für beide Prodigiosin-Produktionsstämme wurde hierbei eines der sieben rRNA-Operons von P. putida KT2440 als Insertionsort des TREX-pig-Transposons ermittelt. Diese sieben rRNA-Operons (A-G) sind sehr ähnlich aufgebaut, sie bestehen aus einer Promotorregion gefolgt von den für die 16S, 23S und 5S rRNA kodierenden Genen. In den intergenischen Regionen zwischen den Genen der 16S und 23S rRNA können ggf. noch Gene für tRNAs vorkommen. Im Falle des weniger Prodigiosinproduzierenden Stammes pig-r2 zeigte die Sequenzierung, dass das TREX-pig-Transposon 1033 bp hinter dem Beginn eines für die 23S rRNA kodierenden Gens integriert worden war. Im Stamm pig-r1 wurde das Transposon 311 bp hinter dem Beginn eines für die 16S rRNA kodierenden Gens, das in den Operons näher am Promotor liegt, integriert. Diese nähere Lage zum Promotor der rRNA-Operons könnte die beobachtete höhere Prodigiosin-Produktion von *P. putida* pig-r1 bedingen.

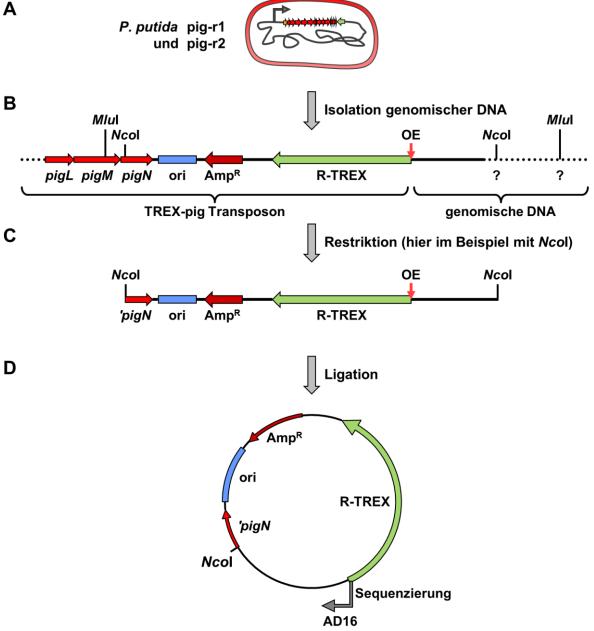


Abb. 3.9: Schematische Darstellung des plasmid-rescue aus genomischer DNA von P. putida pig-r1 und -r2

A: Scheamatische Darstellung einer Zelle entsprechend der T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämme *P. putida* pig-r1 und -r2. In deren genomische DNA das TREX-*pig*-Transposon integriert vorliegt. Der Pfeil vor dem Transposonbereich kennzeichnet den putativen Promotor, der die konsitutive Expression der *pig*-Gene bedingt. **B:** Isolierung der genomischen DNA sowie die schematische Darstellung des TREX-*pig*-Transposon-Bereichs im Genom und dessen für den *plasmid-rescue* wichtigen funktionellen Elemente und Restriktionsendunuklease-Erkennungssequenzen. **C:** Aus der Restriktion der isolierten genomischen DNA entstandenes DNA-Fragment des TREX-*pig*-Transposons (hier dargestellt am Beispiel der Restriktion mit *Nco*I). **D:** Ligation des Restriktionsansatzes zur Zirkularisierung des *rescue* Plasmids sowie schematische Darstellung des *rescue* Plasmids mit der Lage des zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotids AD16. Amp<sup>R</sup> = Ampicillin-Resistenzgen, ori = *origin of replication, Nco*I und *MIu*I = Erkennungssequenzen für entsprechende Restriktionsendonukleasen. Modifiziert nach Domröse et al. (2015).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der Integrationsort des TREX-*pig*-Transposons von *P. putida* pig-r1 und pig-r2, einem der sieben rRNA-Operons von *P. putida KT2440* 

zugeordnet werden kann. Die rRNA-Operons (A-G) zeigen jedoch nicht nur einen sehr ähnlichen grundlegenden Aufbau, auch die Sequenzen der für die 16S und 23S rRNA kodierenden Gene der verschiedenen Operons unterscheiden sich nur durch sehr wenige SNPs (single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus) voneinander (vgl. Anhang **Tab. 8.2** für 16S und **Tab. 8.3** für 23S). Hierdurch war eine eindeutige Zuordnung der Integrationsorte der TREX-pig-Transposons zu einem spezifischen rRNA-Operon mit den vorliegenden Daten nicht möglich. Auch weitere Sequenzierungen, durchgeführt mit den Oligonukleotiden AD17 für pig-r1 und AD18 für pig-r2, die nach dem Prinzip des primer walkings gewählt wurden, ermöglichten es nicht, den Integrationsort eindeutig einem Operon zuzuordnen. Bei pig-r1 beinhaltet das rescue Plasmid insgesamt 1081 bp der 16S rRNA, da im Gen der 16S rRNA eine Ncol Erkennungssequenz vorliegt. Diese Sequenz wurde in einem Multi-Sequenz-Alignment mit den verschiedenen Genen der 16S rRNA (A-G) durch Clustal Omega (Sievers et al., 2011) verglichen. Anhand der vorliegenden SNPs in den verschiedenen Genen der 16S rRNA wurde der mögliche Einbauort des TREX-pig-Transposons zumindest auf die Gene der 16S rRNA der Operons A, B, C oder E eingegrenzt (Tab. 3.2). Für pig-r2 konnte auf dem rescue Plasmid bis zum Ende des 23S rRNA Gens sequenziert werden. Aus dem hieraus erfolgten Multi-Sequenz-Alignment mit den verschiedenen 23S rRNA Genen (A-G) ergab sich, dass das Transposon in eines der rRNA-Operons A, B oder D integriert sein könnte (**Tab. 3.2**).

Tab. 3.2: Übersicht der Insertionsloki der Prodigiosin-Produktionsstämme *P. putida* pig-r1 und pig-r2
Beschreibung des Insertionslocus des TREX-*pig*-Transposons für die beiden T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämme *P. putida* pig-r1 und pig-r2. Hier dargestellt sind die ersten 21 bp der genomischen DNA von *P. putid* KT2440 nach dem OE der R-TREX-Kassette, entsprechend der durch Sequenzierung ermittelten DNA-Sequenz. Die nach Sequenz-Abgleich mit dem Genom von *P. putida* KT2440 (Nelson et al., 2002) in Frage kommenden möglichen Insertionsorte sind mit dem *Locus Tag* entsprechend der Pseudomonas Genome DB (Winsor et al., 2011) angegeben.

Stamm	Sequenz 5'→3' nach OE R-TREX	Mögliche Insertionsorte
P. putida pig-r1	GTCCAGACTCCTACGGGAGGC	PP_16S rRNA-Operon A, B, C oder E
P. putida pig-r2	GCTTAGACAGCTAGGAGGTTG	PP_23S rRNA-Operon A, B oder D

Es konnte somit erfolgreich ein *plasmid-rescue* mit der genomischen DNA der beiden T7RPunabhängigen Prodigiosin-Produktionstämme *P. putida* pig-r1 und -r2 durchgeführt werden. Die Sequenzierung der *rescue* Plasmide ergab, dass die Insertionsorte der TREX-*pig*-Transposons beider Stämme in einem der sieben rRNA-Operons von *P. putida* KT2440 liegen. Anhand der durch diese Strategie ermittelten Daten konnte jedoch noch nicht ermittelt werden, in welches der sieben rRNA-Operons (A-G) die Transposons integriert worden sind.

## 3.2.2 Generierung weiterer T7RP-unabhängiger Prodigiosin-Produktionsstämme mit dem TREX-System

In **3.2.1** wurde beschrieben, dass die TREX-*pig*-Transposons der beide, das *pig*-Gencluster konstitutiv exprimierenden Stämme *P. putida* pig-r1 und pig-r2 in eine Kopie des rRNA-Operons von *P. putida* integriert wurden. In diesem Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob es neben den rRNA-Operons noch weitere Insertionsorte für das TREX-*pig*-Transposon im Genom von *P. putida* KT2440 gibt, in denen starke native Promotoren eine konstitutive Expression des *pig*-Genclusters bewirken. Um dies näher untersuchen zu können, wurden zunächst weitere T7RP-unabhängige Prodigiosin-Produktionsstämme mit dem TREX-System erzeugt.

Entsprechend der bereits in 3.1.1 beschriebenen Vorgehensweise wurden die beiden TREX-Plasmide pTREX-LpigR und pTREX-RpigL (Abb. 3.1) über Konjugation in P. putida KT2440 übertragen. Erneut trat der, die Prodigiosin-Produktion andeutende, rote Phänotyp nur nach der Übertragung des Plasmids pTREX-LpigR auf, im Durchschnitt wieder bei etwa einer pro 1000 Kolonien. Auf diese Weise wurden insgesamt 50 weitere T7RP-unabhängige Prodigiosin-Produktionsstämme auf Basis von P. putida KT2440 erzeugt. Die Verifizierung, ob es sich bei der produzierten Substanz um Prodigiosin handelt, erfolgte bei allen 50 Stämmen über die Aufnahme von Absorptionspektren (2.13.1), hierbei diente das von Andreas Sebastian Klein (Institut für Bioorganische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) hergestellte synthetische Prodigiosin als Referenzsubstanz. In allen Stämmen konnte so die Produktion von Prodigiosin nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten die Experimente, dass sich das Plasmid pTREX-RpigL scheinbar nicht zur Erzeugung von Stämmen eignet, die das piq-Gencluster konstitutiv exprimieren. Von über 50.000 überprüften Kolonien zeigte keine einen roten Phänotyp. Dies könnte daran liegen, dass in diesem Plasmid die R-TREX-Kassette stromaufwärts der pig-Gene liegt und in dieser Kassette der Transpositionsbereich mit 3,2 kb etwa dreimal größer ist wie in der L-TREX-Kassette (Abb. 3.1).

Um einen Vergleich zwischen den Produktionsleistungen der verschiedenen Stämme zu ermöglichen, wurden die Produktionstiter der Stämme, wie in **2.13.2** beschrieben, photometrisch bestimmt. Hierfür wurden von allen Stämmen Kulturen auf eine OD<sub>650nm</sub> von

0,05 inokuliert und in Flowerplates® mit 1000 µL TB-Medium bei 1400 UpM und 20 °C für 24 h angezogen. Diese Bedingungen entsprechen den auf Flowerplates® adaptierten, mit *P. putida* pig-r1 ermittelten besten bis jetzt bekannten Prodigiosin-Produktionsbedingungen (vgl. **3.1.2**). Als Referenzproduzenten wurden die beiden bereits beschriebenen Stämme pig-r1 und -r2 (**3.1.1**) unter gleichen Bedingungen angezogen. Das Ergebnis dieser Studie ist in **Abb. 3.10** dargestellt.

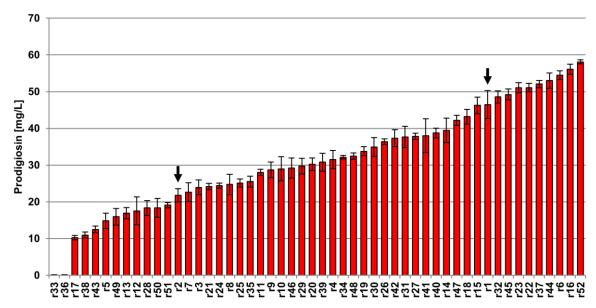


Abb. 3.10: Erzielte Prodigiosintiter in den mittels TREX-System erzeugten *P. putida* Stämmen pig-r1 bis -r52 Dargestellt sind die Prodigiosintiter in [mg/L] der insgesamt 52 T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämme *P. putia* pig-r1 bis -r52 (aufsteigend sortiert nach den jeweiligen Ausbeuten). Die bereits beschriebenen Stämme pig-r1 und -r2 sind durch schwarze Pfeile kenntlich gemacht. Die Quantifizierung der Produktion erfolgte nach 24h Anzucht in Flowerplates (1000 µL TB, 1400 UpM, bei 20°C). Die Säulen entsprechen jeweils dem Mittelwert einer biologischen Dreifachbestimmung, hierbei ist jeweils die Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

Werden die Ergebnisse der Prodigiosin-Quantifizierung betrachtet (**Abb. 3.10**), so ist klar erkennbar, dass sich die Produktionstiter der Stämme stark unterscheiden. Die beiden Stämme r33 und r36 zeigten nur einen sehr schwach roten Phänotyp, die Produktionsleistung ist mit einem Titer von 0,1 mg/L dementsprechend ebenfalls deutlich niedriger als die der anderen Stämme. Der Stamm r17 erreicht mit einer Produktion von 10,3 mg/L den nächst höheren Titer, r52 produziert mit 58,1 mg/L das meiste Prodigiosin. Im direkten Vergleich zwischen r17 und r52, weist r52 einen um den Faktor 5,6 höheren Produktionstiter auf. Im Vergleich mit dem in **3.1.1** beschriebenen Stamm r1, welcher unter den hier getesteten Bedingungen in der Flowerplate® 46,5 mg/L produzierte, bildete r52 25 % mehr Prodigiosin. Insgesamt verteilen sich die Stämme, bis auf r33 und r36, fast linear

ansteigend zwischen r17 und r52 (**Abb. 3.10**), es ist also keine weitere Gruppierung in gute oder schlechte Produzenten möglich.

Demnach konnten mit dem TREX-System insgesamt weitere 50 T7RP-unabhängige Prodigiosin-Produktionsstämme in *P. putida* KT2440 erzeugt werden. Interessanterweise unterscheidet sich die Prodigiosin-Produktionsleistung dieser Stämme untereinander stark, die erzielten Titer reichen von 0,1 bis 58,1 mg/L. Diese starken Produktionsunterschiede könnten ein Hinweis darauf sein, dass neben den Promotoren der rRNA-Operons noch andere starke Promotoren für die Expression der *pig*-Gene verantwortlich sind.

### 3.2.3 Bestimmung des TREX-*pig*-Transposon Insertionsortes für *P. putida* pig-r1 bis r52

In **3.2.1** wurde durch *plasmid-rescue* gezeigt, dass der Insertionsort der TREX-*pig*-Transposons in beiden T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämmen (pig-r1 und -r2) in einem rRNA-Operon von *P. putida* KT2440 liegt. Die insgesamt 52 T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämme *P. putida* pig-r1 bis pig-r52 unterscheiden sich jedoch deutlich in ihren Produktionsausbeuten (**Abb. 3.10**). Dies könnte ein Hinweis auf andere starke Promotoren sein, welche die konstitutive Expression der *pig*-Gene bedingen.

Um schnell einen Überblick zu bekommen, wurde in diesem Kapitel zunächst überprüft, bei welchem der 50 in **3.2.2** beschriebenen T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämme das TREX-pig-Transposon dennoch in ein rRNA-Operon integriert ist. Zusätzlich sollte für die Stämme, bei denen das Transposon in einem rRNA-Operon integriert ist, ermittelt werden, in welches der sieben rRNA-Operons es eingebaut wurde. Hierfür wurde nicht wie in **3.2.1** die Methode des plasmid-rescue sondern eine PCR-basierte Methode angewandt. Hierbei wurde ausgenutzt, dass mit der Eingrenzung des Integrationsortes auf die rRNA-Operons nur sieben unterschiedliche Sequenz-Bereiche stromaufwärts des TREX-pig-Transposons in Frage kamen. Da das Genom von *P. puitda* KT2440 vollständig sequenziert ist (Nelson et al., 2002) und die Sequenzdaten über die Pseudomonas Genome DB (Winsor et al., 2015) öffentlich zugänglich sind, konnten anhand der Sequenzinformationen forward-Oligonukleotide für PCRs entwickelt werden, die eine eindeutige Zuordnung zu einem der rRNA-Operons ermöglichen. Die PCR bietet in diesem Zusammenhang gegenüber dem plasmid-rescue den Vorteil, dass der Nachweis nicht auf Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen angewiesen ist. Hierdurch wurde die in **3.2.1** bei pig-r1 beobachtete Problematik umgangen,

dass durch eine im rRNA-Operon vorliegende Erkennungssequenz für die verwendete Restiktionsendonuklease nach dem *plasmid-rescue*, das im *rescue* Plasmid enthaltene genomische DNA-Fragment nicht lang genug ist, um den Insertionsort eindeutig einem der sieben beinahe zu 100% identischen rRNA-Operons zuordnen zu können.

Hierfür wurde zunächst genomische DNA aus allen 52 T7RP-unabhängigen Stämmen sowie dem KT2440 WT isoliert (2.12.6), diese wurde als Template für alle nachfolgenden PCRs benutzt. Durch eine PCR mit den Oligonukleotiden AD53 und AD54 wurde überprüft, ob weitere TREX-pig-Transposons in ein rRNA-Operon integriert worden sind. Die Oligonukleotide wurden so geplant, dass es bei einem Einbau des Transposons in ein beliebiges rRNA-Operon von P. putida zu einem PCR Produkt kommt. Hierfür bindet AD53 in der L-TREX-Kassette (vgl. Abb. 3.11 B) und AD54 in der upstream region (USR) des 16S rRNA Gens (vgl. Abb. 3.11 A). Der Oligonukleotid Primer AD54 sollte für alle sieben rRNA-Operons gleichermaßen verwendet werden können. Um dies planen zu können, wurde mit den USR der sieben rRNA-Operons ein Multi-Sequenz-Alignment unter Benutzung der Software Clustal Omega (Sievers et al., 2011) durchgeführt. Das vollständige Multi-Sequenz-Alignment ist im Anhang beigefügt (Abb. 8.4), es zeigt, dass die USR aller sieben Operons über einen 260 bp langen Bereich vor dem Beginn des 16S rRNA Gens bis auf wenige SNPs identisch sind (vgl. Anhang **Tab. 8.4**). Das Oligonukleotid AD54 bindet innerhalb dieses identischen Sequenzbereichs (Abb. 3.11 A) und ist somit für alle sieben rRNA-Operons in Kombination mit dem Oligonukleotid AD53 einsetzbar. Das Sequenz-Alignment zeigt darüber hinaus, dass über diesen 260 bp langen fast identischen Bereich hinaus auch generell eine große Ähnlichkeit zwischen den USR der rRNA-Operons besteht. Allerdings unterscheiden sich die Längen der USR, also der Abstand vom 16S rRNA Gen bis zum nächsten annotierten Gen, deutlich zwischen den einzelnen Operons. In Operon B umfasst die USR nur 462 bp wohingegen sie bei Operon C 815 bp lang ist (vgl. Anhang Abb. 8.4 und Abb. 3.11 A).

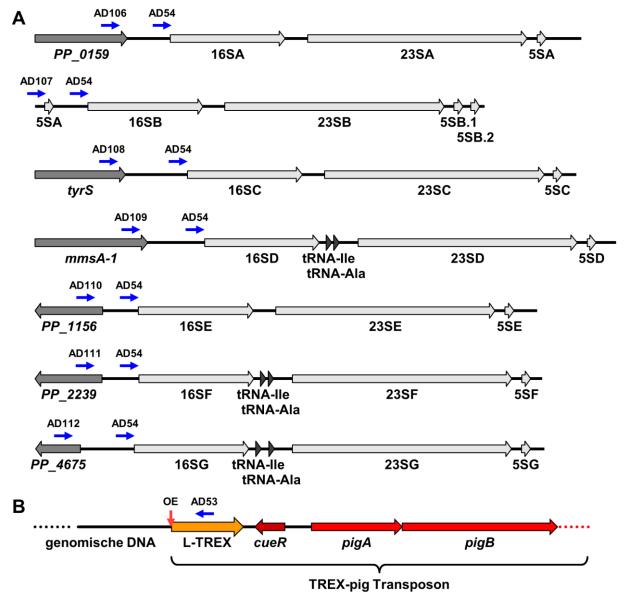


Abb. 3.11: Struktur der sieben rRNA-Operons in *P. putida* KT2440 und abgeleitete Bindestellen der Oligonukleotide zur Analyse der TREX-pig-Transposon Insertionsorte

**A:** Übersicht über die sieben rRNA-Operons A-G (alphabetisch sortiert von oben nach unten) von *P. putida* mit *upstream region* (USR) sowie dem stromaufwärts vor jedem Operon liegenden Gen. Das Oligonukleotid AD54 wurde so geplant, dass es in der USR von allen sieben rRNA-Operons in gleichem Abstand zum Gen der 16S rRNA binden kann. Die Oligonukleotide AD106-AD112 binden jeweils im ersten stromaufwärts vom rRNA-Operon liegenden Gen und sind somit jeweils spezifisch für ein Operon. **B:** Schematische Darstellung eines Teilstücks des TREX-*pig*-Transposons nach Transposition ins Genom von *P. putida* mit skizzierter Lage des Oligonukleotids AD53 in der L-TREX-Kassette.

Stämme bei denen die Integration des TREX-*pig*-Transposons in eines der sieben rRNA-Operons über die PCR mit den Oligonukleotiden AD53 und AD54 nachgewiesen werden konnte, wurden durch PCRs mit rRNA-Operon spezifischen Oligonukleotid-Kombinationen dahingehend analysiert, in welches der sieben rRNA-Operons das Transposon integriert worden ist. Hierfür wurde erneut das in der L-TREX-Kassette bindende Oligonukleotid AD53

verwendet (vgl. Abb. 3.11 B) und in Kombination mit einem für das jeweilige rRNA-Operonspezifischen Oligonukleotid (AD106 für rRNA-Operon A, AD107 für rRNA-Operon B, AD108 für rRNA-Operon C, AD109 für rRNA-Operon D, AD110 für rRNA-Operon E, AD111 für rRNA-Operon F und AD112 für rRNA-Operon G) eingesetzt. Diese rRNA-Operon spezifischen Oligonukleotide binden jeweils im ersten stromaufwärts des rRNA-Operon liegenden Gen (vgl. Abb. 3.11 A). Die einzige Ausnahme hierbei bildet das rRNA-Operon B. Da dieses im Genom direkt auf das rRNA-Operon A folgt, konnte kein Oligonukleotid in einem einzigartigen Gen stromaufwärts von diesem Operon geplant werden. Das Oligonukleotid AD107 wurde daher so geplant, dass es im Gen der 5S rRNA aller sieben rRNA-Operons bindet. Da jedoch nur Operon A und B in unmittelbarer Abfolge auf dem Chromosom lokalisiert sind, (vgl. Abb. 4.1) kann mit diesem Oligonukleotid trotzdem ein für Operon B spezifisches PCR-Produkt generiert werden. Hieraus ergeben sich für jeden Stamm acht PCRs mit unterschiedlichen Oligonukleotid-Kombinationen. Als Negativkontrolle fungierte die genomische DNA des WT, als Positivkontrolle wurde die chromosomale DNA der Stämme pig-r1 und -r2 eingesetzt, für die bereits durch plasmid-rescue nachgewiesen wurde, dass ihre TREX-pig-Transposons in einem rRNA-Operon integriert sind (vgl. 3.2.1). Jeweils 5 μL der PCR-Produkte wurden in einer Agarosegeleketrophorese (2.12.10) aufgetrennt, Abb. 3.12 zeigt am Beispiel des Stammes pig-r46 (A) sowie der Negativkontrolle (B) exemplarisch die Foto-Dokumentationen solcher Agarosegele. Die diskrete Bande bei der PCR mit den Oligonukleotiden AD53 und AD54 (Abb. 3.12 A, Spalte UN) deutet auf den Einbau des Transposons von pig-r46 in ein rRNA-Operon hin. Eine weitere diskrete Bande ist bei der Oligonukleotid Kombination AD53 und AD108 identifizierbar (Abb. 3.12 A, Spalte C), wohingegen bei keiner weiteren spezifischen Oligonukleotid-Kombination ein PCR-Produkt erzeugt wurde. Dies deutet klar auf den Einbau des Transposons von pig-r46 in das rRNA-Operon C hin. Bei der Negativkontrolle der Lokalisations-PCR auf genomische DNA des WT ist mit keiner Oligonukleotid Kombination eine Bande nachweisbar (Abb. 3.12 B).

Zur Bestätigung, dass es sich bei dem rRNA-Operon spezifischen PCR-Fragment um den erwarteten Bereich handelt, wurde dieses einer Sequenzierung mit den Oligonukleotiden AD63 und AD134 unterzogen, die Lage der beiden Oligonukleotide ist in **Abb. 3.12** C schematisch dargestellt. Die Sequenzierung mit dem in der L-TREX-Kassette gelegenen Oligonukleotid AD63 dient der Bestätigung des Einbaus in ein rRNA-Operon sowie der Identifikation des genauen Einbauortes innerhalb der jeweiligen rRNA. Die Sequenzierung

mit AD134 dient der eindeutigen Bestätigung, in welches der sieben rRNA-Operons das Transposon integriert wurde. Hierfür wurde die in der Sequenzierung ermittelte DNA-Sequenz mit der Sequenz des jeweils vor der USR gelegenen Gens (vgl. **Abb. 3.11**) vergleichen. Das Oligonukleotid AD134 ist dabei so gewählt, dass es für jedes der sieben rRNA-Operons einsetzbar ist. Für diese Sequenz-Alignments wurde die Software Clustal Omega (Sievers et al., 2011) verwendet.

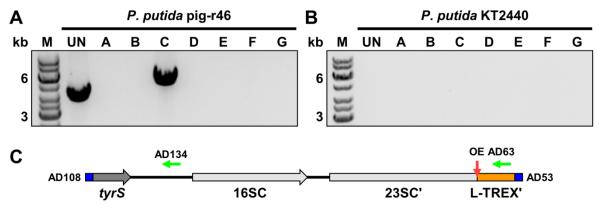


Abb. 3.12: Exemplarische Darstellung der Auswertung einer Lokalisierungs-PCR am Beispiel pig-r46 A und B: Agarosegele der verschiedenen Lokalisations-PCRs, UN: AD53/AD54, A: AD53/AD106, B: AD53/AD107, C: AD53/AD108, D: AD53/AD109, E: AD53/AD110, F: AD53/AD111 und G: AD53/AD112, für *P. putida* pig-r46 (A) und die Negativkontrolle *P. putida* KT2440 (B). Jeweils 5 μL wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen (Laufzeit 60 min). M = DNA Größenstandard (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). C: Schematische Darstellung des PCR-Produkts des Stammes pig-r46 mit den Oligonukleotiden AD53/AD108, um die Lage der zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide AD134 und AD63 zu verdeutlichen.

Die Funktionalität der Lokalisations-PCRs mit der Oligonukleotid-Kombination AD53/AD54 konnte durch pig-r1 und -r2 bestätigt werden. Für beide Stämme wurde die Insertion des TREX-pig-Transposons in ein rRNA-Operon nachgewiesen. Überraschenderweise konnte mit dieser Lokalisations-PCR nachgewiesen werden, dass bei 48 der 50 in **3.2.2** beschriebenen Stämme ein rRNA-Operon als Insertionsort des TREX-pig-Transposons vorliegt. Lediglich die Transposons der beiden sehr schwachen Produzenten pig-r33 und -r36 (vgl. **Abb. 3.10**) sind nicht in ein rRNA-Operon integriert worden. Aufgrund der niedrigen Prodigiosin-Produktion dieser beiden Stämme wurde von einer weiteren Untersuchung des Insertionsortes jedoch abgesehen. Übersichtsabbildungen der Agarosegele mit den aufgetragenen PCR-Produkten dieser Lokalisations-PCR, sind für alle 52 Stämme im Anhang beigefügt (**Abb. 8.2**). Somit wurde in 50 der insgesamt 52 T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämme das pig-Gencluster durch die randomisierte Tn5-Transposition in ein rRNA-Operon integriert.

Für alle 50 Stämme, bei denen das TREX-*pig*-Transposon in ein rRNA-Operon integriert worden ist, konnte mittels Lokalisations-PCRs mit den rRNA-Operon spezifischen

Oligionukleotid-Kombinationen bestimmt werden, in welchem der sieben rRNA-Operons sie lokalisiert sind. Übersichtsabbildungen der Agarosegele mit den aufgetragenen PCR-Produkten der Operon-spezifischen Lokalisations-PCR sind für alle 52 Stämme im Anhang beigefügt (Abb. 8.3). Das jeweilige Operon wurde, wie am Beispiel von pig-r46 bereits gezeigt, durch Sequenzierung des jeweiligen PCR-Produktes mit dem Oligonukleotid AD134 verifiziert (vgl. Abb. 3.12). Zusätzlich wurde durch Sequenzierung mit dem Oligonukleotid AD63 die Position innerhalb des jeweiligen rRNA-Operon und somit im Genom von *P. putida* KT2440 ermittelt. In Abb. 3.13 wurden die aus den Sequenzierungen der verschiedenen Lokalisations-PCRs gewonnenen Informationen übersichtlich zusammengefasst, eine Auflistung der genauen Insertionsorte der TREX-*pig*-Transposons für die einzelnen Stämme ist im Anhang in Tab. 8.5 zu finden.

Wie in **Abb. 3.13** erkennbar ist, sind die TREX-*pig*-Transposons von 49 der 50 Stämme in ein Gen der 16S oder 23S rRNA integriert. Dagegen liegt das Transposon in keinem Stamm in der intergenischen Sequenz zwischen der 16S und 23S rRNA oder in der Region stromabwärts der 23S rRNA Gene (welche aus einer weiteren intergenischen Region und dem Gen der 5S rRNA besteht, vgl. **Abb. 3.11**). Nur das Transposon des im Operon G integrierten Stammes pig-r45 liegt nicht in einer kodierenden Region, sondern 38 bp vor dem Beginn des 16S rRNA Gens. Insgesamt sind, wird pig-r45 hinzugezählt, die Transposons von 56 % der Stämme in eines der 1518 bp langen Gene der 16S rRNA integriert, während in die mit 2964 bp fast doppelt so langen Gene der 23S rRNA nur 44 % der TREX-*pig*-Transposons integriert wurden. Auch zwischen den verschiedenen rRNA-Operons sind klare Verteilungsunterschiede erkennbar. So sind in Operon F nur 4 % der Transposons integriert, wohingegen Operon C 22 % beinhaltet. Zusammengenommen beinhalten mit den Operons A, C und D drei der sieben rRNA-Operons die Transposons von 62 % der Stämme.

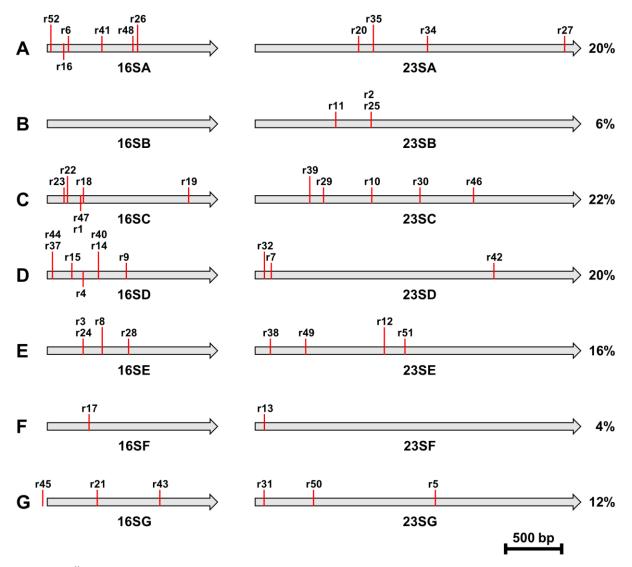


Abb. 3.13: Übersicht der *pig*-Insertionsorte innerhalb der sieben rRNA-Operons von *P. putida* pig-r1 bis -52 Übersicht der Insertionsorte der TREX-*pig*-Transposons innerhalb der sieben rRNA-Operons (A-G) von *P. putida* KT2440. Dargestellt wurden je Operon die Gene der 16S und 23S rRNA (graue Pfeile), die Insertionsorte der TREX-*pig*-Transposons der T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämme wurden durch rote Linien markiert. Der rechts angegebene Prozentwert entspricht dem Anteil der in diesem rRNA-Operon integrierten TREX-*pig*-Transposons von den insgesamt 50 in den rRNA-Operons integrierten Transposons.

In diesem Kapitel wurde durch PCR nachgewiesen, dass die TREX-*pig*-Transposons von 50 der 52 in **3.2.2** beschriebenen T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämme in einem der rRNA-Operons von *P. putida* KT2440 integriert sind. Die Vermutung, dass durch die zufällige Tn5-Transposition weitere Regionen im Genom von *P. putida* KT2440 getroffen werden, in denen starke native Promotoren vorliegen, die für die konstitutive Expression der *pig*-Gene sorgen, konnte nicht bestätigt werden. Des Weiteren konnte für jeden dieser 50 Stämme die genaue Lokalisierung des Transposons nachgewiesen werden, hierbei wurden in jedem der sieben rRNA-Operons Insertionen dokumentiert. Bemerkenswerterweise konnte eine

ungleiche Verteilung der Integrationsorte über diese sieben in ihrer Sequenz nahezu identischen Operons beobachtet werden. Außerdem wurde beobachtet, dass die Insertionsorte fast ausschließlich in für die 16S bzw. 23S rRNA kodierenden Bereichen des Operons liegen.

#### 3.2.4 Charakterisierung der Prodigiosin-Produktion in Bezug auf den Insertionsort

In Abb. 3.10 wurde gezeigt, dass die in 3.2.2 beschriebenen Stämme unter gleichen Produktionsbedingungen deutliche Unterschiede in ihren Prodigiosin-Produktionsmengen aufweisen. Des Weiteren wurden in 3.2.3 in allen sieben rRNA-Operons als Insertionsorte der TREX-pig-Transposons im Genom dieser Stämme identifiziert, die Position der Transposons innerhalb der rRNA-Operons variiert hierbei (vgl. Abb. 3.13). Diese beiden Beobachtungen kombiniert lassen eine Korrelation zwischen der Prodigiosin-Produktionsmenge und dem Integrationsort, vor allem den sich jeweils hieraus ergebenden Abständen zum rRNA-Operon-Promotor, vermuten. Einen weiteren Einfluss auf die Produktionsleistung könnte auch die Integration der TREX-pig-Transposons unterschiedliche rRNA-Operons haben. In Duan et al. (2014) wurde bereits beschrieben, dass die Promotoren der ebenfalls sieben rRNA-Operons des nah mit P. putida verwandten Organismus *Pseudomonas* sp. UW4 Unterschiede in ihren Expressionsstärken aufweisen. Deshalb wurde nachfolgend untersucht, ob sich (1) der Abstand zwischen dem rRNA-Operon-Promotor und den pig-Genen und/oder (2) die individuell unterschiedliche Expressionsstärke der unterschiedlichen rRNA-Operon-Promotoren auf die Prodigiosin-Produktion auswirken.

Zunächst wurde hierfür die Lage der putativen -10 und -35 Regionen der Promotoren für die sieben rRNA-Operons von *P. putida* KT2440 bestimmt. Hierzu wurden die USR der rRNA-Operons mit dem Online-Tool BPROM (Solovyev und Salamov, 2011) analysiert, dabei wurden, wie in Duan et al. (2014) für *Pseudomonas* sp. UW4, je rRNA-Operon zwei mögliche Promotoren vorhergesagt (vgl. Anhang **Abb. 8.4**, -10 Regionen gelbe und -35 Regionen blaue Markierung). Die Sequenzen der -10 und -35 Regionen beider Promotoren sowie ihre Positionen im Verhältnis zum Beginn des 16S rRNA Gens wurden in **Abb. 3.14** dargestellt. Die -10 Region von Promotor 1 liegt 213 bp vor dem Beginn des jeweiligen 16S rRNA Gens und ist somit bei allen sieben Operons identisch (**Abb. 3.14** A, gelber Pfeil). Die ebenfalls bei allen Operons identische -35 Region von Promotor 1 (**Abb. 3.14** A, blauer Pfeil) liegt 16 bp hinter

der -10 Region (vgl. auch Anhang **Abb. 8.4**). Promotor 2 liegt stromaufwärts von Promotor 1 und ist somit weiter von den 16S rRNA Genen entfernt. Die -10 Region liegt hier bei den Operons A, B, C, D und G I 323 bp und bei den Operons E und F 341 bp vor dem Beginn des Gens der 16S rRNA. Die -35 und -10 Regionen von Promotor 2 weisen zwar jeweils eine sehr hohe Ähnlichkeit zwischen den Operons auf, sie sind jedoch nicht identisch. Bei der -35 Region unterscheiden sich die Operons E und F durch einen SNP von den anderen fünf Operons (**Abb. 3.14** B, blauer Pfeil), in der -10 Region gibt es einen weiteren SNP in den Operons B, E und F, wobei B und E wieder zueinander identisch sind (**Abb. 3.14** B, gelber Pfeil).

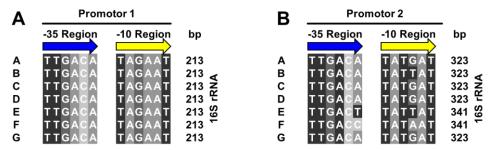


Abb. 3.14: Sequenzen der vorhergesagten rRNA-Operon-Promotorregionen aus P. putida KT2440

Für Promotor 1 (A) und 2 (B) sind jeweils die 6 bp langen Sequenzen der -35 (blauer Pfeil) und -10 Region (gelber Pfeil) sowie rechts neben der -10 Region der Abstand dieser in [bp] zum Gen der 16S rRNA dargestellt. Die verschiedenen rRNA-Operons (A-G) sind alphabetisch von oben nach unten sortiert. Die Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) sind in den Sequenzen durch unterschiedliche Graustufen kenntlich gemacht.

Um den Einfluss des Abstandes zwischen *pig*-Gencluster und rRNA-Operon-Promotor in Bezug auf die bereits in **3.2.2** bestimmte Prodigiosin-Produktion (vgl. **Abb. 3.10**) analysieren zu können, wurde der genaue Abstand zwischen der -10 Region von Promotor 1 und dem Startcodon von *pigA*, dem ersten Gen im *pig*-Gencluster, anhand der vorliegenden Daten aus Insertionsort- (**Abb. 3.13**) und Promotor-Bestimmung (**Abb. 3.14**) für die einzelnen Stämme ermittelt. Die bestimmten Promotorabstände (**Abb. 3.15**, türkise Säulen, linke Vertikalachse) wurden für jeden Stamm zusammen mit der jeweiligen Prodigiosin-Produktion (**Abb. 3.15**, rote Säulen, rechte Vertikalachse) aufgetragen. Die Stämme sind dabei entsprechend des Integrations-rRNA-Operons gruppiert (**Abb. 3.15** A-G). Innerhalb dieser einzelnen Gruppen sind die Stämme nach dem Abstand vom Promotor absteigend von links nach rechts sortiert.

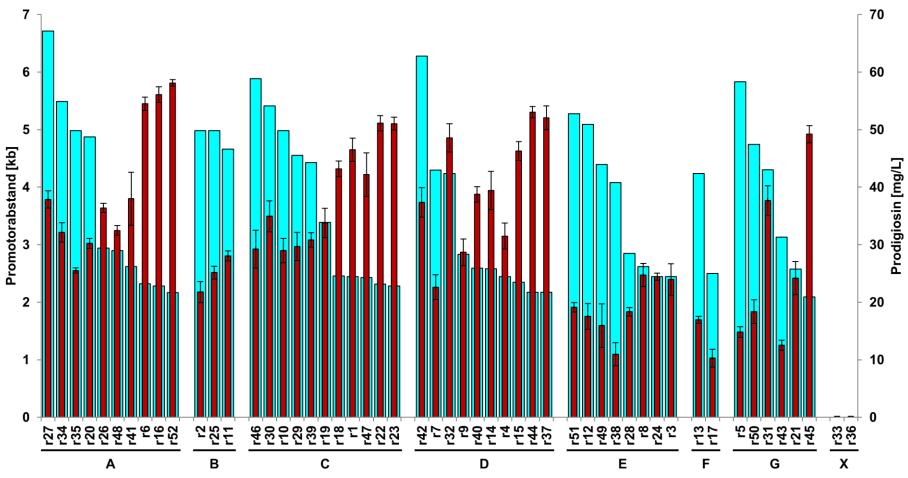


Abb. 3.15: Vergleich Promotorabstand und Prodigiosin-Produktion innerhalb der rRNA-Operons

Für die einzelnen Stämme sind jeweils zwei Säulen dargestellt, die türkisen Säulen geben den jeweiligen Abstand der *pig*-Gene zum rRNA-Operon-Promotor in [kb] an (linke Vertikalachse), die roten Säulen entsprechen den schon in **Abb. 3.10** gezeigten Prodigiosin-Produktionstitern in [mg/L] (rechte Vertikalachse). Die Stämme sind entsprechend der rRNA-Operons gruppiert (**A-G**), in die das TREX-*pig*-Transposon jeweils integriert ist. Innerhalb der einzelnen Operon-Gruppen sind die Stämme nach dem Promotorabstand absteigend von links nach rechts sortiert. Die roten Säulen entsprechen jeweils dem Mittelwert einer biologischen Dreifachbestimmung, hierbei ist jeweils die Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

Wird zunächst die Korrelation zwischen Promotorabstand und Prodigiosin-Produktion innerhalb der einzelnen Operons betrachtet, ist durch die absteigende Sortierung nach Promotorabstand bei den meisten Operons ein klarer Trend erkennbar. In den Operons A, C, D, E und G sinkt die Prodigiosin-Produktion mit steigendem Abstand zum Promotor (vgl. Abb. 3.15 A, C, D und E). Auch in Operon B ist dieser Trend erkennbar, hier liegen jedoch in allen drei Stämmen die Integrationsorte weit vom Promotor entfernt und unterscheiden sich in ihrem jeweiligen Abstand zum Promotor nur gering (Abb. 3.15 B). Die beiden Stämme r13 und r17, welche eine Transposon-Integration in Operon F aufweisen, zeigen diesen Trend jedoch nicht (Abb. 3.15 E). Allerdings ist hierbei zu beachten, dass Operon B und F in der analysierten Stichprobe mit drei respektive zwei Treffern im Vergleich zu den anderen Operons unterrepräsentiert sind (vgl. Abb. 3.13). Für eine Verifizierung der Hypothese, dass ein kurzer Abstand zum Promotor die Prodigiosin-Produktion erhöht, wäre in Bezug auf diese beiden Operons ein größerer Stichprobenumfang nötig.

Innerhalb der einzelnen Lokalisationsgruppen gibt es nur wenige von diesem grundsätzlichen Trend abweichende Stämme. Der Stamm r32 mit Integation in Operon D weist mit  $49 \pm 2$  mg/L eine deutlich höhere Produktionsleistung auf als der Stamm r7 mit Integration im gleichen Operon in ungefähr gleichem Abstand zum Promotor, welcher nur  $23 \pm 3$  mg/L produziert (vgl. **Abb. 3.15** D). In der Operon G-Gruppe weicht r31 aufgrund einer im Verhältnis zum Abstand hohen Produktion vom Trend ab (vgl. **Abb. 3.15** G). Weiterhin ist zu beobachten, dass die beiden Stämme r27 (Operon A;  $38 \pm 1$  mg/L; 6716 bp) und r42 (Operon D;  $37 \pm 2$  mg/L; 6280 bp), deren TREX-*pig*-Transposons insgesamt am weitesten vom Promotor entfernt integriert worden sind, höhere Prodigiosin-Produktionen aufweisen als verschiedene näher am Promotor gelegene Stämme wie zum Beispiel r10 (Operon C;  $29 \pm 3$  mg/L; 4982 bp) oder r35 (Operon A;  $26 \pm 2$  mg/L; 4983 bp). Diese Abweichung vom allgemein vorherrschenden Trend könnte z.B. durch eine Mutation, welche die Prodigiosin-Produktion beeinflusst, hervorgerufen worden sein.

Werden nur die Gruppen der einzelnen Operons in Bezug auf die Prodigiosin-Produktion miteinander verglichen, so ist erkennbar, dass sich diese nicht nur in der Anzahl an integrierten Transposons (vgl. auch **Abb. 3.13**), sondern auch in der durchschnittlich erzielten Produktion unterscheiden. Im Mittel erreichten die Stämme, deren TREX-*pig*-Transposons in die Operons A, C und D integriert wurden, jeweils einen Prodigiosintiter von etwa 40 mg/L. Diese sind damit deutlich höher als die Titer, die bei Stämmen mit einer

Integration in andere Operons erreicht wurden. In Operon B und G wurden im Mittel Titer von 25 mg/L erreicht, in Operon E von 20 mg/L und in Operon F sogar nur von 14 mg/L. Werden in diese Beobachtungen jetzt die Promotorabstände einbezogen und pro Operon ein Stamm mit jeweils etwa gleichem Abstand zum Promotor betrachtet, verdeutlicht sich dieser Trend. Die Stämme r6 (Operon A; 54 ± mg/L; 2322 bp), r1 (Operon C; 46 ± 4 mg/L; 2477 bp) und r15 (Operon D; 46 ± 2 mg/L; 2347 bp) produzieren deutlich mehr, als die Stämme r24 (Operon E 24 ± 1 mg/L; 2447 bp), r17 (Operon F; 10 ± 1 mg/L; 2502 bp) und r21 (Operon G; 24 ± 1 mg/L; 2577 bp), obwohl die *pig*-Gene dieser sechs Stämme mit 2,3-2,6 kb etwa gleich weit vom jeweiligen rRNA-Operon-Promotor entfernt sind. Für Operon B gibt es im betrachteten Abstandsbereich kein integriertes TREX-*pig*-Transposon, sodass ein Vergleich nicht möglich ist. Die so ausgewerteten Daten legen nahe, dass die sieben verschiedenen rRNA-Operons einer unterschiedlich starken Expression durch die verschiedenen Promotoren unterliegen und somit die stark variierenden Prodigiosin-Produktionsausbeuten der verschiedenen Stämme auf Expressionsebene verursacht werden könnten.

Zusammengenommen konnte beobachtet werden, dass die Integration des TREX-*pi*g-Transposons in die verschiedenen rRNA-Operons die Prodigiosin-Produktionsleistung beinflusst. Des Weiteren ist eindeutig erkennbar, dass sich ein kurzer Abstand zum rRNA-Operon-Promotor positiv auf die Prodigiosin-Produktion auswirkt.

### 3.2.5 Untersuchung der Transkriptmenge der *pig*-Gene in Bezug auf die Prodigiosin-Produktion

Wie in **3.2.4** beschrieben, scheint die Prodigiosin-Produktionsleistung der T7RP-unabhängigen Produktionsstämme mit ihrem Insertionsort innerhalb der sieben rRNA-Operons zu korrelieren. Zum einen ergeben sich Unterschiede aus der Integration des TREX-pig-Transposons in unterschiedlichen rRNA-Operons, zum anderen resultiert ein kürzerer Abstand der pig-Gene zum rRNA-Operon-Promotor in einer höheren Prodigiosin-Produktionsleistung. Ein möglicher Grund für diese Unterschiede in der Prodigiosin-Produktion könnte die unterschiedlich starke Expression des pig-Genclusters durch die verschiedenen rRNA-Operon-Promotoren sein.

Um dies zu überprüfen, wurden die *pig*-Transkriptmengen ausgewählter Stämme untersucht. Die Stämme wurden so gewählt, dass beide Effekte auf Transkriptebene

betrachtet werden können: (1) die Auswirkung unterschiedlicher Abstände zum jeweiligen Promoter und (2) die Expressionsstärke der verschiedenen rRNA-Operon-Promotoren. Zur Untersuchung der ersten Fragestellung wurden die Stämme r41 und r35 ausgewählt. In beiden Stämmen ist das TREX-pig-Transposon in rRNA-Operon A integriert, bei r41 ist der Abstand der pig-Gene zum rRNA-Operon-Promotor mit 2,6 kb aber nur etwa halb so groß wie bei r35, bei dem der Abstand 5 kb beträgt (Abb. 3.15 A). Zur Untersuchung der Expressionsstärke der verschiedenen rRNA-Operon-Promotoren wurden Stämme ausgewählt, deren pig-Gene in der DNA der 16S rRNA unterschiedlicher Operons, aber mit ähnlichem Abstand (2,4-2,6 kb) zum jeweiligen Promotor liegen: r41 (Operon A), r1 (Operon C), r4 (Operon D), r24 (Operon E), r17 (Operon F) und r21 (Operon G). Da in keinem Stamm Operon B mit diesem Abstand zum Promotor getroffen wurde, erfolgt der Vergleich mit diesem Operon durch Stämme mit einem weiteren Abstand: r25 (Operon B) und r35 (Operon A). In diesen beiden Stämmen weisen die pig-Gene einen Abstand von 5 kb zum jeweiligen rRNA-Operon-Promotor auf. Zur Messung der Transkriptmengen wurden quantitative real-time PCRs entsprechend der Beschreibung in 2.12.14.3 durchgeführt. Für alle Stämme wurden die Expressionstärken der Gene pigA und pigN, dem ersten und dem letzten Gen im *pig*-Gencluster, untersucht.

Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der absoluten Transkriptmengen (Kopienzahl/ng Gesamt-RNA). Zur Quantifizierung wurde anhand der gemessenen CT-Werte die Transkriptmenge durch die Anwendung einer Standardgeraden (2.12.14.4) ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.16 dargestellt. Für jeden Stamm sind hier jeweils die Anzahl der Transkriptkopien pro in der reversen Transkription eingesetztem ng RNA (türkise Säulen, linke Vertikalachse) und der erreichte Prodigiosintitern in mg/L (rote Säulen, rechte Vertikalachse) gezeigt.

Wenn die unterschiedlichen Insertionsorte über einen Einfluss auf die *pig*-Expression die unterschiedlichen Produktionsleistungen bedingen würden, wäre eine positive Korrelation der Produktionstiter mit den Transkriptmengen zu erwarten. Im Vergleich von r35 und r41 würde entsprechend dieser Hypothese für den mehr produzierenden und näher am rRNA-Operon-Promotor liegenden Stamm r41 auch eine größere Transkriptmenge erwartet werden. Dies ist für *pigA* aufgrund der hohen Standardabweichung nicht eindeutig nachweisbar, es scheint jedoch, dass bei r41 mehr Transkript gebildet wird. Für *pigN* ist die Transkriptmenge bei r41 allerdings eindeutig höher als bei r35 (**Abb. 3.16** A).

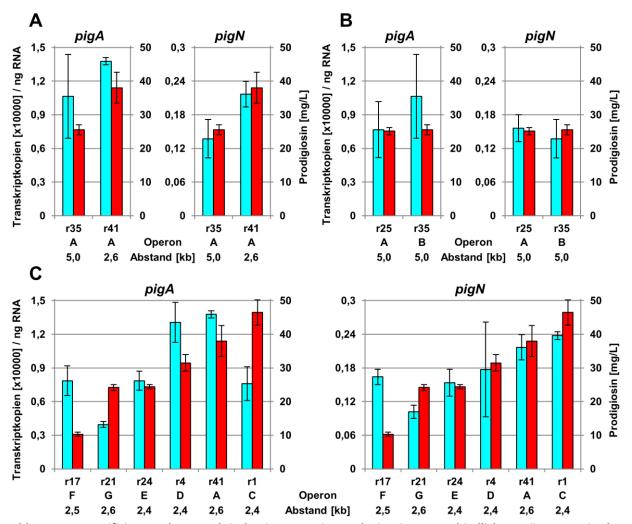


Abb. 3.16: Quantifizierung der Transkriptkopien von pigA und pigN in unterschiedlichen Stämmen mittels real-time PCR

**A-C:** Für jeden Stamm sind zwei Säulen aufgetragen, die türkise Säule entspricht der Anzahl an Transkriptkopien pro in der reversen Transkription eingesetzten Menge (ng) RNA (linke Vertikalachse) und die rote Säule der Prodigiosin-Produktion als Titer in [mg/L] (rechte Vertikalachse). Für jeden Stamm ist unter den Säulen das Operon (A-G), in welches das jeweilige TREX-*pig*-Transposon integriert ist, sowie der Abstand zum Promotor des jeweiligen Operons in [kb] angegeben. Die Säulen entsprechen jeweils dem Mittelwert einer biologischen Dreifachbestimmung, hierbei ist jeweils die Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

Beim Vergleich der durch r25 und r35 repräsentierten Operons A und B ist, in Anbetracht der Standardabweichung, weder bei pigA noch bei pigN ein Unterschied in der Transkriptmenge erkennbar (**Abb. 3.16** B). Die Prodigiosin-Produktion der beiden Stämme ist mit jeweils  $25 \pm 1$  mg/L und  $26 \pm 1$  mg/L ebenfalls fast gleich. Zusammengenommen könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass sich Operon B was die Produktion betrifft ähnlich wie Operon A verhält und bei einer Integration näher am Promotor ebenfalls höhere Prodigiosin-Produktionsausbeuten in diesem Operon erreicht werden könnten.

Bei Betrachtung der Transkriptmengen von *pigA* in Relation zur Prodigiosin-Produktion der in **Abb. 3.16** C aufgetragenen Stämme mit Integrationsstellen, die in unterschiedlichen

Operons, aber in etwa gleichem Abstand zum Promotor liegen (2,4-2,6 kb), ist kein klarer Trend erkennbar. Der Stamm r1 (Operon C) weist trotz der mit 46 ± 4 mg/L höchsten Produktionsausbeute eine mit den Stämmen r24 (Operon E; 24 ± 1 mg/L) und r17 (Operon F; 10 ± 1 mg/L) vergleichbare pigA Transkriptmenge auf (vgl. Abb. 3.16 C). Weiterhin ist die Produktion des Stammes r21 (Operon G; 24 ± 1 mg/L) auf dem gleichen Niveau wie bei r24 (Operon E; 24 ± 1 mg/L), die Transkripmenge ist jedoch bei r24 um Faktor 2 höher als bei r21. Für die pigN Transkriptmengen ist zumindest ein schwacher Trend erkennbar. So weist r1 als Stamm mit der höchsten Produktion auch die höchste Transkriptmenge auf und r21 und r41 fügen sich ebenfalls in diesen Trend ein (vgl. Abb. 3.16 C). Interessanterweise zeigte r17 (Operon F; 10 ± 1 mg/L) wieder eine vergleichsweise hohe Transkriptmenge für seine niedrige Produktionsausbeute. Diese lag etwa auf dem Niveau der Stämme r24 (Operon E;  $24 \pm 1 \text{ mg/L}$ ) und r4 (Operon D;  $32 \pm 2 \text{ mg/L}$ ), deren Produktionsausbeuten aber um den Faktor 2,4 respektive 3,2 höher sind (vgl. Abb. 3.16 C). Im Fall von r17 ist es wahrscheinlich, dass die niedrige Ausbeute nicht auf die Menge der Transkriptkopien der pig-Gene zurückzuführen ist. Denkbare Gründe für die niedrige Produktionsausbeute in diesem Stamm wären Mutationen innerhalb der pig-Gene oder durch Selektionsdruck entstandene Mutationen im Genom von P. putida KT2440, die in einem Zusammenhang mit der Biosynthese von Prodigiosin stehen. Anhand der hier erhobenen Daten konnte noch nicht eindeutig bestätigt werden, dass die unterschiedlichen Operons sich aufgrund unterschiedlicher Expressionsstärken in ihrer Prodigiosin-Produktion unterscheiden. Auffällig ist, dass die Transkriptmenge von pigN in jedem getesteten Stamm im Vergleich zu der von pigA deutlich abfällt (vgl. Abb. 3.16), dies war aufgrund der Größe des pig-Genclusters (21 kb) aber auch zu erwarten.

Zusammengenommen konnte durch die hier erhobenen qPCR Daten nur ein möglicher Zusammenhang von produzierten Prodigiosinmengen und unterschiedlicher Expressionsstärken der *pig*-Gencluster durch die Integration in unterschiedliche rRNA-Operons gezeigt werden. Nachgewiesen werden konnte, dass auch bei einer Expression unter rRNA-Operon-Promotorkontrolle die Transkriptmenge von *pigA* zu *pigN* bei allen gemessenen Stämmen stark abnimmt und dass die *pigN* Transkripmenge scheinbar einen stärkeren Bezug zur Produktionsmenge zeigt als *pigA*.

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit der für die konstitutive Expression des *pig*-Genclusters verantwortliche Integrationsort bestimmt und eingehend charakterisiert. In 96 % der in dieser Arbeit erzeugten T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämme war das TREX-*pig*-Transposon in eines der sieben rRNA-Operons von *P. putida* KT2440 integriert worden. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass sich die Integration in unterschiedliche rRNA-Operons auf die Produktionsleistung der Stämme auswirkt und dass ein kurzer Abstand des rRNA-Operon-Promotors zu den *pig*-Genen einen positiven Effekt auf die Produktion hat.

# 3.3 Erzeugung natürlicher und artifizieller Prodigiosin-Derivate mittels Mutasynthese

aufgrund seiner vielen wertvollen Prodigiosin Eigenschaften von großem pharmazeutischen Interesse, z.B. als potentielles Arzneimittel gegen verschiedene Krebsarten oder als Antibiotikum (vgl. 1.2). Verschiedene natürlich vorkommende Prodiginine, wie Undecylprodigiosin, welches z.B. von Streptomyces coelicolor A3(2) gebildet wird (Tsao et al., 1985), weisen in Bezug auf die apoptotische Wirkung in verschiedenen Krebszellinien mitunter ein von Prodigiosin abweichendes Wirkungsspektrum auf (Williamson et al., 2007). Obatoclax, ein synthetisch erzeugtes Prodigiosin-Derivat, befindet sich derzeit aufgrund seiner vielversprechenden Wirkung als Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) Inhibitor zur Einleitung von Apoptose in Krebszellen in klinischen Studien (Phase I und II) (Goy et al., 2014; Schimmer et al., 2008). Bcl-2 spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Apoptose, eine Inhibition leitet diese verstärkt ein, wohingegen eine Überproduktion und das damit verbundene Ausbleiben der Apoptose zu Krebs führen kann (Adams und Cory, 1998; Chao und Korsmeyer, 1998). Die Erzeugung neuer Prodigiosin-Derivate ist somit eine vielversprechende Quelle für neue pharmazeutisch relevante Substanzen. Neben einer chemischen Totalsynthese ist die sogenannte Mutasynthese eine Möglichkeit, Zugang zu neuen Derivaten zu schaffen. Der Begriff wurde bereits 1977 von Rinehart für eine Strategie geprägt, deren grundsätzliches Prinzip sich bis heute nicht verändert hat. In ein Gen, dessen Genprodukt ein Bestandteil des zu manipulierenden Biosyntheseweges ist, wird gezielt eine Mutation eingebracht, sodass der Biosyntheseweg an dieser Stelle angehalten wird und die bis dahin gebildeten Intermediate akkumulieren. Diesem Mutanten-Stamm wird ein in der Regel verändertes, chemisch synthetisiertes Derivat des Intermediates, das nicht mehr gebildet werden kann, das sogenannte Mutasynthon, in vivo zugeführt. Wenn dieses Mutasynthon von den nachfolgenden Enzymen des Biosyntheseweges als Substrat akzeptiert wird, kann auf diese Art ein artifizielles Intermediat in das chemische Gerüst des Sekundärmetaboliten eingebaut werden, wodurch ein alternatives Produkt mit neuen (pharmakologischen) Eigenschaften entstehen kann (Kennedy, 2008; Sahner et al., 2015; Weist und Süssmuth, 2005). Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung neuer Derivate ist die Semisynthese. Hierbei werden Naturstoffe, dies können sowohl Endprodukte einer Biosynthese als auch deren Intermediate sein, aus dem jeweiligen Organismus extrahiert

und in einer chemischen Synthese weiter umgesetzt. Auch eine Kombination von Semi- und Mutasynthese kann zur Erzeugung einer großen Derivatvielfalt eingesetzt werden (Eichner et al., 2012; Kennedy, 2008).

Die Möglichkeit auf Basis des Prodigiosin-Biosyntheseweges durch Mutasynthese Prodiginin-Derivate zu erzeugen, wurde bereits in verschiedenen Studien diskutiert (Stankovic et al., 2014; Williamson et al., 2007), jedoch noch nicht weiter untersucht. Der Aufbau des Prodigiosin-Biosyntheseweges ist besonders interessant für den Mutasynthese-Ansatz. Zum einen ist der Aufbau zweigeteilt, wobei die Biosynthesen der beiden Intermediate MAP und MBC unabhängig voneinander und unter der Nutzung unterschiedlicher Enzyme ablaufen (vgl. Abb. 1.2 B). Die Biosynthesewege von MAP und MBC könnten also unabhängig von einander durch gezielt eingebrachte Mutationen ausgeschaltet werden. Zum anderen weist das Enzym, welches die beiden Intermediate MAP und MBC zu Prodigiosin kondensiert, eine geringe Substratspezifität auf (Chawrai et al., 2008), wodurch prinzipiell ein breites Spektrum an MAP- und/oder MBC-Derivaten akzeptiert werden sollte. Auch für die Semisynthese bietet der Biosyntheseweg Potential, da durch das Ausschalten der MAP- oder MBC-Biosynthese Zugang zu der jeweils anderen Substanz geschaffen werden kann, die in chemischen Synthesen wiederum zu neuen Produkten umgesetzt werden können.

In dieser Arbeit sollte durch eine gezielte teilweise Deletion des *pigD* Gens ein in der Biosynthese von MAP defizienter Mutanten-Stamm erzeugt werden. Mit diesem Stamm könnte zum einen überprüft werden, ob sich der Prodigiosin-Biosyntheseweg für eine Mutasynthese-Anwendung eignet (Abb. 3.17 A) und zum anderen könnte aus einem solchen Stamm MBC extrahiert werden, um semisynthetische Anwendungen zu ermöglichen (Abb. 3.17 B). Die Wahl, den MAP Weg durch Mutation auszuschalten, erfolgte aufgrund der leichteren und kostengünstigeren chemischen Totalsynthese von MAP und seinen Derivaten im Vergleich mit MBC sowie im Besonderen der Modifizierbarkeit an zwei Positionen (C2 und C3) im Pyrrolring während der Synthese, was die Erzeugung einer großen Vielfalt von MAP-Derivaten ermöglicht. Zusätzlich wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt, dass zu PigC homologe Enzyme aus anderen Prodiginin-Biosynthesewegen andere Monopyrrole, speziell solche mit Modifikationen an der C2- oder C3-Position, als Substrat akzeptieren (Hu et al., 2016; Williamson et al., 2006), dies spricht für eine gute Akzeptanz von MAP-Derivaten in der Kondensation durch PigC.

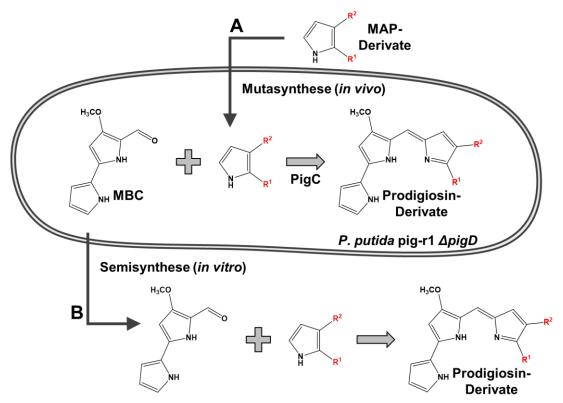


Abb. 3.17: Möglichkeiten zur Erzeugung von Prodigiosin-Derivaten in einem MAP defizienten Stamm mittels Muta- und Semisynthese

**A:** Mutasynthese durch Zuführung von chemisch erzeugten MAP-Derivaten zu einem in der Biosynthese von MAP defizienten Stamm, in welchem *in vivo* die Pyrrol-Vorstufen durch PigC zu einem Prodigiosin-Derivat kondensiert werden. **B:** Semisynthese mit aus einem in der MAP-Biosynthese defizienten Stamm extrahiertem MBC, welches zusammen mit synthetischen MAP-Derivaten *in vitro* zu Prodigiosin-Derivaten umgesetzt werden kann. R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> stellen die möglichen Positionen (C2- und C3) für eine Modifikation von MAP durch chemische Synthese zur Erzeugung von MAP-Derivaten, dar.

Dieses Projekt ist eine komplexe Herausforderung, die Experise im Bereich der Molekulargenetik, Mikrobiologie und Synthesechemie erfordert und wurde somit im Rahmen einer interdisziplinären Kooperation mit dem Institut für Bioorganische Chemie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) bearbeitet. Andreas Sebastian Klein führte hierbei die Synthese unterschiedlicher MAP-Derivate sowie die späteren Mutasynthesen durch.

### 3.3.1 Erzeugung eines in der Biosynthese von MAP defizienten Stammes

Die Erzeugung des MAP defizienten Mutanten-Stammes erfolgte durch den Austausch eines Teilstücks des pigD-Gens im TREX-pig-Transposon des Prodigiosin-Produktionsstammes P.~putida~pig-r1 (3.1.1) mit einer promotor- und terminatorlosen Variante des Streptomycin-Resistenzgens aadA~durch~homologe~Rekombination. Auf diese Weise sollte das pigD-Gen funktionell deletiert werden und der  $\Delta pigD$  Stamm durch konstitutive Koexpression des

aadA-Gens eine Streptomycin-Resistenz als geeigeten Selektionsmarker aufweisen. Hierzu wurde der Vektor pSUP202-pigCaadApigD konstruiert.

Das Mutagense-Plasmid wurde auf Basis von pSUP202 (Simon et al., 1983), einem Plasmid das in P. putida KT2440 nicht repliziert werden kann (van der Meer et al., 1991; Simon et al., 1986), in zwei Schritten erzeugt. Zunächst wurde ein 4,6 kb großes Eco72I Fragment aus pPIG (Loeschcke et al., 2013), bestehend aus Teilen der Gene pigC und pigD, mit einem 6,5 kb großen Scal Fragment von pSUP202 ligiert (2.12.12). Im zweiten Schritt wurde ein 0,3 kb großes MauBI/AsiSI Fragment aus pigD durch Hydrolyse entfernt und durch Ligation des verbleibenden Vektorfragments mit einem 0,9 kb großen MauBI/AsiSI Fragment des Streptomycin-Resistenzgens aadA ersetzt. Das aadA-Gen wurde durch PCR mit den Oligonukleotidprimern AD49 und AD50 erzeugt, hierbei fungierte das Plasmid pHP45 $\Omega$  als Template. Die Oligonukleotidprimer wurden dabei so gewählt, dass das aadA-Gen bei der PCR ohne Promotor- und Terminator-Sequenz jedoch mit Ribosomenbindestelle amplifiziert wird. Im fertigen Konstrukt sollte das aadA-Gen demnach am 5'-Ende von einer 2,7 kb pigCD-Sequenz, sowie am 3'-Ende von einer 1,5 kb pigD-Sequenz flankiert sein, über die die homologe Rekombination mit den chromosomal integrierten pig-Genen stattfinden sollte. Die korrekte Sequenz des finalen pSUP202-pigCaadApigD Mutagenese-Plasmids wurde durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden AD44, AD48, AD61 und AD62 verifiziert. Eine Übersicht der Anwendung des Mutagenese-Plasmids pSUP202-pigCaadApigD zur Erzeugung des MAP defizienten Mutanten-Stammes ist in **Abb. 3.18** dargestellt.

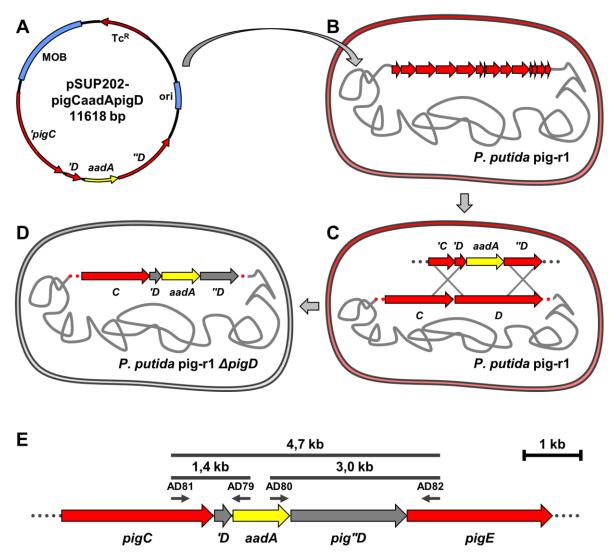


Abb. 3.18: Darstellung der Erzeugung des MAP defizienten Mutanten-Stammes *P. putida* pig-r1 Δ*pigD*A: Mutagenese-Plasmid pSUP202-pigCaadApigD. B: Übertragung des Mutagenese-Plasmids durch Konjugation in *P. putida* pig-r1. C: Einbau der *pigCaadApigD* Mutagenese-Kassette durch homologe Rekombination in das *pig*-Gencluster im Genom des Stammes *P. putida* pig-r1. D: MAP defizienter Mutanten-Stamm *P. putida* pig-r1 Δ*pigD*. E: Anordnung der Oligonukleotidprimer AD79-AD82 zur Kontrolle der korrekten Deletion von *pigD* durch Integration von *aadA* im Genom von *P. putida* pig-r1 durch Kolonie-PCR.

Zunächst wurde das Mutagenese-Plasmid pSUP202-pigCaadApigD (**Abb. 3.18** A) über Konjugation von *E. coli* S17-1 (**2.12.3**) in den Prodigiosin-Produktionsstamm *P. putida* pig-r1 übertragen (**Abb. 3.18** B). In *P. putida* pig-r1 wurde die *pigCaadApigD* Mutagense-Kassette durch homologe Rekombination in das im Genom integrierte *pig*-Gencluster eingebaut (**Abb. 3.18** C). Da die *pigCaadApigD* Mutagense-Kassette ein promotorloses *aadA* Streptomycin-Resistenzgen beinhaltet, welches nach der homologen Rekombination ins *pig*-Gencluster in der gleichen Orientierung vorliegt wie die übrigen *pig*-Gene, wird es durch den gleichen nativen Wirtspromotor wie auch das *pig*-Gencluster konstitutiv transkribiert. Durch diese Planung konnte zur Bestätigung eines korrekten Einbaus direkt nach der Konjugation des

Plasmids auf Streptomycin selektiert werden. Zusätzlich wurden potentiell MAP defiziente Mutanten-Stämme über ihren durch die unterbrochene Prodigiosin-Biosynthese nicht mehr roten Phänotyp identifiziert (**Abb. 3.18** D). Derartig identifizierte potentielle *P. putida* pig-r1 Δ*pigD* Mutantenstämme wurden durch Kolonie-PCR (**2.12.7**) mit verschiedenen Oligonukleotid-Primerpaaren auf die korrekte Integration von *aadA* in *pigD* hin überprüft. Hierfür wurden die Oligonukleotide AD79, AD80, AD81 und AD82 genutzt (**Abb. 3.18** E). Durch die Anordnung der Primer AD79 und AD80 innerhalb von *aadA*, von AD81 in *pigC* sowie von AD82 in *pigE* außerhalb der durch homologe Rekombination integrierten *pigCaadApigD* Mutagense-Kassette sollte neben der Position und Orientierung von *aadA* auch die erfolgreiche Übertragung ins Genom verifiziert werden. Durch den Erhalt der entsprechend korrekten PCR-Produkte von 4,7; 1,4 und 3,0 kb (vgl. **Abb. 3.18** E) konnte dies verifiziert werden. In einer anschließenden von Andreas Sebastian Klein durchgeführten HPLC-MS-Analyse konnte in Extrakten des Stammes *P. putida* pig-r1 Δ*pigD*, wie erwartet nur noch die Prodigiosinvorstufe MBC nachgewiesen werden.

Somit wurde erfolgreich der in der Biosynthese von MAP defiziente Mutanten-Stamm P. putida pig-r1  $\Delta pigD$  erzeugt, welcher nun für Muta- oder Semisynthese genutzt werden konnte.

### 3.3.2 Anwendung der Mutasynthese im Rahmen der Dissertation von Andreas Sebastian Klein

Dieses Projekt erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Andreas Sebastian Klein. Dieser führte mit dem in dieser Arbeit erzeugten Mutanten-Stamm *P. putida* pig-r1 Δ*pigD* im Rahmen seiner Dissertation am Institut für Institut für Bioorganische Chemie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) erfolgreich Mutasynthese-Experimente mit verschiedenen von ihm chemisch synthetisierten MAP-Derivaten durch. Für die Mutasynthese-Anwendung wurden die MAP-Derivate während der Kultivierung von *P. putida* pig-r1 in DMSO gelöst und ins Kulturmedium gegeben. Nach der Kultivierung wurden die Zellen geerntet und die Extrakte dahingehend untersucht, ob die erwarteten Prodigiosin-Deriviate vorliegen. Im Folgenden wird eine kurze Übersicht der von Andreas Sebastian Klein erzielten Ergebnisse dargestellt. Insgesamt konnten 20 verschiedene MAP-Derivate mit unterschiedlichen Seitenketten an der C2- (R¹) und C3-Position (R²) des MAP-Pyrrolrings (vgl. **Tab. 3.3**) sowie MAP in seiner nativen Form erfolgreich in chemischer Totalsynthese hergestellt werden. Eine Übersicht der

erzeugten Derivate ist in **Tab. 3.3** dargestellt. Alle erzeugten MAP-Derivate wurden für die Mutasynthese mit dem Mutanten-Stamm *P putida* pig-r1 Δ*pigD* eingesetzt. Die Zellextrakte von sechs getesteten Derivaten sind in **Abb. 3.19** exemplarisch dargestellt, wobei das native Substrat MAP (#5) als Referenz diente. Bereits an der roten Farbe der Zellextrakte ist erkennbar, welche MAP-Derivate von PigC katalytisch umgesetzt werden konnten, anhand dieser Rotfärbung im Vergleich zur MAP-Referenz wurde die in **Tab. 3.3** dargestellte Substrat Akzeptanz klassifiziert. Zusätzlich wurde die korrekte Synthese der Prodigiosin-Derivate durch eine HPLC-MS Messung überprüft. Insgesamt konnten neben dem nativen Substrat MAP 13 der 20 MAP-Derivate von PigC katalytisch umgesetzt werden. Für sechs davon zeigte PigC eine mit der MAP-Referenz vergleichbar gute Substrat Akzeptanz (vgl. **Tab. 3.3**).

Tab. 3.3: Übersicht über synthetisch erzeugten MAP-Derivate und ihrer Funktionalität in der Mutasynthese

MAP-Derivate	NH NH	Mutasynthese	
Synthesenummer	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Substrat Akzeptanz
1	-CH <sub>3</sub>	-H	-
2	-CH <sub>3</sub>	-CH₃	+
3	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	+++
4	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	+++
5	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	+++
6	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	+++
7	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	+++
8	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	+
9	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	-
10	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	+
11	-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	-
12	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	+++
13	-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	-
14	-H	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-
15	-H	-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-
16	-H	-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	+
17	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	++
18	-H	-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	+
19	-H	-C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	-
20	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> =CH <sub>2</sub>	++
21	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> =CH <sub>2</sub>	+++

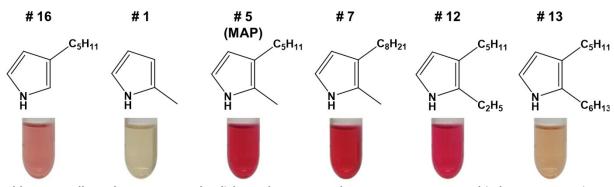


Abb. 3.19: Zellextrakte zur Veranschaulichung der Mutasynthese-Umsetzungen verschiedener MAP-Derivate in *P. putida* pig-r1 ΔpigD

Die Nummern (#) entsprechen den Synthesenummern aus Tab. 3.3.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass PigC für die Kondensation von MBC und MAP-Derivaten eine gewisse Toleranz sowohl für die Kettenlänge als auch die Art der C-Kette an der R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> Position aufweist (vgl. **Tab. 3.3** und **Abb. 3.19**).

Es wurde gezeigt, dass mit *P. putida* pig-r1 Δ*pigD* ein für die Mutasynthese im Prodigiosin-Biosyntheseweg einsetzbarer, MAP defizienter Mutanten-Stamm erzeugt werden konnte. Zusätzlich konnte Andreas Sebastian Klein eine Vielzahl von MAP-Derivaten synthetisieren und erfolgreich in der Mutasynthese einsetzen. Dies belegt, dass die Mutasynthese eine vielversprechende Methode für die Erzeugung von Prodigiosin-Derviaten ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *P. putida* KT2440 einen vielversprechenden Plattformorganismus für die Mutasynthese von Prodigininen darstellt.

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit mit *P. putida* pig-r1 *ApigD* ein MAP defizienter Mutanten-Stamm erzeugt. Dieser Stamm konnte von Andreas Sebastian Klein (Institut für Bioorganische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) erfolgreich für die Mutasynthese verschiedener Prodigiosin-Derivate eingesetzt werden.

Es sollte hierbei hervorgehoben werden, dass die kooperativ gewonnenen Ergebnisse eine äußerst erfolgreiche Zusammenarbeit mit dem Institut für Bioorganische Chemie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) im Rahmen des CLIB Graduiertenclusters verdeutlichen und den Wert solcher interdisziplinärer Kooperationen wiederspiegeln.

## 3.4 Weiterentwicklung des TREX-Systems für eine vielfältigere Anwendbarkeit

Das TREX-System (vgl. 1.5) wurde bereits erfolgreich zur Expression verschiedener Gencluster in unterschiedlichen Wirtsorganismen angewandt (Loeschcke, 2012; Loeschcke et al., 2013). Die funktionellen Elemente innerhalb der beiden TREX-Kassetten (vgl. Abb. 1.3 A) sind so ausgewählt, dass sie in einem breiten Wirtsspektrum zur Anwendung kommen können. Hierdurch bietet es die perfekten Voraussetzungen als screening tool, mit dem schnell geeignete Kombinationen von Wirtsorganismus und Biosyntheseweg identifiziert werden Durch Tn5-Transposition wird die Erzeugung Expressionsstämmen ermöglicht. Die randomisierte Transposition ins Wirtsgenom kann bei unidirektionalen, aus einer Transkriptionseinheit bestehenden Genclustern darüber hinaus, wie bereits in 3.1.1 und 3.2.2 beschrieben, zur Erzeugung T7RP-unabhängiger Produktionsstämme genutzt werden. Hierbei werden bedingt durch den chromosomalen Insertionslocus wirtseigene Promotoren und die wirtseigene Polymerase für die Expression des Genclusters genutzt. Das TREX-System ist somit bislang auf die Markierung von unmanipulierten, auf Plasmiden vorliegenden Genclustern ausgelegt, die durch Restriktionsendonuklease-basierte Klonierung zugängig gemacht werden können. Dies kann aus den folgenden Gründen für eine schnelle Anwendung des TREX-Systems, welche gerade in Bezug auf die Nutzung als screening tool von großer Wichtigkeit ist, hinderlich sein: (1) Aufgrund Fehlens von nutzbaren singulären Erkennungssequenzen Restriktionsendonukleasen, (2) weil das Gencluster nicht natürlicherweise in nutzbarer Form auf einem Plasmid vorliegt und erst zeitaufwendig aus dem Genom des ursprünglichen Wirtes isoliert werden muss. Eine weitere genetische Manipulation der Gencluster erweist sich als noch schwieriger. Solche Manipulationen sind jedoch wichtige methodische Vorraussetzungen für spätere Anwendungsmöglichkeiten. Beispiele hierfür sind die unidirektionale Anordnung der Gene um, wie in 3.1.1 und 3.2.2 beschrieben, Stämme erzeugen zu können, die das Gencluster unter Kontrolle eines wirtseigenen Promotors konstitutiv exprimieren, oder die Deletion einzelner Gene des Biosyntheseweges zur Ermöglichung der Mutasynthese (vgl. 3.3). Zusammengenommen erweist sich die Isolierung und Klonierung von Genclustern mit den gegebenen Möglichkeiten als sehr zeitaufwendig und hinderlich für die schnelle unkomplizierte Anwendung des TREX-Systems.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob sich das TREX-System, unter Beibehaltung seiner Eigenschaften zur Expression von Genclustern, in Bezug auf die Klonierung und Isolierung von Genclustern verbessern lässt. Daher sollte in dieser Studie evaluiert werden, ob sich das TREX-System um die Möglichkeit der Klonierung mittels homologer Rekombination (HR) in *S. cerevisiae* erweitern lässt.

#### 3.4.1 Design der yTREX-Kassetten

Anhand der in früheren Studien (Loeschcke, 2012; Loeschcke et al., 2013; Markert, 2008) sowie in dieser Studie erlangten Erfahrungen mit dem TREX-System wurde der Aufbau der beiden TREX-Kassetten für die weitere Nutzung und die neuen Nutzungsmöglichkeiten durch die HR optimiert.

Der Aufbau der neuen yeastTREX- oder kurz yTREX-Kassetten ist im Vergleich zu den bestehenden TREX-Kassetten in Abb. 3.20 dargestellt und wird im Folgenden näher beschrieben. Die in 1.5 beschriebenen Eigenschaften des TREX-Systems haben sich als erfolgreich in ihrer Anwendung herausgestellt und wurden dementsprechend beibehalten. Hierzu beinhaltet die L-yTREX-Kassette den die Konjugation des Plasmids in ein großes Wirtspektrum ermöglichenden origin of transfer (oriT) (Simon et al., 1983). Auf der R-yTREX-Kassette befindet sich das Tn5-Transposase Gen (tnp). Die Tn5-Transposase ermöglicht die ungerichtete Transposition des Transposon-Bereichs, welcher durch die beiden outside end Sequenzen (OE) begrenzt ist (Goryshin und Reznikoff, 1998). Im yTREX-System umfasst der Transposon-Bereich im Vergleich zum TREX-System (vgl. Abb. 3.20 A und B) weniger funktionelle Elemente. Auf die promotorlosen Gene zur Expressionskontrolle yfp und aphll (Km<sup>k</sup>) wurde verzichtet, da sie sich in vorherigen Studien als nicht zweckmäßig herausgestellt haben. Zusätzlich sind die Kassetten so geplant, dass das Gen der Tn5-Transposase nicht mehr innerhalb des Transpositions-Bereichs liegt. Dies soll die durch die Selbstregulation des Tn5-Transposons (Mahnke Braam et al., 1999; Reznikoff, 1993) allgemein hohe Stabilität des Transposon-Bereichs im Wirtsgenom (Herrero et al., 1990) noch weiter erhöhen. Der Transposon-Bereich enthält noch ein Tetracyclin-Resistenzgen (Tc<sup>R</sup>) in der R-yTREX-Kassette, um auf erfolgreiche Transpositionsereignisse selektieren zu können. Außerdem ermöglichen zwei T7RP-Promotorsequenzen (P<sub>T7</sub>), jeweils in der Spitze beider yTREX-Kassetten, weiterhin die Wirtspromotor-unabhängige Transkription aller Gene eines Genclusters. Durch die Fähigkeit der T7RP, bakterielle Terminatoren zu ignorieren (McAllister et al., 1981), sowie

das Vorhandensein von zwei aufeinander zugerichteten  $P_{T7}$  können so auch weiterhin Gencluster mit bidirektional angeordneten Transkriptionseinheiten in einem T7RP-bereitstellenden Expressionswirt ohne weitere Modifikationen funktionell exprimiert werden.

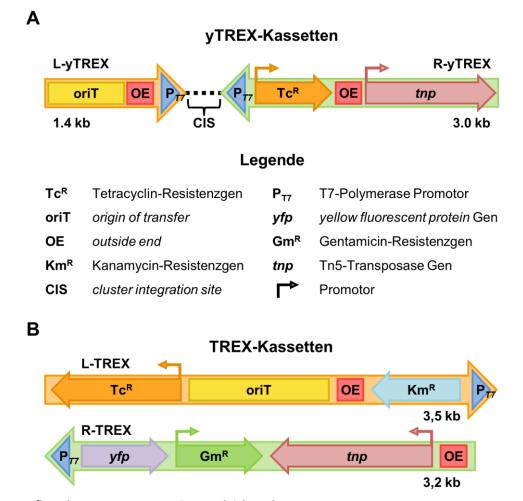


Abb. 3.20: Aufbau der yTREX-Kassetten im Vergleich zu den TREX-Kassetten

**A:** Aufbau der beiden yTREX-Kassetten (L-yTREX orange und R-yTREX grün) mit den jeweiligen funktionellen Elementen. **B:** Aufbau der beiden TREX-Kassetten (L-TREX orange und R-TREX grün) mit den jeweiligen funktionellen Elementen. Die hierbei gewählte Farbkodierung ist zur besseren Übersicht in **A** und **B** gleich. Die Legende listet alle für die funktionellen Elemente verwendeten Abkürzungen auf.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Systemen ist die grundsätzliche Anordnung der beiden Kassetten. Im TREX-System liegen sie auf dem pIC20H-RL Plasmid (vgl. **Abb. 1.3** B) nebeneinander, mit in entgegengesetzte Richtungen weisenden P<sub>T7</sub> vor, dies ermöglicht eine leichtere Restriktionsendonuklease-basierte Klonierung zur Markierung eines Genclusters (Loeschcke, 2012; Loeschcke et al., 2013; Markert, 2008). Im yTREX-System hingegen liegen die T7-Promotoren einander zugewandt vor. Hierbei flankieren sie ein zusätzliches funktionelles Element, die *cluster integration site* (CIS). Diese besteht aus einer

Erkennungssequenz für die Homing-Endonuklease I-*Sce*I zwischen zwei jeweils 40 bp langen DNA-Sequenzen, welche als homologe Bereiche (HB) für den Einbau des zu exprimierenden Genclusters durch HR gedacht sind. Die CIS ist wie jedes andere funktionelle Element des yTREX-Systems so geplant, dass sie bei Bedarf durch HR ausgetauscht und somit an die Anforderungen für die Integration beliebiger Gencluster angepasst werden kann. Dies kann z.B. erforderlich sein, wenn ein anderer Selektionsmarker als Tetracyclin benutzt werden muss oder statt der P<sub>T7</sub> andere Promotorsequenzen verwendet werden sollen.

Für eine solche HR innerhalb der yTREX-Kassetten wurden zusätzlich kurze (40-80 bp) Sequenzen nichtkodierender DNA zwischen den funktionellen Elementen integriert, die bei Bedarf den Austausch der einzelnen funktionellen Elemente durch HR ermöglichen. Um einen spezifischen Austausch der funktionellen Elemente zu gewährleisten, wurden diese Bereiche so geplant, dass sie keine Sequenzähnlichkeiten zu anderen Sequenzen innerhalb der yTREX-Kassetten sowie im yTREX shuttle Vektor aufweisen.

Die DNA-Sequenzen der yTREX-Kassetten wurden entsprechend der Beschreibung mit der Clone-Manager 9.2 Software erstellt und als *de novo*-Gensynthese bei der Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) in Auftrag gegeben. Für den Einbau in den Hefe *shuttle* Vektor wurden zusätzlich sowohl am 5'- wie auch am 3'-Ende jeweils 40 bp lange Bereiche angefügt, welche homolog zu Sequenzen innerhalb des Hefe *shuttle* Vektors sind, also bei der HR als HB fungieren können.

Zusammengenommen sind die yTREX-Kassetten mit etwa 4,4 kb deutlich kleiner als die TREX-Kassetten mit insgesamt 6,7 kb, erfüllen dabei aber weiterhin die für den Einsatz des TREX-Systems wichtigen Eigenschaften. Sie sind darüber hinaus auf den schnellen Einbau verschiedener Gencluster und anderer genetischer Elemente durch homologe Rekombination ausgelegt und weisen zu diesem Zweck eine sehr hohe Flexibilität auf.

#### 3.4.2 Erzeugung des yTREX shuttle Vektors

Um die homologe Rekombination in *S. cerevisiae* für das yTREX-System zu ermöglichen, mussten die in **3.4.1** geplanten yTREX-Kassetten in einen *shuttle* Vektor für *S. cerevisiae* und *E. coli* integriert werden. Ein solcher *shuttle* Vektor besitzt einen Selektionsmarker und einen Replikationsursprung für *S. cerevisiae* sowie *E. coli*, hierdurch kann der Vektor in beiden Spezies genutzt werden. *E. coli* dient hierbei der Vervielfältigung des Vektors und fungiert als Donorstamm bei der für die Anwendung des TREX-Systems gegebenenfalls notwendigen

Konjugation. S. cerevisiae wird ausschließlich für die HR genutzt. Als Basis für diesen shuttle Vektor wurde das Plasmid YCp50-poly (Wang und Stillman, 1993) ausgewählt. Dieser Vektor trägt einen E. coli spezifischen Replikationsursprung aus dem Plasmid pMB1 sowie eine S. cerevisiae Replikationseinheit bestehend aus dem Centromer des IV Chromosoms (CEN4) sowie der autonom replizierende Sequenz (ARS1). Durch die Beschränkung des bakteriellen Replikationsursprungs auf E. coli eignet sich der Vektor für die direkte Anwendung des yTREX-Systems, da das Plasmid nur in E. coli sowie S. cerevisiae replizierbar ist. Somit kann sofort nach der Übertragung in den Zielsorganismus über den Selektionsmarker im Transposon-Bereich auf positive Transpositionsereignisse selektiert werden. Als Selektionsmarker für S. cerevisiae trägt der Vektor ein URA3-Markergen. In Kombination mit dem für die HR gewählten Uracil-auxotrophen S. cerevisiae Stamm VL6-48 (Kouprina et al., 1998) kann auf Uracil-freien Medien auf Plasmid-tragende Hefezellen selektiert werden. Dieser Stamm wurde ausgewählt, weil er bereits häufig erfolgreich bei HR basierten Klonierungen zum Einsatz kam (Gibson et al., 2008b; Li et al., 2015; Yamanaka et al., 2014). Die Erzeugung des yTREX shuttle Vektors erfolgte in zwei Schritten und ist in Abb. 3.21 dargestellt. Im ersten Schritt wurde das im YCp50-poly vorhandene bla Ampicillin-Resistenzgen (Amp<sup>R</sup>) durch ein *aph*II Kanamycin-Resistenzgen (Km<sup>R</sup>) ausgetauscht. Bei Ampicillin kommt es gerade bei längeren Kultivierungszeiten zu Problemen bei der Selektion. Dies ist der Funktionsweise der Ampicillin-Resistenz geschuldet, in dieser wird Ampicillin durch die β-Lactamase im Lactam-Vierring gespalten und unschädlich gemacht. Hiervon profitieren auch Kolonien nicht resistenter Bakterien, die dadurch im Umfeld von Bakterien wachsen können, die die β-Lactamase exprimieren. Daraus resultiert das sogenannte Ammenwachstum, was eine Selektion erschwert. Die Km<sup>R</sup> ermöglicht also eine stabilere Selektion bei längeren Kultivierungszeiten, welche in dieser Arbeit z.B. nach der Transformation von aus Hefe isolierten Plasmiden nötig waren. Für den Austausch wurde ein 5,6 kb langes Pvul/Ehel Fragment von YCp50-poly zusammen mit einem 1,2 kb großen Km<sup>k</sup> PCR-Fragment (erstellt mit Oligonukleotidprimern AD9/AD10, mit pK18 als Template) in S. cerevisiae VL6-48 transformiert (2.12.2.1). An die beiden Oligonukleotidprimer wurden jeweils 40 bp lange Sequenzen angehängt, welche zu geeigneten Stellen in YCp50-poly homolog sind, über diese HB wurden die beiden Fragmente in S. cerevisiae homolog rekombiniert (Abb. 3.21 A). Der korrekte Einbau der Km<sup>R</sup> in den entstandenen YCp50-polyKmR Vektor (**Abb. 3.21** B) konnte durch Sequenzierungen mit den Oligonukleotiden AD39 und AD40 bestätigt werden.

Der zweite Schritt erfolgte analog zum ersten Schritt durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae*. Hier wurde die über die Eurofins Genomics GmbH bezogenen synthetische DNA, die beide yTREX-Kassetten beinhaltet (vgl. **3.4.1**), mit dem *Spe*l geöffneten YCp50-poly-KmR rekombiniert. Der korrekte Einbau der yTREX-Kassetten in diesen Vektor konnte durch Sequenzierungen mit den Oligonukleotiden AD41 und AD42 bestätigt werden. Der entstandene yTREX *shuttle* Vektor ist in **Abb. 3.21** C dargestellt.

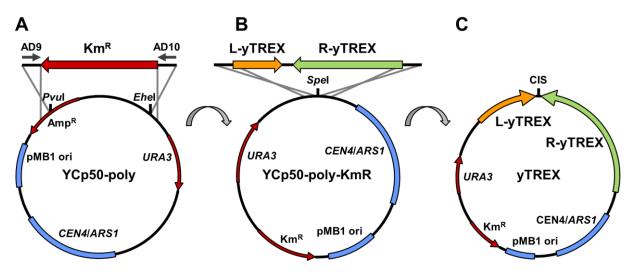


Abb. 3.21: Schematische Darstellung der Konstruktion des yTREX shuttle Vektors

**A:** Austausch des Ampicillin-Resistenzgens (Amp<sup>R</sup>) durch ein Kanamycin-Resistenzgen (Km<sup>R</sup>) im YCp50-poly *shuttle* Vektor durch HR. **B:** Integration der yTREX-Kassetten (L-yTREX und R-yTREX) in den YCp50-poly-KmR Vektor durch HR. **C:** yTREX *shuttle* Vektor. *Pvul*, *Ehel*, Spel = Erkennungssequenzen von Resistriktionsendonukleasen, pMB1 ori = *origin of replication* aus dem pMB1 Plasmid, *URA3* = *URA3*-Markergen *CEN4*/ARS1 = Centromer IV/autonom replizierende Sequenz, CIS = *cluster integration site*.

Der yTREX *shuttle* Vektor konnte erfolgreich durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* VL6-48 erzeugt werden. Dabei konnten die benötigten *S. cerevisiae*-basierten Methoden der Hefe-Transformation, *in vivo* Rekombination und Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe zur schnellen Klonierung von Plasmidkonstrukten erstmals erfolgreich erprobt werden.

#### 3.4.3 Evaluation des yTREX-Systems am Beispiel des Prodigiosin-Genclusters

Im nächsten Schritt wurde zunächst untersucht, ob sich der erzeugte yTREX *shuttle* Vektor für die Anwendung des yTREX-Systems äquivalent zum TREX-System eignet. Hierfür wurde zum einen überprüft, ob ein Gencluster durch homologe Rekombination in den yTREX *shuttle* Vektor eingebracht werden kann, zum anderen wurde untersucht, ob das yTREX-

System äquivalent zum TREX-System, unter der Nutzung von dessen Eigenschaften, zur Erzeugung von Gencluster-exprimierenden Stämmen einsetzbar ist.

Für die Überprüfung der Anwendbarkeit wurde das Prodigiosin-Gencluster aus *S. marcescens* ausgewählt. Da die Prodigiosin-Produktion bereits erfolgreich mit dem TREX-System durchgeführt werden konnte (diese Arbeit, Loeschcke et al. 2013), eignet sich dieses Gencluster sehr gut als Anwendungsbeispiel. Als heterologer Wirtsorganismus wurde wieder *P. putida* KT2440 gewählt und einerseits um eine direkte Vergleichbarkeit der beiden TREX-Systeme zu ermöglichen und andererseits weil sich dieser Organismus im Verlauf der Arbeit als sehr geeignet für die Prodigiosin-Produktion herausgestellt hat.

Da das Prodigiosin-Gencluster bereits auf dem Plasmid pPIG (Loeschcke et al., 2013) vorlag, konnte es als ein zusammenhängendes DNA-Fragment durch HR in den yTREX shuttle Vektor rekombiniert werden. Die jeweils 40 bp langen HB der CIS für die HR des pig-Genclusters mit dem yTREX shuttle Vektor wurden bereits beim Design der yTREX-Kassetten berücksichtigt und lagen somit bereits auf dem über die Eurofins Genomics GmbH bezogenen synthetischen DNA-Fragment vor. Der yTREX shuttle Vektor wurde über I-Scel Hydrolyse in der CIS linearisiert und zusammen mit dem 23,7 kb großen Xbal/Scal Fragment von pPIG in S. cerevisiae VL6-48 kotransformiert. Die HB waren dabei derart geplant worden, dass nur das 21 kb große, die Gene pigA bis pigN enthaltende DNA-Fragment in den yTREX shuttle Vektor rekombiniert wurde. Hierbei wurde pigA auf Seite der L-yTREX- und pigN auf Seite der R-yTREX-Kassette in den yTREX shuttle Vektor integriert (Abb. 3.22 A). Die korrekte Rekombination der beiden DNA-Fragmente zum yTREXpig Vektor (Abb. 3.22 B) wurde durch Sequenzierung der Übergangsbereiche mit den Oligonukleotiden AD90 und AD93 bestätigt. Der yTREXpig Vektor wurde, wie in 2.12.3 beschrieben, über Konjugation in P. putida übertragen, wonach mit Tetracyclin auf positive Transpositionsereignisse selektiert wurde. Wie bereits bei der Verwendung des TREX-Systems zu beobachten war (3.1.1 und 3.2.2), wiesen nach der Konjugation einige Kolonien einen roten Phänotyp auf. Der Anteil der roten Kolonien war mit etwa 30 % allerdings deutlich höher als bei Verwendung des TREX-Systems, jedoch war die Intensität der Rotfärbung bei den meisten Kolonien weniger stark ausgeprägt als beim TREX-System. Der rote Phänotyp weist, wie bereits beschrieben, auf die Produktion des roten Pigments Prodigiosin hin. In diesen Stämmen scheint somit das pig-Gencluster wie bei den anderen T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämmen unter Kontrolle eines starken nativen Promotors des Wirtsorganismus exprimiert zu werden. Die Analyse, ob es sich bei der produzierten Substanz wirklich um Prodigiosin handelt, wurde durch die Aufnahme von Absorptionsspektren (2.13.1) und eine von Anita Loeschcke (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführte HPLC-Analyse bestätigt.

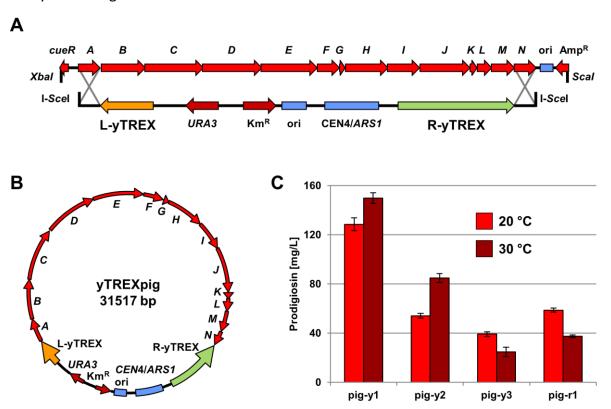


Abb. 3.22: Anwendung des yTREX-Systems zur funktionellen Expression des pig-Gencluster in P. putida

A: Schematische Darstellung der homologen Rekombination des I-Scel geöffneten yTREX shuttle Vektor mit einem Xbal/Scal Fragment des das pig-Gencluster tragenden Plasmids pPIG. Die gekreuzten Linien zwischen den beiden DNA-Fragmenten stellen schematisch die 40 bp langen homologen Bereiche dar. Diese Abbildung ist nicht maßstabsgetreu. B: yTREXpig Vektor. C: Prodigiosin-Titer in Kulturen der drei mit dem yTREX-System erzeugten Produktionsstämme P. putida pig-y1, -y2 und -y3, sowie des mit dem TREX-System erzeugten Stammes P. putida pig-r1 als Referenz nach 24 h Anzucht in Flowerplates (1000 μL TB, 1400 UpM, 20 und 30 °C). Die Säulen entsprechen jeweils dem Mittelwert einer biologischen Dreifachbestimmung, hierbei ist jeweils die Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

Drei Produktionstämme (*P. putida* pig-y1, -y2 und -y3), deren Kolonien einen besonders intensiven roten Phänotyp aufwiesen, wurden ausgewählt und auf ihre Prodigiosin-Produktion hin untersucht. Hierzu wurden aus einer ÜK auf eine OD<sub>650nm</sub> von 0,05 inokulierte 1000 μL Kulturen (TB-Medium) in Flowerplates bei 1400 UpM und 20 °C respektive 30 °C angezogen. Der Prodigiosin-Gehalt der Kulturen wurde nach 24 h, wie in (**2.13.2**) beschrieben, bestimmt und ist als Titer [mg/L] angegeben. Als Referenz wurde der zuvor mit dem TREX-System erzeugte Prodigiosin-Produktionsstamm *P. putida* pig-r1 (vgl. **3.1.1**) auf gleiche Weise behandelt. Die Prodigiosin-Titer der drei Stämme pig-y1, -y2 und -y3 sowie der

Referenz pig-r1 sind in Abb. 3.22 C gezeigt. Der neu erzeugte Stamm P. putida pig-y1 erreichte in diesem Experiment bei 20°C mit 129 ± 5 mg/L einen um mehr als den Faktor zwei höheren Prodigiosin-Titer als pig-r1, welcher nur 59 ± 2 mg/L produzierte. Darüber hinaus stieg bei P. putida pig-y1 der Titer bei 30 °C Inkubationstemperatur um über 15 % auf 150 ± 4 mg/L an, wohingegen er bei pig-r1 um etwa ein Drittel auf 38 ± 1 mg/L sank. Der sinkende Produktionstiter bei P. putida pig-r1 war aufgrund der vorher erzielten Ergebnisse zu erwarten (vgl. 3.1.2). Die Stämme pig-y1 und -y2 zeigten beide eine höhere Produktionsleistung bei 30 °C Kultivierungstemperatur, während das Temperaturoptimum für die Produktion bei pig-y3 und pig-r1 in diesem Versuch bei 20 °C lag (vgl. Abb. 3.22 C). Dies legt nahe, dass der chromosomale Integrationsort nach der randomisierten Tn5-Transposition einen entscheidenden Einfluss auf die Prodigiosin-Biosynthese bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen haben könnte. Somit ist anzunehmen, dass die unter 3.1.2 beschriebenen, für pig-r1 optimierten Kultivierungsbedingungen nicht in jedem mit dem TREX-/yTREX-System erzeugten Prodigiosin-Produktionsstamm zu einer Produktionssteigerung führen. Um dies näher untersuchen zu können, könnte der Integrationsort des yTREX-pig-Transposons der hier erzeugten Stämme pig-y1 bis -y3 in nachfolgenden Studien bestimmt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass das yTREX-System äquivalent zum TREX-System zur Erzeugung von Produktionsstämmen einsetzbar ist, zusätzlich ermöglicht es den effizienten Einbau von Genclustern in den yTREX *shuttle* Vektor über homologe Rekombination in *S. cerevisiae*. Beides konnte am Beispiel des Prodigiosin-Genclusters gezeigt werden. Hierbei gelang es mit *P. putida* pig-y1 einen Prodigiosin-Produktionsstamm zu erzeugen, der mit  $150 \pm 4$  mg/L mehr produziert als alle bislang mit dem TREX-System erzeugten Stämme unter den getesteten Bedingungen.

#### 3.4.4 Anwendungsmöglichkeiten des yTREX Systems

Es konnte gezeigt werden, dass das yTREX-System äquivalent zum TREX-System zur Erzeugung von Produktionsstämmen einsetzbar ist (3.4.3). Darüber hinaus wurde demonstriert, dass der yTREX shuttle Vektor zur HR in S. cerevisiae geeignet ist und eine effektive Methode darstellt, um Gencluster in das yTREX-System einzubringen. HR ist bereits seit Ma et al. (1987) als Methode zur in vivo Rekombination von DNA-Fragmenten, die durch Restriktion erzeugt wurden, bekannt. Spätere Studien zeigten, dass auch sehr kurze

homologe Sequenzen von 40 und weniger Basenpaaren für die HR in S. cerevisiae zur Erzeugung von Plasmiden ausreichend sind. Von Oldenburg et al. (1997) wurde gezeigt, dass auch PCR-Fragmente für die HR eingesetzt werden können, dies konnte bei der Erzeugung des yTREX shuttle Vektors in dieser Studie erfolgreich eingesetzt werden (vgl. 3.4.2, Abb. **3.21** A). Wie ebenfalls bei der Erzeugung des yTREX shuttle Vektors gezeigt wurde, eignen sich auch synthetisch erzeugte DNA-Fragmente für die HR. Zudem ist bekannt, dass S. cerevisiae die Fähigkeit besitzt, mehrere DNA-Fragmente mit entsprechend zueinander homologen Sequenzen in einem Schritt effektiv zu rekombinieren (Gibson et al., 2008; Marykwas und Passmore, 1995). Hierbei scheint die Größe der zu rekombinierenden DNA-Fragmente eine untergeordnete Rolle zu spielen. So ist der Einsatz von kurzen, unter 100 bp großen linker-Fragmenten (Raymond et al., 1999) genauso möglich wie der von über 30 kb großen Stücken (Gibson et al., 2008b). Für das yTREX-System ergibt sich hieraus eine immense Flexibilität bei der Einbringung von Genclustern in den yTREX shuttle Vektor durch HR in S. cerevisiae. Zusätzlich ist der yTREX shuttle Vektor selbst durch HR flexibel an verschiedene Versuchsbedingungen anpassbar. Dies wurde durch die Integration von nicht kodierenden DNA-Sequenzen zwischen den funktionellen Elementen der yTREX-Kassetten, welche als HB für die HR dienen können, ermöglicht (vgl. 3.4.1). Hieraus ergibt sich ein sehr breites Anwendungsspektrum für das hier vorgestellte yTREX-System.

Verschiedene Möglichkeiten der Anwendung werden im Folgenden beschrieben. Der yTREX shuttle Vektor (Abb. 3.23 A) kann bei Bedarf durch den Austausch der CIS für den Einbau eines beliebigen Genclusters angepasst werden. Da HR mit linearen DNA-Fragmenten effektiver ist als mit zirkulären (Orr-Weaver et al., 1981; Orr-Weaver und Szostak, 1983), ist die Berücksichtigung einer Erkennungssequenz für eine Homing-Endonuklease wie I-Scel hierbei stark zu empfehlen. Über eine solche Erkennungssequenz kann der yTREX Vektor in der CIS durch Restriktion geöffnet und somit linearisiert werden (Abb. 3.23 C links).

Das einzubauende Gencluster kann in verschiedenen Formen vorliegen, z.B. als Plasmid, in welches das Gencluster integriert wurde, oder als genomische DNA des natürlichen Wirts (Abb. 3.23 B). Alternativ kann das Gencluster auch als synthetisches *de novo* DNA-Fragment über einen geeigneten Hersteller bezogen werden oder direkt aus der eDNA eine Metagenom-Probe isoliert werden. Eine Voraussetzung für die HR ist, dass die Sequenz des Genclusters weitestgehend bekannt ist, um die Planung der für die HR nötigen homologen Sequenzen zu ermöglichen. Die das Gencluster beinhaltenden DNA-Fragmente können z.B.

durch PCR erzeugt werden. Hierbei können die für die HR vorgesehenen homologen Sequenzen direkt in die bei der PCR verwendeten Oligonukleotide integriert werden. Dient bei der HR ein Plasmid als Quelle für das Gencluster, sollte dieses genau wie der yTREX shuttle Vektor zur Steigerung der Effektivität der HR (Orr-Weaver et al., 1981; Orr-Weaver und Szostak, 1983) durch eine geeignete Restriktionsendonuklease außerhalb des Genclusters linearisiert werden.

Das Gencluster kann also in einem oder mehreren DNA-Fragmenten vorliegen (Abb. 3.23 C rechts), um zusammen mit dem linearisierten yTREX shuttle Vektor in S. cerevisiae transformiert zu werden, wo die Fragmente entsprechend der gewählten homologen Sequenzen in vivo per HR zu einem zirkulären Vektor verknüpft werden können (Abb. 3.23 D). Neben dem Einbau des nativen Genclusters (Abb. 3.23 D.1) kann das Gencluster durch die Wahl der homologen Sequenzen manipuliert werden. Eine große Variabilität kann hierbei durch die Generierung der Gencluster aus mehreren DNA-Fragmenten erzielt werden. Durch die frei wählbaren homologen Sequenzen innerhalb der Oligonukleotide und die Möglichkeit eine große Anzahl an DNA-Fragmenten durch HR rekombinieren zu können (Gibson et al., 2008b), kann das Gencluster nahezu beliebig manipuliert werden. Eine Umstrukturierung, die das Gencluster in eine unidirektionale Orientierung re-arrangiert (Abb. 3.23 D.2), ist genauso möglich wie die Deletion von einem oder mehreren Genen innerhalb des Clusters. Eine unidirektionale Orientierung ist zum Beispiel notwendig, um T7RP-unabhängige Produktionsstämme, wie in 3.1.1, 3.2.2 und 3.4.3 beschrieben, zu erzeugen. Die Deletion von einem oder mehreren Genen, ähnlich der in dieser Arbeit beschriebenen Deletions-Mutante des pig-Genclusters (vgl. 3.3.1), kann zur Veränderung der Produkte von Biosyntheswegen genutzt werden. Neben Manipulationen innerhalb des Clusters ist es auch möglich das Gencluster durch die integration zusätzlicher Gene zu erweitern. Bei Genclustern, welche die Biosynthese von Sekundärmetaboliten kodieren, deren Produktion nicht wie bei Prodigiosin leicht durch ihre farbliche Pigmentierung zu erkennen ist, können zusätzliche Expressionsmarker eingesetzt werden (Abb. 3.23 D.3). Als Expressionsmarker kann z.B. eine promotorlose Variante des lacZ-Gens aus dem E. coli lac-Operon verwendet werden, welches stromabwärts vom Gencluster eingebaut wird. Somit kann anhand dieses Reporters auf eine durchgehende Transkription des gesamten Genclusters selektiert werden.

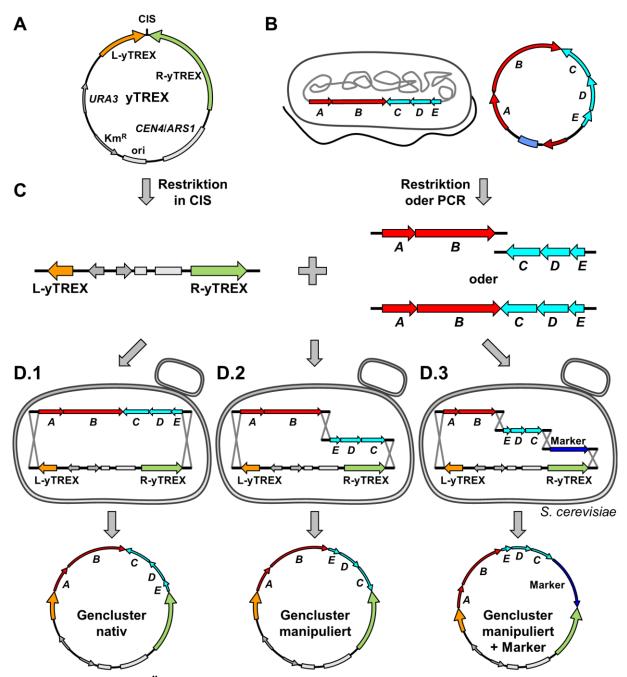


Abb. 3.23: Schematische Übersicht der vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten des yTREX-Systems

A: yTREX shuttle Vektor. B: Mögliche Quellen für ein zu exprimierendes Gencluster sind z.B. genomische DNA des Herkunftsorganismus oder ein das Gencluster tragendes Plasmid. C: Gewinnung der für die HR vorgesehenen DNA-Fragmente. Der yTREX Vektor wird durch Restriktion in der CIS linearisiert. Die für das Gencluster kodierenden Bereiche können entweder durch Restriktion oder durch PCR im Ganzen oder in Form mehrerer DNA-Fragmente zugänglich gemacht werden. Hierbei müssen jeweils geeignete homologe Sequenzen bereitgestellt werden. Dies ist durch Integration derselben in die genutzten PCR-Primer und/oder durch Anpassung der CIS möglich. D.1-3: Verschiedene Möglichkeiten der Rekombination von transformierten DNA-Fragmenten durch die Wahl der homologen Sequenzen für die HR in S. cerevisiae sowie somit erzeugte yTREX Vektoren mit verschiedenen Varianten eines Genclusters.

Durch die HR ist das hier vorgestellte yTREX-System ein immens flexibel einsetzbares System zur Erzeugung von Produktionsstämmen für Gencluster-kodierte Biosynthesewege. Es bietet

die Möglichkeit zu weitreichenden und schnell umsetzbaren Manipulationen der Gencluster, sei es durch eine Umstrukturierung der Genanordnung, die Deletion von Genen innerhalb des Genclusters oder das Hinzufügen von Expressionsmarkern.

## 3.4.5 Anwendung des yTREX-Systems im Rahmen der Masterarbeit von Robin Weihmann

Nachdem die grundsätzliche Funktion des in dieser Arbeit erzeugten yTREX Systems am Beispiel Prodigiosin nachgewiesen werden konnte (vgl. **3.4.3**), sollten die verschiedenen in **3.4.4** beschriebenen Anwendungsmöglichkeiten in der während dieser Doktorarbeit betreuten Masterarbeit von Robin Weihmann (Weihmann, 2016) näher untersucht werden. Im Folgenden werden einige Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt.

Zur Darstellung der Anwendungsmöglichkeiten wurde mit zwei Genclustern gearbeitet: dem Violacein-Gencluster (vio-Gencluster) aus Chromobacterium violaceum, dessen Produkte Violacein und Deoxiviolacein nützliche pharmazeutische Eigenschaften aufweisen (Choi et al., 2015), sowie dem Phenazin-Gencluster (phz-Gencluster) aus Pseudomonas aeruginosa PAO1, dessen verschiedene Phenazin-Produkte ebenfalls aufgrund ihrer pharmazeutischen Eigenschaften von wissenschaftlichen Interesse sind (Laursen und Nielsen, 2004). Eine Übersicht über die Struktur beider Gencluster sowie die von ihnen kodierten Biosynthesewege befindet sich im Anhang (Abb. 8.5 und Abb. 8.6). Aufgrund seiner grundsätzlichen Eignung als Sekundärmetabolit-Produzent und bereits erfolgreichen Verwendung zur Synthese der genannten Stoffgruppen (Loeschcke und Thies, 2015) wurde erneut P. putida KT2440 als Wirtsorganismus ausgewählt.

Zunächst wurde überprüft, ob eine leichte und effektive Änderung des Syntheseweges innerhalb einer Sekundärmetabolit-Biosynthese durch yTREX-basierte Manipulation des zugehörigen Genclusters ermöglicht wird. Hierzu wurde das vio-Gencluster sowohl in nativer Form als auch in zwei manipulierten Varianten durch HR in den yTREX shuttle Vektor eingebracht. Beim nativen Gencluster wird eine Produktion der beiden Sekundärmetabolite Violacein und Deoxyviolacein erwartet, durch die Deletion von vioD sollte reines Deoxyviolaceine und durch die Deletion von vioC und vioD Prodeoxyviolacein und/oder Deoxychromoviridans produziert werden (vgl. Anhang Abb. 8.5). Die drei Varianten konnten durch HR erfolgreich in den yTREX shuttle Vektor integriert werden. Anschließend konnten für alle drei Varianten T7RP-unabhängige P. putida Produktionsstämme erzeugt werden. Die

erwarteten Produkte der verschiedenen Varianten konnten alle erfolgreich durch HPLC-Analyse verifiziert werden.

Weiterhin wurde überprüft, ob sich *lacZ* für den Einsatz als Expressionsmarker für die Expression ganzer Gencluster und somit gegebenenfalls als Indikator für die Produktion eignet. Hierzu wurde eine Variante des *phz*-Genclusters bestehend aus den Genen *phzA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F* und *G*, welche die Biosynthese von Phenazine-1-Carbonsäure (PCA) katalysieren (vgl. Anhang **Abb. 8.6**), mit einer promotorlosen Variante des *lacZ*-Gens mithilfe des yTREX-Systems durch HR verbunden. Das *lacZ*-Gen sollte nach erfolgreicher Rekombination hinter dem *phz*-Gencluster und in gleicher Leserichtung vorliegen. Dies konnte durch eine Sequenzierung verifiziert werden. Die Verwendung des *lacZ*-Expressionsmarkers erwies sich hierbei als sehr erfolgreich. In *P. putida* konnte durch HPLC-Analyse PCA in allen Stämmen, die auf X-Gal Medium einen blauen Phänotyp zeigten, nachgewiesen werden, wohingegen es in Stämmen mit einem weißen Phänotyp nicht nachweisbar war. Eine Übersicht der verschiedenen Anwendung ist in **Tab. 3.4** dargestellt.

Tab. 3.4: Übersicht der mithilfe des yTREX-Systems produzierten Sekundärmetabolite

Wurde das jeweilige Gencluster aus mehreren PCR-Fragmenten rekombiniert, sind die einzelnen PCR-Fragmente durch | getrennt sowie deren Anzahl angegeben. Bei Verwendung eines zusätzlichen Markergens als Expressionsreporter ist dieses aufgeführt. Die angegebenen Substanzen konnten durch HPLC-Analyse in Extrakten von Produktionsstämmen, die mit yTREX-Konstrukten mit den entsprechenden Gencluster-Varianten erzeugt wurden, nachgewiesenen werden. Die vollständigen Gencluster sowie Biosynthesewege von Violacein und den Phenazinen sind im Anhang gezeigt (Abb. 8.5 und Abb. 8.6).

Gencluster	PCR-Fragmente   Ar	ızahl	Marker	Durch HPLC nachgewiesene Substanzen
Violacein	vioABCDE	1	nein	Violacein + Deoxyviolacein
Violacein	vioABC   E	2	nein	Deoxyviolacein
Violacein	vioAB   E	2	nein	Prodeoxyviolacein + Deoxychromoviridans
Phenazin	phzABCDEFG   lacZ	2	lacZ	PCA

In der Masterarbeit von Robin Weihmann (Weihmann, 2016) konnten somit erfolgreich verschiedene Anwendungsmöglichkeiten für das yTREX-System gezeigt werden. Es wurde am Beispiel des Violacein-Biosyntheseweges demonstriert, dass sich durch das yTREX-System schnell Deletionen bestimmter Gene innerhalb eines Genclusters durchführen lassen. Hierbei wurden erfolgreich drei Varianten dieses Biosyntheseweges durch Änderungen in dem für diesen kodierenden vio-Genclusters erzeugt. Die Funktionalität eines lacZ-Expressionsmarkers konnte bei einer Variante des phz-Genclusters nachgewiesen

werden. Es konnten somit alle drei in **Abb. 3.23** D.1-3 dargestellten grundsätzlichen Anwendungsmöglichkeiten des yTREX-Systems erfolgreich demonstriert werden.

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit das yTREX-System erzeugt und am Beispiel des *pig*-Genclusters evaluiert. Dieses System kombiniert die Eigenschaften des TREX-Systems mit der Möglichkeit der Klonierung über homologe Rekombination. Hieraus ergibt sich eine große Flexibilität bei der Erschließung neuer potentiell Gencluster-kodierter Sekundärmetabolite.

Das yTREX-System konnte im Rahmen der während dieser Dissertation betreuten Masterarbeit von Robin Weihmann erfolgreich zur Erzeugung verschiedener Sekundärmetabolit-Produktionsstämme eingesetzt werden, wobei verschiedene Anwendungsmöglichkeiten abgedeckt wurden.

### 4 Diskussion

Mikrobielle Sekundärmetabolite stellen eine reichhaltige Quelle wertvoller Naturstoffe mit beispielsweise pharmakologischer Relevanz dar. Um Zugang zu neuen potentiell nützlichen Sekundärmetaboliten zu ermöglichen, wurde das TREX-System in der AG Drepper (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) entwickelt. Es besteht aus einer Kombination verschiedener genetischer Elemente für die Expression ganzer Gencluster und ist in einem breiten bakteriellen Wirtsspektrum einsetzbar, in dem so eine Metabolitsynthese etabliert werden kann. Bei der Entwicklung und Anwendung des Systems lag der Fokus zunächst auf dem flexiblen und schnellen Einsatz als *screening tool*, mit dem geeignete Kombinationen von Wirtsorganismus und Biosyntheseweg für eine erfolgreiche Metabolitsynthese identifiziert werden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stand darauf basierend eine Evaluierung und Weiterentwicklung des TREX-System hinsichtlich einer effektiven Metabolitproduktion im Vordergrund.

Im Folgenden wird zunächst die Eignung des TREX-Systems zur Erzeugung von kompetitiven Sekundärmetabolit-Produktionsstämmen diskutiert. Dies wurde in dieser Arbeit am Beispiel des pharmazeutisch wertvollen Sekundärmetaboliten Prodigiosin gezeigt, für welches verschiedene Produktionsstämme mit z.T. erheblichen Produktionsausbeuten erzeugt werden konnten. Auf Basis der hier gewonnenen Erkenntnisse wird der für die gute Produktionsleistung verantwortliche Insertionsort der als TREX-Transposon im bakteriellen Chromosom integrierten Prodigiosin-Biosynthesegene im Detail erörtert. Dieser Integrationsort wurde besonders im Hinblick auf den für die T7RP-unabhängige Expression des piq-Genclusters verantwortlichen Promotor näher untersucht. Des Weiteren wird die Möglichkeit näher beurteilt, auf Basis der erzeugten effizienten Produktionsstämme durch Mutasynthese potentiell pharmazeutisch wertvolle Prodigiosin-Derivate zugänglich zu machen (Kooperationsprojekt mit dem Institut für Bioorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Abschließend wird das in dieser Arbeit erstmals vorgestellte yTREX-System vergleichend mit dem TREX-System evaluiert. Bei diesem System handelt es sich um eine Variation des TREX-Systems, welches durch die Fähigkeit zur homologen Rekombination (HR) in S. cerevisiae um eine effektive Methode zur Klonierung und Markierung von Genclustern erweitert wurde. Durch diese Möglichkeit ergeben sich neue vielseitige

Anwendungen bei der heterologen Expression von Genclustern im Vergleich zum TREX-System, welche hier diskutiert werden.

## 4.1 Anwendung des TREX-Systems zur Erzeugung kompetitiver Produktionsstämme

Das TREX-System (1.5) wurde zunächst als *screening tool* entwickelt, um auf Basis einer schnellen flexiblen Anwendbarkeit effektiv geeignete Kombinationen von Wirtsorganismus und Biosyntheseweg für eine erfolgreiche Metabolitsynthese identifizieren zu können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das TREX-System sich durchaus auch dazu eignet, unter Schaffung bestimmter Voraussetzungen kompetitive Produktionsstämme zu erzeugen. Im Folgenden wird dies am Beispiel des Sekundärmetaboliten Prodigiosin, dessen Biosyntheseweg vom *pig*-Gencluster kodiert wird, diskutiert.

In vorrangegangenen Arbeiten (Loeschcke et al., 2013) konnte mit dem TREX-System *P. putida* KT2440 als potentieller Expressionswirt für das *pig*-Gencluster aus *S. marcescens* identifiziert werden. Dieser Wirt ist bereits erfolgreich zur Expression verschiedener Naturstoffe eingesetzt worden (Loeschcke und Thies, 2015). Speziell für die Biosynthese von Prodigiosin bietet dieser Organismus verschiedene Vorteile. Beispielsweise hat er mit 61,5 % nicht nur einen in etwa gleichen GC-Gehalt wie das *pig*-Gencluster aus *S. marcescens* (GC = 61,4 %), was eine effektive Translation begünstigt, sondern bietet auch grundsätzlich eine hohe Toleranz gegen Xenotiotika inklusive verschiedener Antibiotika (Fernández et al., 2012; Simon et al., 2014). In dieser Arbeit konnte darüberhinaus deutlich gezeigt werden, dass *P. putida* KT2440 ebenfalls eine sehr hohe Toleranz gegenüber Prodigiosin aufweist (vgl. **3.1.3**).

Es konnten erfolgreich Stämme erzeugt und etabliert werden, in denen das durch Transposition mit dem TREX-System ins Genom integrierte *pig*-Gencluster aufgrund des Insertionsortes unter Kontrolle eines starken nativen Promotors exprimiert wird (**3.1.1** und **3.2.2**). Die Prodigiosin-Produktionsausbeuten dieser Stämme waren deutlich höher als die der T7RP-abhängigen Stämme sowohl aus dieser Studie (vgl. **Abb. 3.3**) als auch aus Loeschcke et al. (2013). Nach einer Evaluierung der hier verfolgten möglichen Ansätze zur Steigerung der Prodigiosin-Produktionsausbeute sowie potentieller Anwendungsmöglichkeiten der Produktionsstämme wird der hierfür zentral relevante native Promotor in **4.2** beschrieben und diskutiert.

#### 4.1.1 Ansätze zur Steigerung der Prodigiosin-Produktionsausbeute

Die Prodigiosin-Produktion der hier erzeugten Stämme sollte durch einfache Anpassungen der Wachstumsbedingungen weiter gesteigert werden, um das Potential von *P. putida* in Bezug auf die Produktion dieses Sekundärmetaboliten weiter untersuchen zu können.

Hierbei wurden verschiedene Parameter berücksichtigt. Für Temperatur und Sauerstoffeintrag konnte bereits ein Einfluss auf die Produktion von Prodigininen in den ursprünglichen Produzenten, wie S. marcescens gezeigt werden. Ausgehend von der optimalen Wachstumstemperatur für P. putida von 30 °C konnte durch das Absenken der Temperatur um 10 °C sowie einen erhöhten Sauerstoffeintrag während Kultivierungsprozesses die Produktion des Stammes P. putida pig-r1 um etwa den Faktor 11 auf 94 ± 1 mg/L gesteigert werden (Abb. 3.4). Ob sich der erhöhte Sauerstoffeintrag direkt auf die Prodigiosin-Biosynthese ausgewirkt hat, konnte hierbei nicht eindeutig bestimmt werden. Die Erhöhung der Produktion könnte auch auf den Metabolismus von P. putida selbst zurückzuführen sein, für den der positive Einfluss einer erhöhten Sauerstoffzufuhr bereits von Duetz et al. (2000) beschrieben wurde. Die resultierende Produktion war im Vergleich zu der zum Stand dieser Arbeit, höchsten in anderen Arbeiten erreichten heterologen Produktion von etwa 10 mg/L in E. coli (Kwon et al., 2010) deutlich höher. Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass Kwon et al. (2010) nicht versuchten, die Produktion zu steigern. Im Vergleich zum ursprünglichen Produzenten S. marcescens sind die in dieser Arbeit erreichten Produktionsausbeuten jedoch deutlich niedriger. In S. marcescens werden unter optimierten Produktionsbedingungen bereits Ausbeuten im Grammbereich, wie z.B. 2,4 g/L (Su et al., 2011) oder 15,6 g/L (Chen et al., 2013), erzielt. In beiden erwähnten Studien wurden jedoch Bioreaktoren zur Kultivierung eingesetzt, während in dieser Arbeit Schüttelkolben zum Einsatz kamen, was die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar macht. Für die homologe Prodigiosin-Produktion in S. marcescens sind auch bereits verschiedene Regulationsmechanismen identifiziert worden, die sich auf die Produktionsleistung auswirken. So führt z.B. eine erhöhte Phosphatkonzentration zu einer deutlichen Steigerung der Produktion durch den Response-Regulator PhoB (Slater et al., 2003; Williamson et al., 2006). Aus diesen Punkten entsteht eine veränderte Ausgangssituation bei der Produktionssteigerung, die eventuell durch weitere Studien mit den in dieser Arbeit erzeugten Produktionsstämmen angeglichen werden könnte. Der wohl wichtigste Punkt im direkten Vergleich zur homologen Produktion in S. marcescens ist

jedoch, dass es sich bei *S. marcescens* im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit genutzten, GRAS zertifizierten Wirt *P. putida* KT2440 (Martínez-García et al., 2014; Wu et al., 2011) um ein Humanpathogen handelt, was eine Nutzung als Produzent für Pharmazeutika schwierig macht.

Ein weiterer Ansatz zur Steigerung der Produktion durch die zusätzliche Expression des Genclusters durch den Einsatz einer T7RP neben der nativen Polymerase des Wirtes war nicht erfolgreich, die Präsenz einer T7RP senkte die Produktionsausbeuten sogar (**Abb. 3.3** C). Ein möglicher Grund hierfür könnte die gegenseitige Behinderung der Polymerasen sein. Zwar wurde für das TREX-System bereits gezeigt, dass sich zwei T7 Polymerasen grundsätzlich passieren können (Loeschcke, 2012), aber es wurde auch gezeigt, dass es bei konvergenter im Vergleich zu einseitiger Expression zu einer Verminderung der Transkriptmenge kommt (Markert, 2008). Zudem wurde bereits beschrieben, dass sich auch unterschiedliche Polymerasen nicht zwangsläufig bei der Transkription behindern (Epshtein et al., 2003; Ma und McAllister, 2009), aber in den hier erzeugten Stämmen transkribiert nicht nur die T7RP konvergent sondern zusätzlich auch die natürliche RNA-Polymerase von *P. putida.* Dies könnte zu einer gegenseitigen Behinderung führen, welche schließlich in der sinkenden Produktion resultiert.

Es wäre denkbar, noch weitere Versuche zur Steigerung der Produktion zu unternehmen. Hierfür bieten sich z.B. sogenannte design of experiment (DoE) Modelle an. Hierbei werden vorhandene Daten einzelner Experimente genutzt, um durch Computer-gestützte Analysen eine Versuchsplanung zu erstellen. Dies bedeutet, dass das Zusammenspiel verschiedener Faktoren in Hinblick auf ein gewünschtes Ziel, wie die Prodigiosinproduktion, simuliert wird und Vorhersagen für ein Optimum getroffen werden. Anschließend werden die weiteren Experimente anhand dieser Vorhersagen angepasst (Biggs et al., 2014; Fernández-Castané et al., 2014; Xu et al., 2016). Diese Experiment- und Computer-gestützten Analysen können auf den verschiedensten Ebenen und mit den verschiedensten Zielsetzungen durchgeführt werden, sei es zur Steigerung der Produktion einer bestimmten Substanz durch die Planung spezifischer Medien (Xu et al., 2008) oder zur komplexen Anpassung eines ganzen Organismus durch genomweites metabolic engineering (Martínez-García et al., 2014). Hier konnten bereits auf Basis des E. coli genome-scale model (GEM), also den zusammengetragenen Informationen vieler verschiedener Studien (McCloskey et al., 2013), erstellte Stämme für die Produktion verschiedenster Substanzen eingesetzt werden

(Fernández-Castané et al., 2014). Xu et al. (2016) beschreiben die Steigerung der Produktion von Violacein in *E. coli* um den Faktor 3,2 durch die Anpassung des Expressions-Plans der verschiedenen an der Biosynthese beteiligten Gene anhand einer Computer-gestützten Analyse des Biosyntheseweges. Sie sprechen dabei auch von der Möglichkeit, dieses von ihnen erstellte System für andere Biosynthesewege nutzbar machen zu können (Xu et al., 2016). Da es sich bei Violacein ebenfalls um einen Sekundärmetaboliten handelt, dessen Biosyntheseweg durch ein Gencluster (*vio-*Gencluster) kodiert ist, wäre eine Anwendung dieses Systems für die Prodigiosin-Produktion also durchaus denkbar. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass der Prodigiosin-Biosyntheseweg aufgrund der höheren Anzahl der an ihm beteiligten Enzyme sowie des vielschichtigeren Aufbaus des eigentlichen Biosyntheseweges um einiges komplexer ist als der von Violacein (vgl, **Abb. 1.2** und **Abb. 8.5**). Eine Umstrukturierung des Expressions-Plans könnte also ungleich aufwendiger sein.

Da sich *P. putida* hier als exzellenter Produktions-Wirt für Prodigiosin herausgestellt hat, wäre die Nutzung eines sogenannten *Pseudomonas* 2.0 ebenfalls eine Option. Hier sind bis jetzt die zwei Varianten, *P. putida* EM42 und EM383 erhältlich, die durch verschiedene Deletionen innerhalb des Genoms von *P. putida* KT2440 erzeugt wurden (Martínez-García et al., 2014). Beide sind dem Wildtyp (WT) in den Punkten Wachstum, Nährstoffverwertung und Stress-Toleranz überlegen (Martínez-García et al., 2014). Insgesamt wurden hierbei bis jetzt mit etwa 300 Genen in 11 Genregionen 4,3 % des Genoms von KT2440 deletiert. Inwieweit weitere Deletionen durchgeführt werden können, die in einer Steigerung der metabolischen Fähigkeiten des Organismus resultieren, ohne dabei die Toleranz des Organismus gegenüber Xenobiotika zu stören, kann nur spekuliert werden.

#### 4.1.2 Möglichkeiten zur Nutzung der Prodigiosin-Produktionsstämme

Neben Prodigiosin sind auch seine Derivate von höchstem pharmakologischen Interesse, denn sie zeigen aufgrund ihrer antibiotischen Wirkung gegen verschiedene Erreger und ihrer apoptotischen Wirkung auf unterschiedliche Krebsarten ebenfalls großes Potential (Darshan und Manonmani, 2015; Stankovic et al., 2014; Williamson et al., 2007). Möglichkeiten, Zugang zu neuen oder bereits bekannten Derivaten einer Substanz zu bekommen, sind z.B. Mutasynthese und Semisynthese oder eine Kombination aus beiden (Eichner et al., 2012; Kennedy, 2008; Maier, 2015; Sahner et al., 2015). Bei der Mutasynthese werden hierbei gezielt Mutationen im Biosyntheseweg erzeugt, die die Bildung eines Intermediates

verhindern. Danach wird dem so erzeugten Stamm in vivo ein synthetisch hergestelltes Derivat dieses Intermediates (Mutasynthon) zugeführt. Wird dieses Mutasynthon von den beteiligten Enzymen als Substrat akzeptiert, wird der Biosyntheseweg mit der Bildung eines Derivats des ursprünglichen Produkts vollendet. Bei der Semisynthese wird dagegen ein Intermediat oder Endprodukt einer Biosynthese extrahiert und durch chemische Synthese weiter umgesetzt. Aufgrund seines zweigeteilten Aufbaus und der geringen Substratspezifität des final kondensierenden Enzyms PigC (Chawrai et al., 2008; Kim et al., 2007; Williamson et al., 2005) wurde die Einsetzbarkeit der Mutasynthese für den Prodigiosin-Biosyntheseweg bereits diskutiert (Stankovic et al., 2014; Williamson et al., 2007).

Auf Basis des effektiven Prodigiosin-Produktionsstammes *P. putid*a pig-r1 wurde in dieser Arbeit durch eine Deletion des Gens *pigD* erfolgreich ein Stamm erzeugt, der für die Biosynthese von MAP defizient ist (vgl. **3.3.1**). Mit diesem Stamm *P. putida* pig-r1 Δ*pigD* konnte erstmals Mutasynthese im Prodigiosin-Biosyntheseweg durchgeführt werden. Dieses Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit Andreas Sebastian Klein durchgeführt. Im Rahmen seiner Dissertation im Institut für Bioorganische Chemie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) synthetisierte er verschiedenste MAP-Derivate und konnte viele davon mit großem Erfolg in der Mutasynthese einsetzen. Eine kurze Übersicht der getesteten MAP-Mutasynthons ist in **3.3.2** dargestellt. Insgesamt konnten bis zum Stand dieser Arbeit 14 Prodigiosin-Derivate erfolgreich erzeugt und extrahiert werden.

Hier konnte also erstmals gezeigt werden, dass Mutasynthese mit dem Prodigiosin-Biosyntheseweg grundsätzlich möglich ist, woraus sich vielfältige Möglichkeiten für ein weiteres Vorgehen ergeben. Die bereits beschriebene geringe Substratspezifität von PigC (Chawrai et al., 2008; Kim et al., 2007; Williamson et al., 2005) konnte durch den erfolgreichen Einsatz verschiedener MAP-Derivate weiter bekräftigt werden. Jedoch wurden nicht alle eingesetzten MAP-Derivate von PigC als Substrat akzeptiert. Lange C-Ketten an der C2- oder C3-Position des MAP-Pyrrols sowie das gänzliche Fehlen mindesten eines C-Atoms an der C2-Position scheinen eine Akzeptanz durch PigC zu vermindern. Dem könnte entgegengewirkt werden, indem zusätzlich zu PigC ein oder mehrere kondensierende Enzyme aus verschiedenen anderen Prodiginin-Biosynthesewegen nachträglich in den Stamm integriert werden. Eine Kombination mehrerer kondensierender Enzyme, welche in ihrem jeweils natürlichen Prodiginin-Biosyntheseweg unterschiedliche Substrate in der

Kondensation akzeptieren, würde wahrscheinlich zu einer besseren Akzeptanz von MAP-Derivaten in der Mutasynthese führen. Die hohe Homologie zwischen den verschiedenen Biosynthesewegen und besonders zwischen den kondensierenden Enzymen (Hu et al., 2016; Kimata et al., 2016; Williamson et al., 2006) könnte dies ermöglichen. Denkbar wäre z.B. der Einsatz von RedH aus *Streptomyces coelicolor*. Dieses Enzym kann 2-Undecyl-Pyrrol (C<sub>11</sub>-Kette an C2-Position) mit MBC kondensieren (Williamson et al., 2006). Weiterhin ist eine Verwendung von RphH aus *Streptomyces griseoviridis* denkbar, welches ebenfalls langkettige MAP-Derivate akzeptieren könnte (Kawasaki et al., 2009).

In einem zusätzlichen Schritt zur Gewinnung weiterer Derivate wäre auch die Integration von Enzymen, die das Prodigiosin-Derivat weiterverarbeiten, wie z.B. RedG aus Streptomyces coelicolor oder eine oder mehrere der RphG-Varianten aus Streptomyces griseoviridis (Hu et al., 2016; Kimata et al., 2016; Williamson et al., 2006), möglich. Diese Enzyme katalysieren eine Zyklisierung von Prodigininen, so wird z.B. von RedG Undecylprodigiosin zum zyklischen Prodiginin Butyl-meta-cyclo-heptylprodiginin umgesetzt (Williamson et al., 2006).

So bieten sich also mannigfaltige Möglichkeiten, Zugang zu Prodigiosin-Derivaten zu erhalten. Ein Nachteil hierbei ist jedoch, dass das Einbringen zusätzlicher Gene in einen bereits bestehenden Stamm bislang ungleich aufwendiger ist. Die Gene müssen nach Möglichkeit in den gleichen Locus integriert werden, in dem auch das restliche Gencluster integriert wurde, damit sie unter der gleichen Transkriptionskontrolle des nativen Promotors stehen. Dies ist weitestgehend nur durch vom Wirt durchgeführte homologe Rekombination zu ermöglichen, wie sie auch in dieser Arbeit zur Erzeugung der pigD-Deletion verwendet wurde. Diese Methode ist jedoch im Vergleich zur Transposition weniger effizient (Fu et al., 2008) und die Identifikation einer korrekten Integration stellte sich in dieser Arbeit bei der Erzeugung der pigD-Deletion als sehr zeitaufwendig dar. Darüber hinaus sind Selektionsmarker begrenzt. So könnten in dem hier erzeugten Stamm P. putida pig-r1 ΔpigD z.B. Streptomycin, Tetracyklin, Kanamycin und Gentamicin nicht mehr verwendet werden. Deshalb müssten hier für weitere Genintegrationen mehrschrittige Verfahren zur Markerfreien Manipulation eingesetzt werden, welche ungleich zeitaufwendiger sind. Eine Durchführung derartiger metabolic engineering Ansätze sollte also optimalerweise bereits bei der Erstellung der Stämme berücksichtig werden.

Zusammengefasst konnte im Rahmen dieser Arbeit, auf Basis eines durch das TREX-System erzeugten Prodigiosin-Produktionsstammes, ein in der MAP-Biosynthese defizienter Stamm erzeugt werden, der erfolgreich in der Mutasynthese eingesetzt werden konnte. Aufgrund der hier erzielten Daten könnte auch für andere Sekundärmetabolite, basierend auf mit dem TREX-System erzeugten T7RP-unabhängigen Produktionsstämmen, der Ansatz der Mutasynthese verfolgt werden.

# 4.2 Untersuchung des zur T7RP-unabhängigen Produktion führenden Insertionsortes

Diese Arbeit stellt klar heraus, dass mit dem TREX-System auch kompetitive Sekundärmetabolit-Produktionsstämme erzeugt werden können. Die im TREX-System verwendete, zufällig ins Wirtsgenom transponierende Tn5-Transposase (Schulz und Reznikoff, 1991; Steiniger et al., 2006) bildet hierbei die Basis, denn nur durch diese zufällige Transposition des TREX-piq-Transposons ins Wirtsgenom konnten die für die Expression ganzer Genclustern nötigen starken Promotoren gefunden werden. Auch die erwartete Stabilität der Tn5-Transposition (De Lorenzo et al., 1990; Reznikoff, 2008) konnte am Beispiel der beiden Produktionststämme P. putida pig-r1 und -r2 nachgewiesen werden (vgl. 3.1.4). So änderten sich über den Zeitraum von zwei Jahren der Passagierung auf festem Nährmedium weder die Menge an produziertem Prodigiosin, das Wachstumsverhalten noch der Insertionsort. Die zufällige Tn5-Transposition ist also ein effizientes Mittel zur Erzeugung von starken Sekundärmetabolit-Produktionsstämmen und somit auch zur Ermittlung eines für einen solchen Produktionsstamm geeigneten Insertionsortes. Einleitend muss an dieser Stelle jedoch noch angemerkt werden, dass sich ein solcher nativer Promotor nur zur Expression von unidirektional angeordneten Genclustern eignet. Die Transkription ausgehend von nur einem Promotor ist nicht ausreichend für die vollständige Transkription eines komplex aufgebauten Genclusters, in dem unterschiedlich orientierte Transkriptionseinheiten vorliegen.

#### 4.2.1 rRNA-Operons als vielversprechender Integrationsort

Nach der Bestimmung des Integrationsortes der TREX-*pig*-Transposons von allen 52 in dieser Arbeit erzeugten T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämmen ergab sich interessanterweise, dass in 96 % dieser Stämme das Transposon in einer Kopie des rRNA-

Operons von *P. putida* integriert worden ist. Lediglich in zwei Stämmen, deren Produktionsleistung nur bei jeweils 0,01 % des nächstbesser produzierenden Stammes lag, waren die Biosynthesegene nicht in einem rRNA-Operon integriert. Innerhalb der rRNA-Operons waren die TREX-*pig*-Transposons bis auf eine Ausnahme alle innerhalb der für die 16S oder 23S rRNA kodierenden DNA integriert (**Abb. 3.13**). Insgesamt hat *P. putida* sieben Kopien des rRNA-Operons (A-G) und in jeder dieser Kopien konnten Insertionsereignisse ermittelt werden.

Obwohl die rRNA-Operons für das Überleben der Zellen essentiell sind, scheint die Integration in nur eine Kopie das Wachstum von P. putida nicht weiter einzuschränken, denn im Vergleich zum wildtypischen P. putida KT2440 zeigen die Stämme keine Einbußen in ihrem Wachstumsverhalten, wie es z.B. für pig-r1 in Abb. 3.6 gezeigt ist. Für andere Organismen wurde bereits Vergleichbares nachgewiesen. So wird das Wachstum von Bacillus subtilis erst ab einer Deletion von fünf seiner zehn rRNA-Operons geringfügig eingeschränkt (Yano et al., 2013) und auch mit nur einer verbleibenden Kopie ist das Bakterium noch lebensfähig, obwohl es in Wachstum und Sporulation stark eingeschränkt ist (Nanamiya et al., 2010; Tanaka et al., 2013). Bei E. coli konnte sogar nachgewiesen werden, dass nach der Deletion von ein bis vier der insgesamt sieben rRNA-Operons über einen Regulationsmechanismus die Prozessivität der intakten Operons deutlich gesteigert werden kann, was unter den angelegten Bedingungen offenbar die für die Zelle entstehenden Nachteile minimiert (Condon et al., 1993). Eine einzige Kopie des rRNA-Operons reicht in E. coli aus, um 56 % der rRNA-Menge des noch alle sieben Kopien tragenden Wildtyps zu erreichen (Asai et al., 1999a). In Asai et al. (1999) wurde zudem gezeigt, dass die Promotoren der rRNA-Operons auch auf Plasmiden kodiert funktionell aktiv sind, wobei die zelleigenen Regulationsmechanismen scheinbar auch Plasmid-ständige rRNA-Operons beeinflussen (Asai et al., 1999a, 1999b).

Insgesamt scheinen die rRNA-Operons von *P. putida* aufgrund der für ihre Expression verantwortlichen starken Promotoren einen vielversprechenden Integrationsort für TREX-Gencluster-Transposons darzustellen, sodass eine Übertragung auf andere Organismen attraktiv erscheint. Zwischen den rRNA-Operons von *P. putida* und *E. coli* gibt es z.B. eine große Ähnlichkeit. In beiden Arten tragen die meisten Stämme sieben Kopien (Stoddard et al., 2014), deren Aufbau in der Anordnung von 16S, 23S und 5S rRNA fast gleich ist. Es liegen sogar ähnliche tRNA-Gene zwischen manchen Genen der 16S und 23S rRNAs (Duan et al.,

2014; Maeda et al., 2015) und beide haben jeweils zwei Promotorsequenzen in etwa gleichem Abstand zum Start des für die 16S rRNA kodierenden Gens (Brosius et al., 1981; Duan et al., 2014; Maeda et al., 2015). So könnten bei der Integration von TREX-Gencluster-Transposons in die rRNA-Operons von E. coli möglicherweise ähnliche Effekte zu erwarten sein, wie sie bereits in P. putida beobachtet werden konnten. Hierbei muss jedoch auch die Transkriptionsleistung der wirtseigenen RNA-Polymerasen beachtet werden. In P. putida liegen einzelne Gene, wie z.B. lapA, vor die mit 26 kb (Reva und Tümmler, 2008) bereits deutlich größer sind als die, mit etwa 17 kb, größte in E. coli nachgewiesene Transkriptionseinheit (Cho et al., 2009). Es könnte also sein, dass nicht jedes Bakterium gleichermaßen dazu in der Lage ist, mit seiner RNA-Polymerase große Gencluster vollständig zu exprimieren. In dieser Arbeit wurde für einige der erzeugten Prodigiosin-Produktionsstämme die Transkriptmenge des ersten (pigA) und letzten (pigN) Gens des pig-Genclusters untersucht, wobei klar gezeigt werden konnte, dass die Transkriptmenge von pigN um 70-90 % niedriger ist als die von pigA (vgl. Abb. 3.16). Die niedrigere Transkriptmenge des letzten gegenüber dem ersten pig-Gen könnte grundsätzlich auf dessen schwächere Bildung oder einen stärkeren Abbau zurückzuführen sein. Effektive mRNA-Abbaumechanismen können ein erzeugtes Transkript durchaus asymmetrisch abbauen. Wie in Loeschcke (2012) oder Arvani et al. (2012) beschrieben, können so spezifische sogenannte Transkript- oder Expressionsmuster eines Genclusters entstehen. Dieses Muster beschreibt den Zustand des Transkripts, der durch das Zusammenspiel von Transkription und Transkriptabbau zustande kommt. Hinzu kommt der grundsätzliche Effekt der Abnahme der Transkription durch nachlassende Effizienz der RNA-Polymerase, also eine sicherlich stärkere Bildung des pigA als des pigN Transkripts. Im hier vorgestellten Fall zeigten bis auf eine Ausnahme die Stämme mit einer höheren Menge an pigN Transkript auch eine höhere Produktionsleistung (Abb. 3.16). In zukünftigen Anwendungen könnte es also bei steigender Gencluster-Größe zu einer Abnahme der Transkriptionseffizienz der Gene am 3'-Ende des Genclusters und hierraus resultierend zur Abnahme der Biosyntheseleistung kommen.

Eine gezielte Integration in die rRNA-Operons erscheint, in Anbetracht der vorliegenden Daten, nicht unbedingt effizienter als die Nutzung der zufälligen Integration durch die vom TREX-System ermöglichten Tn5-Transposition, da so in sehr einfachen und zügigen Verfahren effiziente Produktionsstämme erzeugt werden konnten. Hierbei war (1) die Generierung

einer großen Zahl von das TREX-*pig*-Transposon tragenden Stämmen unproblematisch, innerhalb derer (2) mit 96 % ein relativ hoher Anteil an Produzenten vorkam, bei denen der Insertionsort in einem rRNA-Operon lag, welche (3) aufgrund der roten Farbe des Produkts einfach zu identifizieren waren. Für weitere Anwendungen müssen gegebenenfalls angepasste Strategien verwendet werden, um die kritische Voraussetzung der einfachen Identifizierung von Produzenten zu ermöglichen.

Des Weiteren kann aufgrund der sehr hohen Sequenzähnlichkeit zwischen den rRNA-Operons sowie ihrer *upstream region* (USR) (vgl. Anhang **Abb. 8.4**, **Tab. 8.2** und **Tab. 8.3**) nicht ausgeschlossen werden, dass es bei Anwendung einer Integrationsstrategie auf Basis von homologer Rekombination in mehreren rRNA-Operons zu einer Integration kommt, wohingegen dies beim Tn5-Transposon durch seine Selbstregulation weitestgehend verhindert wird (Choi und Kim, 2009; Mahnke Braam et al., 1999; Reznikoff, 1993; Schulz und Reznikoff, 1991). Auch in dieser Studie konnte in keinem der 52 Stämme eine Integration in mehr als einem rRNA-Operon nachgewiesen werden, eine etwaige unwahrscheinliche zweite Integration in einem anderen Locus wurde hier jedoch nicht weiter untersucht.

Insgesamt ergeben sich aus den gesammelten Daten drei vielversprechende Ansätze, diesen Integrationsort weiter nutzbar zu machen: (1) Die Expressionsleistung von in rRNA-Operons integrierten Genclustern könnte durch die Deletion von anderen rRNA-Operons gesteigert werden. (2) Die Promotorsequenz könnte direkt ins TREX-System integriert werden. (3) Die Promotorsequenz könnte für eine Plasmid-ständige Expression von Genclustern in *P. putida* genutzt werden.

Im folgenden Kapitel werden die Auswirkungen der Integration in unterschiedliche rRNA-Operons weiterführend diskutiert.

#### 4.2.2 Unterschiede zwischen den sieben rRNA-Operons

Neben der in **4.2.1** diskutierten, allgemein vielversprechenden Integration in die rRNA-Operons von *P. putida* konnten in dieser Arbeit jedoch auch Unterschiede im Bezug zur Prodigiosin-Produktion zwischen den verschiedenen Operons beobachtet werden.

Wie bereits beschrieben, wurde die Integration von TREX-*pig*-Transposons in allen sieben rRNA-Operons nachgewiesen. Dabei ist die Verteilung jedoch nicht gleichmäßig, so sind z.B. die Transposons von nur 4 % der Stämme in Operon F integriert, wohingegen Operon C 22 %

beinhaltet. Da insgesamt nur 50 Stämme untersucht worden sind, kann aufgrund der Tatsache, dass es mit sieben rRNA-Operons auch sieben potentielle Ziele gibt, hieraus noch keine sichere statistische Vorhersage getroffen werden, aber ein Trend ist klar erkennbar. Wird die Häufigkeit der Integration im Vergleich zum Abstand des chromosomalen Replikationsursprungs (oriC) betrachtet (vgl. Abb. 4.1), so fällt auf, dass die Operons A, C und D, in welche zusammen 62 % der Transposons integriert sind, nah an diesem liegen. Auffällig ist dabei jedoch, dass Operon B, welches nur 6 % der Integrationen aufweist, neben Operon A das am nächsten zum oriC gelegene Operon ist. Der insgesamt höhere Anteil an Integrationen in direkter Nähe zum oriC könnte daran liegen, dass die DNA in diesem Bereich durch die Replikation häufiger vorliegt als DNA, die näher am Replikationsterminator liegt (Miller und Simons, 1993), wodurch sich dieser Bereich häufiger als Ziel für die Transposition anbietet.

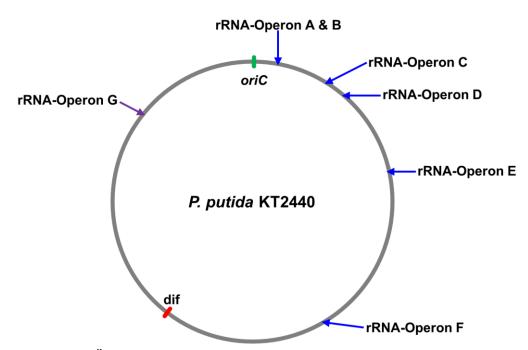


Abb. 4.1: Schematische Übersicht der Lokalisierung der sieben rRNA-Operons im Genom von *P. putida* KT2440 Die Lokalisation der rRNA-Operons (A-G) ist durch blaue Pfeile (auf dem (+) Strang des Chromosoms gelegen) oder violette Pfeile (auf dem (-) Strang des Chromosoms gelegen) markiert. Zu beachten ist hierbei, dass die Operons A und B direkt hintereinander liegen. Zusätzlich wurden anhand von Daten aus Aparicio et al. (2016) der Replikationsursprung (oriC, grüner Strich) sowie die Terminationssequenz (dif, roter Strich) markiert.

Werden nun die Produktionsleistungen der Stämme, deren Transposons im selben Operon integriert sind, gruppiert und deren Durchschnitt mit denen der jeweils anderen Operons verglichen, so ist klar erkennbar, dass die Integrationen in die Operons A, C und D im Durchschnitt auch eine höhere Produktionsleistung bewirken als die in die anderen. Dies könnte ebenfalls damit zusammenhängen, dass sie näher am oriC liegen (Abb. 4.1), denn aus

einer größeren DNA-Menge geht meist auch eine höhere Transkriptmenge hervor (Miller und Simons, 1993; Sousa et al., 1997). Auffällig ist hierbei wieder, dass Operon B im Durchschnitt nur eine geringe Produktionsleistung aufweist. Allerdings könnte diese mit der besonders geringen Anzahl an gefundenen Produzenten und deren relativ weit vom Promotor entfernten Integration der pig-Gene in diesem Operon zusammenhängen, denn die Produktionsleistung dieser ist auf etwa gleichem Niveau wie bei Stämmen der durchschnittlich viel produzierenden Operons, die einen etwa gleichen Abstand zum rRNA-Promotor aufweisen (vgl. Abb. 3.15). Insgesamt scheint es also eine unterschiedlich starke Expression zwischen den verschiedenen rRNA-Operons zu geben. Vergleichbares wurde bereits für Pseudomonas sp. UW4 (Duan et al., 2014) und E. coli W3110 (Maeda et al., 2015) gezeigt. Ein interessanter Unterschied hierbei ist jedoch, dass in E. coli W3110 mit rRNA-Operon E (rrnE) nicht das am nächsten zum oriC gelegene Operon die höchste Promotoraktivität zeigte (Maeda et al., 2015). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die unterschiedliche Lage der rRNA-Operons auf den verschiedenen Strängen des Chromosoms sein. Das Operon rrnE liegt auf dem Plusstrang, wohingegen die näher am oriC gelegenen Operons auf dem Minusstrang der anderen Seite des oriC liegen (Maeda et al., 2015). Aus dieser Anordung resultiert, dass sie durch die bidirektional ablaufende Replikation in unterschiedlichen Replichoren entweder eine diskontinuierliche oder eine kontinuierliche Replikation durchlaufen, was zu einer unterschiedlichen DNA-Menge führen kann (Aparicio et al., 2016). In Duan et al. (2014) zeigte der Promotor aus Operon E in Pseudomonas sp. UW4 die höchste Expressionsleistung. Ein Vergleich der Aktivität einer Reihe von Promotorsequenzen des rRNA-Operon E aus verschiedenen *Pseudomonas*-Arten ergab hierbei, dass der Promotor von rRNA-Operon E von P. putida KT2440 die niedrigste Promotoraktivität aufweist (Duan et al., 2014). Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit insofern, als dass die Integration der pig-Gene in dieses Operon tendenziell deutlich geringere Ausbeuten erbrachte als etwa in Operon A, C oder D. Um den Einfluss der Lage von TREX-Transposons in den rRNA-Operons und relativ zum oriC auf die Produktionsleistung abschließend beurteilen zu können, könnten in weiteren Studien größere Datensätze zu weiteren Erkenntnissen führen.

Trotz der hier und anderswo beobachteten Unterschiede in der Expression sind die genetischen Differenzen der Promotorsequenzen im Einzelnen erstaunlich gering. Werden die Promotorsequenzen sowie die gesamten *upstream regions* der verschiedenen rRNA-

Operons von P. putida KT2440 betrachtet, so sind keine deutlichen Unterschiede zu erkennen (Abb. 3.14 und Anhang Abb. 8.4). Auffällig ist jedoch, dass die größten Unterschiede bei den Operons E und F auftreten, die in dieser Studie die durchschnittlich gerinsten Produktionen erbrachten. Beide zeigen sowohl in der -10 als auch der -35 Region der zweiten Promotorsequenz Abweichungen im Vergleich zu den Promotoren der anderen Operons. Zusätzlich weisen diese beiden Operons große Unterschiede in der Region zwischen den beiden Promotorsequenzen auf. In diesem Bereich könnten regulatorisch relevante Sequenzen liegen, die in den Operons E und F für eine schwächere Expressionsleistung ausgehend von der zweiten Promotorsequenz sorgen könnten. Unterschiedliche Regulatoren in verschiedenen rRNA-Operons sind in der Literatur bereits bekannt (Condon et al., 1993; Duan et al., 2014; Maeda et al., 2015; Ogasawara et al., 1983). Zusammengenommen sind die Unterschiede in der Prodigiosin-Produktion durch die Integration des TREX-pig-Transposons in unterschiedliche rRNA-Operons sehr interessant. Denkbar wäre hier, wie bereitserwähnt, die Nutzung der stärksten Promotorsequenzen auf Plasmidebene. Die gezielte Integration in ein spezifisches rRNA-Operon durch HR ist jedoch, wie bereits in 4.2.1 beschrieben, aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen den unterschiedlichen Operons schwierig umsetzbar. Jedoch wäre es möglich, durch die Deletion von rRNA-Operons, die eine schwache Promotoraktivität aufweisen, die spätere Integration in ein Operon mit stärkerer Expressionsleistung zu begünstigen. In Kombination mit der in **4.2.1** aufgestellten Hypothese, dass in *P. putida* ähnlich wie in *E. coli* die Deletion von rRNA-Operons die Expressionsleistung der verbleibenden Operons gesteigert wird (Condon et al., 1993), könnte dies ein sehr vielversprechender Ansatz sein.

#### 4.3 Evaluation des yTREX-Systems

Im Rahmen dieser Arbeit stand das Ziel einer effektiven mikrobiellen Metabolitproduktion im Mittelpunkt. Daher wurde das yTREX-System auf Basis des TREX-Systems entwickelt. Die Intention dabei war, die Schwierigkeiten des TREX-Systems bei der mit üblichen Klonierungsstrategien sehr zeitaufwendigen Isolation und Markierung von Genclustern zu vermindern und gleichzeitig die grundlegenden Eigenschaften (1.5), die dieses System zu einem hervorragenden *screening tool* zur Identifikation von geeigneten Kombinationen aus Wirtsorganismus und Biosyntheseweg für eine erfolgreiche Metaboitsynthese machen, beizubehalten. Dies wurde durch die Ermöglichung der homologen Rekombination (HR) in

S. cerevisiae erfolgreich umgesetzt. Die HR bietet sich hierfür aufgrund ihrer hohen Flexibilität und schnellen Umsetzbarkeit an, beides Eigenschaften, die sich sehr gut mit dem Anwendungsgedanken des TREX-Systems, schnell und vielseitig einsetzbar zu sein, ergänzen. Die Integration der neu designten yTREX-Kassetten (Abb. 3.20) in einen shuttle Vektor für S. cerevisiae und E. coli ermöglicht hierbei eine außerordentlich schnelle Markierung eines Genclusters mit den yTREX-Kassetten. Die Isolation des Genclusters kann nahezu aus jeder beliebigen Quelle erfolgen, sei es aus einem Plasmid, aus eDNA einer Metagenom-Probe oder als künstlich synthetisiertes DNA-Fragment. Hierbei kann anders als bei Restriktionsendonuklease-basierter Klonierung besonders flexibel und Sequenz-unabhängig verfahren werden. Diese Flexibilität ist möglich, da die HR in S. cerevisiae folgende Eigenschaften aufweist: (1) Sehr kurze homologe Bereiche sind ausreichend für die HR (Kilaru et al., 2006; Oldenburg et al., 1997). (2) Die Größe der Fragmente ist dabei unerheblich, sowohl sehr kleine (Raymond et al., 1999) als auch sehr große Fragmente (Benders et al., 2010; Gibson et al., 2008b) können miteinander rekombiniert werden. (3) Es können viele DNA-Fragmente in einem Schritt rekombiniert werden (Benders et al., 2010; Gibson et al., 2008b; Kilaru und Steinberg, 2015; van Leeuwen et al., 2015). Die HR in Hefe wird in aktuellen Studien bereits vermehrt für die Klonierung von Genclustern eingesetzt, so zum Beispiel in Form des sogenannten TAR- (transformation-associated recombination) Systems, was zur selektiven Isolierung bestimmter Sequenzen aus genomischen DNA-Gemischen eingesetzt wird (Baltz, 2016; Kim et al., 2015; Li et al., 2015), oder durch die DNA-Assembler Methode, die die Rekomination mehrerer DNA-Fragmente in einem Schritt bezeichnet (Bilyk et al., 2016). Diese beiden Systeme verwenden dieselben grundlegenden Prinzipien. Sie basieren alle auf homologen Bereichen zwischen den einzelnen Fragmenten, die von der Hefe zu einem DNA-Fragment rekombiniert werden, z.B. einem Plasmid oder einem linearen YAC (yeast artificial chromosome) (Kim et al., 2015; Larionov et al., 1996). Das von Larionov et al. (1996) beschriebene TAR-System wurde zuerst für die Isolation von Genregionen aus dem menschlichen Genom eingesetzt. Darauf basierend wurden Isolierungsverfahren für Gencluster aus eDNA entwickelt, die bereits erfolgreich eingesetzt werden konnten, so z.B. für das etwa 60 kb große Flurostatin-Gencluster (Kim et al., 2010) oder das etwa 38 kb große Surfactin-Gencluster (Li et al., 2015). Bei der sogenannten DNA-Assembler Methode werden verschiedene DNA-Fragmente z.B. durch PCR erzeugt, die zueinander homologe Bereiche aufweisen, um miteinander rekombiniert werden zu können.

Dies bietet sich vor allem an, wenn nicht das native Gencluster isoliert werden soll, sondern eine manipulierte Version davon, so wie von Montiel et al. (2015) für das Rebeccamycin-Gencluster gezeigt. Dabei wurden zusätzliche Promotoren über HR in das eigentlich stille Gencluster integriert, um den kodierten Biosyntheseweg zu aktivieren. Die Grenzen zwischen TAR und DNA-Assembler verschwimmen jedoch zum Teil, so wird häufig von TAR gesprochen, obwohl eigentlich PCR-basierte Stücke miteinander rekombiniert werden, wie bei Bilyk und Luzhetskyy (2016) im Fall des Grecocyklin-Genclusters. Insgesamt finden auf HR basierende Techniken in der heterologen Naturstoffsynthese eine immer größere Bedeutung (Baltz, 2016; Bilyk et al., 2016; Katz und Baltz, 2016; Kim et al., 2015; Zhang et al., 2016). Das yTREX-System ist aufgrund seines Aufbaus, der Integration in den yTREX shuttle Vektor (Abb. 3.20 und Abb. 3.21 C) und durch die variabel austauschbare cluster integration site sowohl für TAR als auch DNA-Assembler Ansätze geeignet, bietet hier also eine hohe Vielseitigkeit. Neben der HR gibt es auch in vitro Alternativen für die Gencluster-Klonierung, so wie das Gibson Assembly® (Gibson et al., 2008a) oder die von Zhang et al. (2008) entwickelte sitespecific recombination-based tandem assembly (SSRTA)-Methode. Für das Gibson Assembly werden ebenfalls HB zwischen den unterschiedlichen Fragmenten gebraucht, die in vitro durch drei enzymatische Schritte miteinander rekombiniert werden (Gibson et al., 2008a). Die grundsätzliche Anwendung des Gibson Assembly® ist mit jedem Plasmid möglich, sodass sie bei Bedarf auch mit dem yTREX shuttle Vektor zur Resktrikionsendonuklease-freien Klonierung von DNA-Fragmenten eingesetzt werden könnte. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Hefe-basierten HR ist dieses Verfahren allerdings weniger dazu geeignet, auch gezielt Gencluster beispielsweise aus Metagenom-Proben zu isolieren. Die SSRTA-Methode basiert auf der Integrase des Streptomyces Phagen φBT1. Hierbei werden spezifische Paare von attB- und attP-Sequenzen durch die Integrase miteinander rekombiniert (Zhang et al., 2008b, 2010), wofür insgesamt 16 mögliche Kombinationen zur Verfügung stehen (Zhang et al., 2011). Dieses System wurde bereits erfolgreich zur Klonierung eines 62 kb großen Epothilon-Genclusters eingesetzt (Zhang et al., 2011). Ein Nachteil hierbei ist jedoch, dass es nur eine limitierte Anzahl an nutzbaren attB/attP Paaren gibt, was bei der Umstrukturierung großer Gencluster zu Problemen führen könnte. Hinzu kommt, dass diese Sequenzen nach der Rekombination zwischen den rekombinierten DNA-Fragmenten verbleiben, also sogenannte DNA-Narben bilden, wodurch sich Probleme bei einer späteren Expression des Genclusters ergeben könnten. In Zhang et al. (2011) wurde das mit 24 kb sehr große *epoD*-Gen zunächst mit der SSRTA-Methode aus vier Teilen rekombiniert und anschließend in das restliche Gencluster integriert. Zwischen den vier Teilen dieses Gens lagen also DNA-Narben vor. In diesem konkreten Beispiel führten diese DNA-Narben bei der Expression der Epothilon-Gene zu keinen erkennbaren Problemen, trotzdem sind derartige Probleme nicht auszuschließen (Ellis et al., 2011).

Durch die Ermöglichung der HR im yTREX-System wurde die ohnehin große Vielseitigkeit des TREX-Systems noch erweitert. Das TREX-System wurde also um eine moderne Methode zur Klonierung von Genclustern ergänzt, die bereits erfolgreich für die Klonierung unmanipulierter (Bilyk et al., 2016; Kim et al., 2010; Li et al., 2015) sowie manipulierter Gencluster (Baltz, 2016; Montiel et al., 2015) eingesetzt wurde.

#### 4.3.1 Überprüfung der Funktionalität des yTREX-Systems am pig-Gencluster

Die Funktionalität des yTREX-Systems, sowohl im Hinblick auf die TREX-Eigenschaften als auch die Fähigkeit zur HR, wurde am Beispiel des pig-Genclusters bewiesen. Das 21 kb große pig-Gencluster konnte in einem Schritt durch HR in den yTREX shuttle Vektor übertragen werden, sodass es anschließend möglich war, Prodigiosin-produzierende Stämme zu erzeugen. Diese basieren, wie die mit dem TREX-System erzeugten Prodigiosin-Produktionsstämme, auf der Integration hinter einem starken nativen Promotor, exprimieren das Gencluster also unabhängig von einer T7RP. Die erzielten Prodigiosin-Ausbeuten des mit dem yTREX-System erzeugten Stammes P. putida pig-y1 waren unter gleichen Produktionsbedingungen sogar um den Faktor 2 bis 3 höher als die maximal erreichten Ausbeuten mit P. putida pig-r1, welcher mit dem ursprünglichen TREX-System erzeugt wurde. Dies könnte auf die kürzere Distanz zwischen dem für die Expression verantwortlichen Promotor und dem pig-Gencluster zurückzuführen sein. Dieser geringere Abstand ergibt sich zum einen aus den in der Größe reduzierten und in der Anordnung geänderten yTREX-Kassetten (Abb. 3.20), wodurch der TREX-Bereich zwischen dem 5'-Ende des Genclusters und dem äußeren Ende des Transposons in der neuen Variante des Systems verkürzt ist. Zum anderen verringert sich der Abstand des Weiteren dadurch, dass nur der pig-Genclusterbereich von pigA bis pigN in den yTREX shuttle Vektor rekombiniert wurde. Dadurch fehlt gegenüber den Konstrukten mit dem ursprünglichen TREX-System das cueR Gen vor piqA. Die Distanz zwischen piqA und dem OE der L-TREX-Kassette und somit auch der Abstand zum genutzten Wirtspromotor verringert sich dadurch um etwa 2 kb. Dass ein geringerer Abstand zum Promotor in einer höheren Prodigiosin-Produktion resultieren kann, ist in dieser Arbeit bereits anhand der mit dem TREX-System erzeugten Stämme gezeigt worden (3.2.4). Diese Konstellation könnte somit die möglicherweise vorhandene Tendenz, dass mittels yTREX-System erzeugte Stämme höhere Produktausbeuten erzielen, erklären. Durch diesen kürzeren Abstand könnten weiterhin, neben den rRNA-Operon-Promotoren, weitere starke native Promotorsequenzen in *P. putida* identifiziert werden. Ein Punkt, der hierfür sprechen könnte, ist der hier beobachtete höhere Anteil an Prodigiosin-produzierenden Stämmen nach der Konjugation bei Verwendung von yTREX im Vergleich zur Verwendung von TREX. Eine weitere Untersuchung der Lokalisation der mit dem yTREX-System erzeugten Prodigiosin-produzierenden Stämme könnte also sehr vielversprechend sein, um möglicherweise neue Promotorkandidaten für eine effektive heterologe Genexpression in *P. putida* zu identifizieren.

Zusammenfassend konnte am Beispiel des *pig*-Genclusters gezeigt werden, dass das yTREX-System erfolgreich die Eigenschaften des TREX-Systems mit den Möglichkeiten der HR in *S. cerevisiae* verbindet. Hieraus ergeben sich interessante Anwendungsmöglichkeiten, auch in Bezug auf bereits in **4.1.2** und **4.2.1** diskutierte Punkte, die im Folgenden näher betrachtet werden.

#### 4.3.2 Perspektiven in der Anwendung des yTREX-Systems

Die aktuelle Forschung bietet Zugang zu genetischen Biosynthese-Informationen in zunehmender Größenordnung. Neben den durch Metagenomstudien identifizierten Genclustern bieten moderne bioinformatische Methoden eine immer größere Anzahl an neu identifizierten Genclustern, die für die Biosynthesewege von potentiell pharmakologisch interessanten Sekundärmetaboliten kodieren könnten.

Durch *Next-Generation Sequencing* Techniken (Loman et al., 2012; Vincent et al., 2015) steigt nicht nur die Anzahl an sequenzierten bakteriellen Genomen (Land et al., 2015), sondern auch die Menge an zugänglichen Sequenzdaten aus Metagenom-Studien (Vincent et al., 2015) rasant an. Durch den Metagenomansatz erhöht sich die zur Verfügung stehende Sequenzdatenmenge gewaltig, denn es werden nicht nur die ca. 1 % der kultivierbaren Mikroorganismen (Akondi und Lakshmi, 2013; Handelsman, 2004) abgedeckt, sondern potentiell auch die restlichen 99 %, sofern sie in einer Metagenom-Probe vorkommen. Durch moderne bioinformatische *tools* zur Identifikation von Sekundärmetabolit-Biosyntheseweg-

kodierenden Genclustern wie antiSMASH (Weber et al., 2015) oder ClustScan (Starcevic et al., 2008) ergeben sich wiederum die Möglichkeiten, diese große Sequenzdatenmenge effizient zu untersuchen, also das sogenannte genome mining zu betreiben (Ziemert et al., 2016). Neben einer Zugänglichkeit durch Verwendung der Online-Tools dieser Programme, sind viele Informationen über neu entdeckte Gencluster in Datenbanken wie die MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster) bereits zusammengefasst erhältlich (Medema et al., 2015). Um jedoch Nutzen aus diesen potentiell für neue Sekundärmetabolit-Biosynthesewege-kodierenden Genclustern ziehen zu können, ist es notwendig, im Labor effektiv Zugang zu diesen Stoffen zu erhalten, um sie auf ihre Wirksamkeit hin analysieren zu können.

Es konnten in den letzten Jahren bereits viele Substanzen, die neu entdeckten Genclustern zuzuordnen und mögliche Wirkstoffkandidaten sind, identifiziert werden (Katz et al., 2016; Ziemert et al., 2016). Dabei besteht weiterhin ein großer Bedarf an molekularbiologischen *tools*, die diese Gencluster schnell und effizient isolieren und heterolog exprimieren können (Katz et al., 2016; Katz und Baltz, 2016; Kim et al., 2015; Luo et al., 2015; Ziemert et al., 2016). Durch die Ermöglichung der HR in *S. cerevisiae* wurde das TREX-System zum yTREX-System erweitert, welches genau diese Möglichkeit bietet. Durch die HR ergibt sich eine besonders effektive Anwendbarkeit, Gencluster schnell im Ganzen, z.B. aus eDNA oder genomischer DNA, zu isolieren und ins yTREX-System einzubringen (Baltz, 2016; Kim et al., 2010; Li et al., 2015).

Ein zusätzlicher Vorteil der HR ist die methodisch leichte Manipulierbarkeit von Genclustern, etwa zum Zweck der Produktionsoptimierung oder Produktderivatisierung. Durch HR können verschiedene DNA-Fragmente nahezu beliebig miteinander kombiniert werden, woraus sich immense Anwendungsmöglichkeiten ergeben, die im Folgenden mit direktem Bezug zu dieser Arbeit näher betrachtet werden:

(1) Die Gene innerhalb eines in nativer Form komplexen Genclusters können unidirektional rearrangiert werden. Dies bietet die in **4.2** bereits beschriebene Möglichkeit, dass das Gencluster nach der zufälligen Integration ins Wirtsgenom unter Kontrolle eines starken nativen Promotors exprimiert wird. Hierdurch könnten mit dem yTREX-System, analog zu den in dieser Arbeit vorgestellten Prodigiosin-Produktionsstämmen, kompetetive Produktionsstämme für andere Sekundärmetabolite erzeugt werden. Neben potentiell höheren Ausbeuten gegenüber einer bidirektionalen Expression, wie sie bei der

Prodigiosinsynthese beobachtet wurde, bietet diese Methode auch den Vorteil der einfacheren und schnelleren Anwendung, da keine zusätzliche T7RP sowie auch keine Induktion selbiger nötig ist.

- (2) Um nach einer TREX-vermittelten Integration eines Genclusters in einen Produktionswirt produzierende Stämme effektiv identifizieren zu können, kann zusätzlich ein geeigneter Expressionsmarker in das Transposon aufgenommen werden. So können zunächst das Gencluster transkribierende Stämme isoliert und unter ihnen produzierende Stämme gesucht werden. Eine solche Manipulation ist mittels HR leicht umzusetzen und addressiert einen Aspekt, der eine essentielle Grundvoraussetzung für eine effektive Nutzung der randomisierten chromosomalen Integration darstellt (vgl. 3.4.5).
- (3) Bei hinreichendem Wissenstand über den kodierten Biosyntheseweg können durch die Deletion bestimmter Gene Stämme für den Einsatz in der Muta- und/oder Semisynthese geschaffen werden. Muta- und Semisynthese wurden bereits in **4.1.2** für den Prodigiosin-Biosyntheseweg diskutiert, sie stellen aber auch in vielen anderen Biosynthesewegen eine vielversprechende Quelle für die Erschließung neuer pharmakologisch wertvoller Naturstoffe dar (Bilyk und Luzhetskyy, 2016; Eichner et al., 2012; Kennedy, 2008; Kronenwerth et al., 2014; Maier, 2015; Sahner et al., 2015a).
- (4) Durch die Möglichkeit zur Kombination verschiedener Gencluster, verschiedener Gencluster-Fragmente sowie zusätzlicher Elemente wie Promotoren, Transportern oder Regulatoren können pathway und metabolic engeneering Ansätze verfolgt werden. Hierfür gibt es verschiedenste Strategien (Pickens et al., 2011; Smanski et al., 2016; Zhang et al., 2016). So wäre die Änderung der Promotoren (Montiel et al., 2015) genau wie die unterschiedliche Regulation der verschiedenen Gene innerhalb des Genclusters möglich (Xu et al., 2016). Darüber hinaus könnten, ähnlich wie in Martin et al. (2003) beschrieben, zusätzlich die Biosynthesewege von Vorstufen eingebracht werden. Hier wurde der in E. coli natürlich nicht vorkommende MVA-Weg zur Steigerung der Terpen-Produktion erfolgreich in den Organismus integriert (Martin et al., 2003; Pitera et al., 2007).

Einige dieser Anwendungsmöglichkeiten wurden in der im Rahmen dieser Dissertation betreuten Masterarbeit von Robin Weihmann (Weihmann, 2016) erfolgreich umgesetzt. Die Möglichkeiten zur Manipulation von Genclustern durch die Klonierung über HR mit dem yTREX *shuttle* Vektor wurden am Beispiel des Violacein-Biosyntheseweges von *C. violaceum* gezeigt. So konnten mit dem yTREX-System durch HR in *S. cerevisiae* insgesamt drei

Varianten des *vio*-Genclusters erzeugt werden. Nach der Anwendung dieser yTREX-*vio*-Varianten zur Integration im Chromosom von *P. putida* KT2440 entstanden unterschiedliche Stämme, die jeweils unterschiedliche Sekundärmetabolite bzw. unterschiedliche Kombinationen von Sekundärmetaboliten des Violacein-Biosyntheseweges produzierten (vgl. **Tab. 3.4**). Des Weiteren war es möglich, erfolgreich die Anwendung eines über HR zusätzlich zum Gencluster integrierten Expressionsmarkers am Beispiel einer Variante des *phz*-Genclusters aus *P. aeruginosa* zu etablieren. In dieser Variante des Genclusters entsteht PCA (Phenazin-1-Carbonsäure) als Produkt des Biosyntheseweges, eine sehr schwach gelbe Substanz, deren Produktion nicht wie bei Prodigiosin über einen farbigen Phänotyp der Produzenten festgestellt werden kann. Durch den Einsatz von *lacZ* als Expressionsmarker konnte direkt nach der Erzeugung von entsprechenden *P. putida* Stämmen durch yTREX-vermittelte Integration der *phz*-Gene zusammen mit *lacZ* ins bakterielle Chromosom auf transkribierende und in diesem Fall auch produzierende Stämme selektiert werden (Weihmann, 2016).

Zusammengefasst bietet das yTREX-System also eine immense Vielseitigkeit in seinen Anwendungsmöglichkeiten. Diese basiert auf dem durch die homologe Rekombination zugänglichen breiteren Spektrum an Genclustern sowie deren leichter Manipulierbarkeit, gepaart mit den Fähigkeiten des TREX-Systems als effektives screening tool zur schnellen Identifikation von geeignete Kombinationen an Wirtsorganismus und Biosyntheseweg für eine erfolgreiche Metabolitsynthese. Durch die Etablierung dieses synthetic biology tools wurde neben einem effizienten Zugang zu neuen potentiell wertvollen Gencluster-kodierten Sekundärmetaboliten auch die Möglichkeit zum effektiven pathway und metabolic engeneering geschaffen.

### 5 Zusammenfassung

Mikroorganismen sind eine nahezu unerschöpfliche Quelle für Sekundärmetabolite. Viele dieser Naturstoffe weisen dabei pharmazeutisch wertvolle Eigenschaften auf und der Bedarf an neuen Pharmazeutika wächst stetig. Da die Kultivierung vieler natürlicher Sekundärmetabolit-Produzenten im Labor nicht oder nur eingeschränkt möglich ist, können solche Naturstoffe häufig nur in wirtsfremden Mikroorganismen effizient produziert werden. Diese heterologe Expression ist jedoch aufgrund der Kodierung der meisten Sekundärmetabolit-Biosynthesewege in sogenannten Genclustern mit verschiedenen Herausforderungen verbunden. So muss z.B. die stabile Etablierung des jeweiligen Genclusters im Expressionswirt sowie eine effektive Expression sämtlicher Gene gewährleistet werden. Das zuvor in der AG Drepper (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) entwickelte <u>Transfer</u> and Expression- oder kurz TREX-System stellt ein molekularbiologisches tool dar, das dies ermöglichen kann. Bislang konnte gezeigt werden, dass sich das TREX-System grundsätzlich als screening tool eignet, um schnell geeignete Kombinationen von Wirtsorganismen und Biosynthesewegen identifizieren zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das TREX-System erstmals gezielt zur effektiven Metabolitproduktion eingesetzt und die hierfür relevanten Aspekte beleuchtet. Desweiteren wurde das System weiterentwickelt, um eine schnelle Generierung neuer Produktionsstämme zu gewährleisten.

Zunächst wurde das TREX-System zur Erzeugung von kompetitiven Produktionsstämmen durch randomisierte chromosomale Gencluster-Integration eingesetzt. Bei diesem Ansatz wurden auf Basis des Expressionswirtes *Pseudomonas putida* erfolgreich 52 Stämme erzeugt, die das pharmazeutisch wirksame Tripyrrol Prodigiosin mit einer Ausbeute von bis zu 94 mg/L produzieren. Die hohen Produktionsleistungen resultieren dabei daraus, dass das unidirektional angeordnete *pig*-Gencluster aus *Serratia marcescens* bei der TREX-basierten zufälligen Tn5-Transposition hinter einen starken nativen Promotor des Wirtes integriert wurde. Mittels PCR und DNA-Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass bei 96 % dieser Stämme das wirtsfremde Gencluster in einem der sieben rRNA-Operons von *P. putida* lag. Interessanterweise konnte ein direkter Bezug zwischen dem genauen Insertionsort und der Produktionsleistung identifiziert werden. So bewirkt einerseits die Lokalisation der Zielgene in den verschiedenen rRNA-Operons eine unterschiedlich starke Produktion und

anderseits wirkt sich ein kurzer Abstand zum jeweiligen rRNA-Operon-Promotor positiv auf die Produktionsleistung aus.

Zur Erzeugung von Prodigiosin-Derivaten wurde auf Grundlage eines effizienten Prodigiosin-Produzenten durch eine Gendeletion ein Stamm erzeugt, der in der Biosynthese der Prodigiosinvorstufe MAP defizient ist. Mit diesem Stamm konnten von Andreas Sebastian Klein (Institut für Bioorganische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) erfolgreich Mutasynthese-Experimente zur Erzeugung von Prodigiosin-Derivaten durchgeführt werden. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit das yTREX-System erzeugt und am Beispiel des *pig*-Genclusters evaluiert. Diese Weiterentwicklung des TREX-Systems kombiniert dessen Transfer- und Expressionsfunktion mit der Möglichkeit zur homologen Rekombination in Hefe, welche die Klonierung von großen Genclustern erheblich erleichtert. Des Weiteren schafft die homologe Rekombination vielfältige Möglichkeiten der Manipulation von Gencluster-kodierten Biosynthesewegen. Dadurch ergibt sich ein immenses Potential, neue pharmazeutisch wertvolle Sekundärmetabolite schnell für die heterologe Produktion zugänglich zu machen oder vorhandene zu optimieren.

#### 6 Summary

Microorganisms provide an almost inexhaustible source for secondary metabolites. Numerous natural compounds exhibit valuable pharmaceutical properties and the demand for new drugs is growing steadily. Since the cultivation of many natural producers under standard laboratory conditions is limited or even impossible, heterologous expression is often the only possibility to gain access to such natural compounds. However, as most of the secondary metabolite biosynthetic pathways are encoded in so called gene clusters, the heterologous expression is associated with several challenges, since the stable establishment as well as the effective expression of all genes has to be accomplished. The <u>tr</u>ansfer and <u>expression</u> or shortly TREX system, developed in the AG Drepper (Institute of Molecular Enzymtechnolog, Heinrich Heine University Düsseldorf) represents a molecular genetic tool which can enable this. So far, it could be demonstrated that the TREX system is generally suitable to allow a quick identification of appropriate combinations of expression hosts and biosynthetic pathways. In this study, the TREX system was applied for the first time with the aim to generate effective metabolite production strains. In addition, it was further developed towards rapid applicability for production strain generation.

First, the TREX system was employed to generate competitive secondary metabolite production strains. Based on the versatile expression host *Pseudomonas putida*, 52 production strains of the pharmaceutically valuable secondary metabolite prodigiosin were successfully generated, leading to production titers of up to 94 mg/L. By using PCR and DNA sequencing techniques it could be demonstrated that constitutive expression of the unidirectionally organised *pig* gene cluster from *Serratia marcescens* was achieved by random TREX based Tn5-transposition behind strong host promoters. Remarkably, in 96 % of these strains the insertion locus was located in one of the seven rRNA operons of *P. putida*. Here, a correlation between the precise insertion site and the production output could be demonstrated. On the one hand, the localization of the target genes in the different rRNA-operons influences the production level and on the other hand, a short distance to the respective rRNA operon promoter has a positive effect on the production output.

To generate new prodigiosin derivatives, one of the prodigiosin production strains generated in this study was subsequently mutated resulting in a strain that is deficient in the biosynthesis of the prodigiosin precursor MAP. This strain could successfully be used by

Andreas Sebastian Klein (Institute of Bioorganic Chemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf) in mutasynthesis experiments to produce several prodigiosin derivatives.

Furthermore, in this study the yTREX system was created and evaluated using the *pig* gene cluster as an example. This improved TREX system combines gene transfer and expression properties with the possibility to perform homologous recombination in yeast. Beside simplified cloning of large gene clusters, this results in a versatile applicability for the manipulation of biosynthetic pathways encoded by clustered genes. In summary yTREX has an immense potential to produce new pharmaceutically valuable secondary metabolites and derivatives thereof.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adams, J. M., und Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 281, 1322–1326. doi:10.1126/science.281.5381.1322.
- Akondi, K. B., und Lakshmi, V. V. (2013). Emerging trends in genomic approaches for microbial bioprospecting. *OMICS*. 17, 61–70. doi:10.1089/omi.2012.0082.
- Alma'abadi, A. D., Gojobori, T., und Mineta, K. (2015). Marine metagenome as a resource for novel enzymes. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13, 290–295. doi:10.1016/j.gpb.2015.10.001.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Aparicio, T., Jensen, S. I., Nielsen, A. T., de Lorenzo, V., und Martínez-García, E. (2016). The Ssr protein (T1E\_1405) from *Pseudomonas putida* DOT-T1E enables oligonucleotide-based recombineering in platform strain *P. putida* EM42. *Biotechnol. J.* 11, 1–11. doi:10.1002/biot.201600317.
- Arciszewska, L. K., Drake, D., und Craig, N. L. (1989). Transposon Tn7. *J. Mol. Biol.* 207, 35–52. doi:10.1016/0022-2836(89)90439-7.
- Arvani, S., Markert, A., Loeschcke, A., Jaeger, K. E., und Drepper, T. (2012). A T7 RNA polymerase-based toolkit for the concerted expression of clustered genes. *J. Biotechnol.* 159, 162–171. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.01.004.
- Asai, T., Condon, C., Voulgaris, J., Shen, B., Al-omar, M., Squires, C., et al. (1999a). Construction and initial characterization of *Escherichia coli* strains with few or no intact chromosomal rRNA operons. *J. Bacteriol.* 181, 3803–3809.
- Asai, T., Zaporojets, D., Squires, C., und Squires, C. L. (1999b). An *Escherichia coli* strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: complete exchange of rRNA genes between bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1971–1976. doi:10.1073/pnas.96.5.1971.
- Backman, K., und Ptashne, M. (1978). Maximizing gene expression on a plasmid using recombination in vitro. *Cell* 13, 65–71. doi:10.1016/0092-8674(78)90138-1.
- Bae, J., Moon, H., Oh, K., Kim, C., Lee, D. S., Kim, W., et al. (2001). A novel bioreactor with an internal adsorbent for integrated fermentation and recovery of prodigiosin-like pigment produced from *Serratia sp.* KH-95. *Biotechnol. Lett.* 23, 1315–1319. doi:10.1263/jbb.101.157.

- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Frey, J., et al. (1981). Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas. Gene* 16, 237–247. doi:10.1016/0378-1119(81)90080-9.
- Baltz, R. H. (2016). Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 343–370. doi:10.1007/s10295-015-1682-x.
- Barriere, S. L. (2015). Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance. *Expert Opin. Pharmacother.* 16, 151–153. doi:10.1517/14656566.2015.983077.
- Basit, F., Cristofanon, S., und Fulda, S. (2013). Obatoclax (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. *Cell Death Differ*. 20, 1161–1173. doi:10.1038/cdd.2013.45.
- Benders, G. A., Noskov, V. N., Denisova, E. A., Lartigue, C., Gibson, D. G., Assad-Garcia, N., et al. (2010). Cloning whole bacterial genomes in yeast. *Nucleic Acids Res.* 38, 2558–2569. doi:10.1093/nar/gkq119.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo).* 58, 1–26. doi:10.1038/ja.2005.1.
- Beuttler, H., Hoffmann, J., Jeske, M., Hauer, B., Schmid, R. D., Altenbuchner, J., et al. (2011). Biosynthesis of zeaxanthin in recombinant *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1137–1147. doi:10.1007/s00253-010-2961-0.
- Biggs, B. W., De Paepe, B., Santos, C. N. S., De Mey, M., und Kumaran Ajikumar, P. (2014). Multivariate modular metabolic engineering for pathway and strain optimization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 29, 156–162. doi:10.1016/j.copbio.2014.05.005.
- Bilyk, O., und Luzhetskyy, A. (2016). Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 42, 98–107. doi:10.1016/j.copbio.2016.03.008.
- Bilyk, O., Sekurova, O. N., Zotchev, S. B., und Luzhetskyy, A. (2016). Cloning and heterologous expression of the grecocycline biosynthetic gene cluster. *PLoS One*, 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0158682.
- Birnboim, H. C., und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523. doi:10.1093/nar/7.6.1513.

- Blank, L. M., Ebert, B. E., Buehler, K., Bu, B., Editors, R., Buerk, D., et al. (2010). Redox biocatalysis and metabolism: molecular mechanisms and metabolic network analysis. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 349–394. doi:10.1089/ars.2009.2931.
- Blin, K., Medema, M. H., Kazempour, D., Fischbach, M. A., Breitling, R., Takano, E., et al. (2013). antiSMASH 2.0--a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res.* 41, 204–212. doi:10.1093/nar/gkt449.
- Bode, H. B., und Müller, R. (2005). The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angew. Chemie Int. Ed.* 44, 6828–6846. doi:10.1002/anie.200501080.
- Boronat, A., und Rodríguez-Concepcón, M. (2014). Terpenoid biosynthesis in prokaryotes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 148, 3–18. doi:DOI 10.1007/10\_2014\_285.
- Brieke, C., Kratzig, V., Haslinger, K., Winkler, A., und Cryle, M. J. (2015). Rapid access to glycopeptide antibiotic precursor peptides coupled with cytochrome P450-mediated catalysis: towards a biomimetic synthesis of glycopeptide antibiotics. *Org. Biomol. Chem.* 13, 2012–2021. doi:10.1039/c4ob02452d.
- Brigulla, M., und Wackernagel, W. (2010). Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1027–1041. doi:10.1007/s00253-010-2489-3.
- Brosius, J., Dull, T. J., Amii, D. D. S., und Noller, H. F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 148, 107–127. doi:10.1016/0022-2836(81)90508-8.
- Byers, K. J. R. P., Bradshaw, H. D., und Riffell, J. a (2014). Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (Mimulus). *J. Exp. Biol.* 217, 614–623. doi:10.1242/jeb.092213.
- Carbonell, P., Planson, A.-G., Fichera, D., und Faulon, J.-L. (2011). A retrosynthetic biology approach to metabolic pathway design for therapeutic production. *BMC Syst. Biol.* 5, 1–18. doi:10.1186/1752-0509-5-122.
- Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G., und Lattanzio, V. (2015). Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 26378–26394. doi:10.3390/ijms161125967.
- Chao, D. T., und Korsmeyer, S. J. (1998). BCL-2 FAMILY: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 395–419. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.395.

- Chawrai, S. R., Williamson, N. R., Salmond, G. P. C., und Leeper, F. J. (2008). Chemoenzymatic synthesis of prodigiosin analogues-exploring the substrate specificity of PigC. *Chem. Commun. (Camb).* 16, 1862–1864. doi:10.1039/b719353j.
- Chen, W.-C., Yu, W.-J., Chang, C.-C., Chang, J.-S., Huang, S.-H., Chang, C.-H., et al. (2013). Enhancing production of prodigiosin from *Serratia marcescens* C3 by statistical experimental design and porous carrier addition strategy. *Biochem. Eng. J.* 78, 93–100. doi:10.1016/j.bej.2013.02.001.
- Cho, B.-K., Zengler, K., Qiu, Y., Park, Y. S., Knight, E. M., Barrett, C. L., et al. (2009). The transcription unit architecture of the *Escherichia coli* genome. *Nat. Biotechnol.* 27, 1043–1049. doi:10.1038/nbt.1582.
- Choi, K. H., und Kim, K. J. (2009). Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 217–228. doi:10.4014/jmb.0811.669.
- Choi, K.-H., Gaynor, J. B., White, K. G., Lopez, C., Bosio, C. M., Karkhoff-Schweizer, R. R., et al. (2005). A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* 2, 443–448. doi:10.1038/nmeth765.
- Choi, S. Y., Yoon, K. H., Lee, J. II, und Mitchell, R. J. (2015). Violacein: Properties and production of a versatile bacterial pigment. *Biomed Res. Int.* doi:10.1155/2015/465056.
- Chung, B. K.-S., und Lee, D.-Y. (2012). Computational codon optimization of synthetic gene for protein expression. *BMC Syst. Biol.* 6, 1–14. doi:10.1186/1752-0509-6-134.
- Condon, C., French, S., Squires, C., und Squires, C. L. (1993). Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies. *EMBO J.* 12, 4305–4315.
- Cragg, G. M., und Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1830, 3670–3695. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
- Cragg, G. M., Newman, D. J., und Snader, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* 60, 52–60. doi:10.1021/np9604893.
- Cummings, M., Breitling, R., und Takano, E. (2014). Steps towards the synthetic biology of polyketide biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 351, 116–125. doi:10.1111/1574-6968.12365.
- Darshan, N., und Manonmani, H. K. (2015). Prodigiosin and its potential applications. *J. Food Sci. Technol.* 52, 5393–5407. doi:10.1007/s13197-015-1740-4.

- Darshan, N., und Manonmani, H. K. (2016). Prodigiosin inhibits motility and activates bacterial cell death revealing molecular biomarkers of programmed cell death. *AMB Express* 6, 1–12. doi:10.1186/s13568-016-0222-z.
- Demain, A. L. (1974). How do antibiotic-producing microorganisms avoid suicide. *Ann. New York Acad. Sci.* 235, 601–612.
- Dewick, P. M. (2002). The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* 19, 181–222. doi:10.1039/np9971400111.
- Domröse, A., Klein, A. S., Hage-Hülsmann, J., Thies, S., Svensson, V., Classen, T., et al. (2015). Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*. *Front. Microbiol.* 6, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2015.00972.
- Drepper, T., Arvani, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., und Jaeger, K.-E. (2005). High-level transcription of large gene regions: a novel T 7 RNA-polymerase-based system for expression of functional hydrogenases in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus. Biochem. Soc. Trans.* 33, 56–58. doi:10.1042/BST0330056.
- Drew, S. W., und Demain, a L. (1977). Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 343–356. doi:10.1146/annurev.mi.31.100177.002015.
- Duan, J., Reimer, L., Heikkila, J. J., und Glick, B. R. (2014). Differential expression of the seven rRNA operon promoters from the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas sp.* UW4. *FEMS Microbiol. Lett.* 361, 181–189. doi:10.1111/1574-6968.12629.
- Duetz, W. A., Rüedi, L., Hermann, R., O'Connor, K., Büchs, J., und Witholt, B. (2000). Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2641–2646. doi:10.1128/AEM.66.6.2641-2646.2000.
- Eichner, S., Knobloch, T., Floss, H. G., Fohrer, J., Harmrolfs, K., Hermane, J., et al. (2012). The interplay between mutasynthesis and semisynthesis: generation and evaluation of an ansamitocin library. *Angew. Chemie Int. Ed.* 51, 752–757. doi:10.1002/anie.201106249.
- Ellis, T., Adie, T., und Baldwin, G. S. (2011). DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. *Integr. Biol. (Camb).* 3, 109–118. doi:10.1039/c0ib00070a.

- Epshtein, V., Toulmé, F., Rachid Rahmouni, A., Borukhov, S., und Nudler, E. (2003).

  Transcription through the roadblocks: The role of RNA polymerase cooperation. *EMBO*J. 22, 4719–4727. doi:10.1093/emboj/cdg452.
- Espona-Fiedler, M., Soto-Cerrato, V., Hosseini, A., Lizcano, J. M., Guallar, V., Quesada, R., et al. (2012). Identification of dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors in melanoma cells: Prodigiosin vs. obatoclax. *Biochem. Pharmacol.* 83, 489–496. doi:10.1016/j.bcp.2011.11.027.
- Fernández, M., Conde, S., de la Torre, J., Molina-Santiago, C., Ramos, J.-L., und Duque, E. (2012). Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1001–1009. doi:10.1128/AAC.05398-11.
- Fernández-Castané, A., Fehér, T., Carbonell, P., Pauthenier, C., und Faulon, J. L. (2014). Computer-aided design for metabolic engineering. *J. Biotechnol.* 192, 302–313. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.03.029.
- Finking, R., und Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 453–488. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123615.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Ewen, F., Kerlavage, A. R., et al. (1995). Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 269, 496–512. doi:10.1126/science.7542800.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 10, 226–236.
- Fleming, A. (1945). Alexander Fleming Penicillin Nobel Lecture. *Nobel Lect. Physiol. or Med.*, 83–93.
- Fu, J., Wenzel, S. C., Perlova, O., Wang, J., Gross, F., Tang, Z., et al. (2008). Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition. *Nucleic Acids Res.* 36, 1–14. doi:10.1093/nar/gkn499.
- Galm, U., und Shen, B. (2006). Expression of biosynthetic gene clusters in heterologous hosts for natural product production and combinatorial biosynthesis. *Expert Opin. Drug Discov.* 1, 409–437. doi:10.1517/17460441.1.5.409.
- Gemperlein, K., Zipf, G., Bernauer, H. S., Müller, R., und Wenzel, S. C. (2016). Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for production of docosahexaenoic acid based on a myxobacterial PUFA synthase. *Metab. Eng.* 33, 98–108. doi:10.1016/j.ymben.2015.11.001.

- Gershenzon, J., und Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 3, 408–414. doi:10.1038/nchembio.2007.5.
- Gibson, D. G., Benders, G. a, Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. a, Baden-Tillson, H., Zaveri, J., et al. (2008a). Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* 319, 1215–1220. doi:10.1126/science.1151721.
- Gibson, D. G., Benders, G. a, Axelrod, K. C., Zaveri, J., Algire, M. a, Moodie, M., et al. (2008b). One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20404–20409. doi:10.1073/pnas.0811011106.
- Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R.-Y., Algire, M. a, et al. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 329, 52–56. doi:10.1126/science.1190719.
- Gietz, R. D., und Schiestl, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* 2, 31–34. doi:10.1007/978-1-4939-1363-3\_1.
- Gols, R. (2014). Direct and indirect chemical defences against insects in a multitrophic framework. *Plant, Cell Environ.* 37, 1741–1752. doi:10.1111/pce.12318.
- Goryshin, I. Y., und Reznikoff, W. S. (1998). Tn 5 *in vitro* Transposition. *J. Biol. Chem.* 273, 7367–7374. doi:10.1074/jbc.273.13.7367.
- Goy, A., Hernandez-Ilzaliturri, F. J., Kahl, B., Ford, P., Protomastro, E., und Berger, M. (2014).

  A phase I/II study of the pan Bcl-2 inhibitor obatoclax mesylate plus bortezomib for relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 55, 2761–2768. doi:10.3109/10428194.2014.907891.
- Gradman, R. J., und Reznikoff, W. S. (2008). Tn5 synaptic complex formation: role of transposase residue W450. *J. Bacteriol.* 190, 1484–1487. doi:10.1128/JB.01488-07.
- Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R., und Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4645–4649. doi:10.1073/pnas.87.12.4645.
- Green, M. R., und Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning: A Laboratory manual, 4th Edition.
- Grohmann, E., Muth, G., und Espinosa, M. (2003). Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 277–301. doi:10.1128/MMBR.67.2.277.

- Gulani, C., Bhattacharya, S., und Das, A. (2012). Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials. *Malays. J. Microbiol.* 8, 116–122.
- Haavik, H. I. (1979). On the physiological meaning of secondary metabolism. *Folia Microbiol.* (*Praha*). 24, 365–367.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 669–685. doi:10.1128/MBR.68.4.669.
- Hanson, J. R. (2006). *Natural Products: The Secondary Metabolites*. doi:10.1039/9781847551535-00001.
- Harris, A. K. P., Williamson, N. R., Slater, H., Cox, A., Abbasi, S., Foulds, I., et al. (2004). The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- und strain-dependent genome context variation. *Microbiology* 150, 3547–3560. doi:10.1099/mic.0.27222-0.
- Hassankhani, R., Sam, M. R., Esmaeilou, M., und Ahangar, P. (2014). Prodigiosin isolated from cell wall of *Serratia marcescens* alters expression of apoptosis-related genes and increases apoptosis in colorectal cancer cells. *Med. Oncol.* 32, 1–8. doi:10.1007/s12032-014-0366-0.
- Herrero, M., Lorenzo, V. D. E., und Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172, 6557–6567.
- Herrmann, K. (1995). The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7, 907–919. doi:10.1105/tpc.7.7.907.
- Heyes, D. J., Ruban, A. V., und Hunter, C. N. (2003). Protochlorophyllide oxidoreductase: "Dark" reactions of a light-driven enzyme. *Biochemistry* 42, 523–528. doi:10.1021/bi0268448.
- Hong, B., Prabhu, V. V., Zhang, S., Van Den Heuvel, A. P. J., Dicker, D. T., Kopelovich, L., et al. (2014). Prodigiosin rescues deficient p53 signaling and antitumor effects via upregulating p73 and disrupting its interaction with mutant p53. *Cancer Res.* 74, 1153–1165. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0955.

- Hu, D. X., Withall, D. M., Challis, G. L., und Thomson, R. J. (2016). Structure, chemical synthesis, and biosynthesis of prodiginine natural products. *Chem. Rev.* 116, 7818–7853. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00024.
- Hurst, L. D., Pál, C., und Lercher, M. J. (2004). The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nat. Rev. Genet.* 5, 299–310. doi:10.1038/nrg1319.
- Inoue, H., Nojima, H., und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28. doi:10.1016/0378-1119(90)90336-P.
- Jeong, H., Yim, J. H., Lee, C., Choi, S. H., Park, Y. K., Yoon, S. H., et al. (2005). Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. *Nucleic Acids Res.* 33, 7066–7073. doi:10.1093/nar/gki1016.
- Jiang, P. X., Wang, H. S., Zhang, C., Lou, K., und Xing, X. H. (2010). Reconstruction of the violacein biosynthetic pathway from *Duganella sp.* B2 in different heterologous hosts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1077–1088. doi:10.1007/s00253-009-2375-z.
- Juang, R.-S., und Yeh, C.-L. (2014). Adsorptive recovery and purification of prodigiosin from methanol/water solutions of *Serratia marcescens* fermentation broth. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 19, 159–168. doi:10.1007/s12257-013-0547-2.
- Julien, B., Shah, S., Ziermann, R., Goldman, R., Katz, L., und Khosla, C. (2000). Isolation and characterization of the epothilone biosynthetic gene cluster from *Sorangium cellulosum. Gene* 249, 153–160. doi:10.1016/S0378-1119(00)00149-9.
- Kaiser, C., Michaelis, S., und Mitchell, A. (1994). *Methods in Yeast Genetics*.
- Kang, Y., Son, M. S., und Hoang, T. T. (2007). One step engineering of T7-expression strains for protein production: Increasing the host-range of the T7-expression system. *Protein Expr. Purif.* 55, 325–333. doi:10.1016/j.pep.2007.06.014.
- Katz, L., und Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 155–176. doi:10.1007/s10295-015-1723-5.
- Katz, M., Hover, B. M., und Brady, S. F. (2016). Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 129–141. doi:10.1007/s10295-015-1706-6.
- Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Markert, A., Svensson, V., et al. (2010). A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Expr. Purif.* 69, 137–146. doi:10.1016/j.pep.2009.08.008.

- Kawasaki, T., Sakurai, F., Nagatsuka, S., und Hayakawa, Y. (2009). Prodigiosin biosynthesis gene cluster in the roseophilin producer *Streptomyces griseoviridis*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 62, 271–276. doi:10.1038/ja.2009.27.
- Kennedy, J. (2008). Mutasynthesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products. *Nat Prod Rep* 25, 25–34. doi:10.1039/b707678a.
- Kern, W. V. (2015). Neue Antibiotika auf dem Markt und in Entwicklung. *Internist* 56, 1255–1263. doi:10.1007/s00108-015-3705-0.
- Khanafari, A., Assadi, M. M., und Fakhr, F. A. (2006). Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens. Online J. Biol. Sci.* 6, 1–13. doi:10.3844/ojbsci.2006.1.13.
- Kilaru, S., Hoegger, P. J., Majcherczyk, A., Burns, C., Shishido, K., Bailey, A., et al. (2006).
  Expression of laccase gene lcc1 in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 200–210. doi:10.1007/s00253-005-0128-1.
- Kilaru, S., und Steinberg, G. (2015). Yeast recombination-based cloning as an efficient way of constructing vectors for *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genet. Biol.* 79, 76–83. doi:10.1016/j.fgb.2015.03.017.
- Kim, D., Lee, J. S., Park, Y. K., Kim, J. F., Jeong, H., Oh, T. K., et al. (2007). Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium Hahella chejuensis KCTC 2396. *J. Appl. Microbiol.* 102, 937–944. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03172.x.
- Kim, E., Moore, B. S., und Yoon, Y. J. (2015). Reinvigorating natural product combinatorial biosynthesis with synthetic biology. *Nat. Chem. Biol.* 11, 649–659. doi:10.1038/nchembio.1893.
- Kim, J. H., Feng, Z., Bauer, J. D., Kallifidas, D., Calle, P. Y., und Brady, S. F. (2010). Cloning large natural product gene clusters from the environment: Piecing environmental DNA gene clusters back together with TAR. *Biopolymers* 93, 833–844. doi:10.1002/bip.21450.
- Kimata, S., Izawa, M., Kawasaki, T., und Hayakawa, Y. (2016). Identification of a prodigiosin cyclization gene in the roseophilin producer and production of a new cyclized prodigiosin in a heterologous host. *J. Antibiot. (Tokyo).*, 1–4. doi:10.1038/ja.2016.94.
- Koh, C. M. (2013). "Storage of Bacteria and Yeast", in *Methods in Enzymology*. 533, 15–21. doi:10.1016/B978-0-12-420067-8.00002-7.

- Kortmann, M., Kuhl, V., Klaffl, S., und Bott, M. (2014). A chromosomally encoded T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Corynebacterium glutamicum*: construction and comparative evaluation at the single-cell level. *Microb. Biotechnol.* 8, 253–265. doi:10.1111/1751-7915.12236.
- Kossel, A. (1891). Ueber die chemische Zusammensetzung der Zelle. *Arch. für Physiol.*, 181–185.
- Kouprina, N., Annab, L., Graves, J., Afshari, C., Barrett, J. C., Resnick, M. A., et al. (1998). Functional copies of a human gene can be directly isolated by transformation-associated recombination cloning with a small 3' end target sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4469–4474. doi:10.1073/pnas.95.8.4469.
- Kronenwerth, M., Brachmann, A. O., Kaiser, M., und Bode, H. B. (2014). Bioactive derivatives of isopropylstilbene from mutasynthesis and chemical synthesis. *ChemBioChem* 15, 2689–2691. doi:10.1002/cbic.201402447.
- Kulandaisamy Venil, C., und Lakshmanaperumalsamy, P. (2009). An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin. *Electron. J. Biol.* 5, 49–61.
- Kwon, S.-K., Park, Y.-K., und Kim, J. F. (2010). Genome-wide screening and identification of factors affecting the biosynthesis of prodigiosin by *Hahella chejuensis*, using *Escherichia coli* as a surrogate host. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1661–1668. doi:10.1128/AEM.01468-09.
- Land, M., Hauser, L., Jun, S.-R., Nookaew, I., Leuze, M. R., Ahn, T.-H., et al. (2015). Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct. Integr. Genomics* 15, 141–161. doi:10.1007/s10142-015-0433-4.
- Lange, B. M., Rujan, T., Martin, W., und Croteau, R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13172–13177. doi:10.1073/pnas.240454797.
- Lapenda, J. C., Silva, P. A., Vicalvi, M. C., Sena, K. X. F. R., und Nascimento, S. C. (2014).

  Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 399–406. doi:10.1007/s11274-014-1793-y.
- Larionov, V., Kouprina, N., Graves, J., Chen, X. N., Korenberg, J. R., und Resnick, M. A. (1996). Specific cloning of human DNA as yeast artificial chromosomes by transformation-associated recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 491–496. doi:10.1073/pnas.93.1.491.

- Laursen, J. B., und Nielsen, J. (2004). Phenazine natural products: Biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem. Rev.* 104, 1663–1685. doi:10.1021/cr020473j.
- Lee, M. E., Aswani, A., Han, A. S., Tomlin, C. J., und Dueber, J. E. (2013). Expression-level optimization of a multi-enzyme pathway in the absence of a high-throughput assay. *Nucleic Acids Res.* 41, 10668–10678. doi:10.1093/nar/gkt809.
- van Leeuwen, J., Andrews, B., Boone, C., und Tan, G. (2015a). Construction of multifragment plasmids by homologous recombination in yeast. *Cold Spring Harb. Protoc.* 9, 796–800. doi:10.1101/pdb.top084111.
- van Leeuwen, J., Andrews, B., Boone, C., und Tan, G. (2015b). Rapid and efficient plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Cold Spring Harb. Protoc.* 9, 853–861. doi:10.1101/pdb.prot085100.
- Li, Y., Li, Z., Yamanaka, K., Xu, Y., Zhang, W., Vlamakis, H., et al. (2015). Directed natural product biosynthesis gene cluster capture and expression in the model bacterium *Bacillus subtilis. Sci. Rep.* 5, 1–7. doi:10.1038/srep09383.
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., und Tan, H. (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in streptomyces. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 112–143. doi:10.1128/MMBR.00054-12.
- Loeschcke, A. (2012). Funktionelle Koexpression geclusterter Gene in verschiedenen Bakterien mithilfe des TREX-Systems. Available at: http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=24577.
- Loeschcke, A., Markert, A., Wilhelm, S., Wirtz, A., Rosenau, F., Jaeger, K. E., et al. (2013). TREX: A universal tool for the transfer and expression of biosynthetic pathways in bacteria. *ACS Synth. Biol.* 2, 22–33. doi:10.1021/sb3000657.
- Loeschcke, A., und Thies, S. (2015). *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 6197–6214. doi:10.1007/s00253-015-6745-4.
- Loman, N. J., Constantinidou, C., Chan, J. Z. M., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C. W., et al. (2012). High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 599–606. doi:10.1038/nrmicro2850.

- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., und Timmis, K. N. (1990). Mini-Tn5 transposoon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172, 6568–6572. doi:0021-9193/90/116568-05.
- Luo, Y., Li, B.-Z., Liu, D., Zhang, L., Chen, Y., Jia, B., et al. (2015). Engineered biosynthesis of natural products in heterologous hosts. *Chem. Soc. Rev.* 44, 5265–5290. doi:10.1039/C5CS00025D.
- Lussier, F. X., Denis, F., und Shareck, F. (2010). Adaptation of the highly productive T7 expression system to *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 967–970. doi:10.1128/AEM.02186-09.
- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P. J., und Botstein, D. (1987). Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* 58, 201–216. doi:10.1016/0378-1119(87)90376-3.
- Ma, N., und McAllister, W. T. (2009). In a head-on collision, two RNA polymerases approaching one another on the same DNA aay pass by one another. *J. Mol. Biol.* 391, 808–812. doi:10.1016/j.jmb.2009.06.060.
- Maeda, M., Shimada, T., und Ishihama, A. (2015). Strength and regulation of seven rRNA promoters in *Escherichia coli*. *PLoS One* 10, 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0144697.
- Mahamad, P., Boonchird, C., und Panbangred, W. (2016). High level accumulation of soluble diphtheria toxin mutant (CRM197) with co-expression of chaperones in recombinant *Escherichia coli. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 6319–6330. doi:10.1007/s00253-016-7453-4.
- Mahnke Braam, L. A., Goryshin, I. Y., und Reznikoff, W. S. (1999). A Mechanism for Tn 5 Inhibition. *J. Biol. Chem.* 274, 86–92.
- Maier, M. E. (2015). Design and synthesis of analogues of natural products. *Org. Biomol. Chem.* 13, 5302–5343. doi:10.1039/c5ob00169b.
- Mairhofer, J., Scharl, T., Marisch, K., Cserjan-Puschmann, M., und Striedner, G. (2013). Comparative transcription profiling and in-depth characterization of plasmid-based and plasmid-free *Escherichia coli* expression systems under production conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3802–3812. doi:10.1128/AEM.00365-13.
- Marienhagen, J., und Bott, M. (2013). Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *J. Biotechnol.* 163, 166–178. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.06.001.

- Markert, A. (2008). Etablierung eines neuen T7 RNA-Polymerase-abhängigen Expressionssystems zur koordinierten Expression aller Gene einer Genregion. Available at: http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=10656.
- Martin, V. J. J., Pitera, D. J., Withers, S. T., Newman, J. D., und Keasling, J. D. (2003). Engineering a mevalonate pathway in Escherichia coli for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* 21, 796–802. doi:10.1038/nbt833.
- Martínez-García, E., Nikel, P. I., Aparicio, T., und de Lorenzo, V. (2014). *Pseudomonas* 2.0: genetic upgrading of *P. putida* KT2440 as an enhanced host for heterologous gene expression. *Microb. Cell Fact.* 13, 1–15. doi:10.1186/s12934-014-0159-3.
- Marykwas, D. L., und Passmore, S. E. (1995). Mapping by multifragment cloning in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11701–11705. doi:10.1073/pnas.92.25.11701.
- Mavrodi, D. V, Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G., und Thomashow, L. S. (2001). Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 183, 6454–6465. doi:10.1128/JB.183.21.6454.
- McAllister, W. T., Morris, C., Rosenberg, A. H., und Studier, F. W. (1981). Utilization of bacteriophage T7 late promoters in recombinant plasmids during infection. *J. Mol. Biol.* 153, 527–544. doi:10.1016/0022-2836(81)90406-X.
- McCloskey, D., Palsson, B. Ø., und Feist, A. M. (2013). Basic and applied uses of genomescale metabolic network reconstructions of Escherichia coli. *Mol. Syst. Biol.* 9, 1–15. doi:10.1038/msb.2013.18.
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., De Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., et al. (2011a). AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* 39, 339–346. doi:10.1093/nar/gkr466.
- Medema, M. H., Breitling, R., Bovenberg, R., und Takano, E. (2011b). Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 131–137. doi:10.1038/nrmicro2478.
- Medema, M. H., Kottmann, R., Yilmaz, P., Cummings, M., Biggins, J. B., Blin, K., et al. (2015). Minimum Information about a biosynthetic gene cluster. *Nat. Chem. Biol.* 11, 625–631. doi:10.1038/nchembio.1890.

- Medema, M. H., van Raaphorst, R., Takano, E., und Breitling, R. (2012). Computational tools for the synthetic design of biochemical pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 191–202. doi:10.1038/nrmicro2717.
- van der Meer, J. R., Zehnder, A. J. B., und De Vos, W. M. (1991). Identification of a novel composite transposable element, Tn5280, carrying chlorobenzene dioxygenase genes of *Pseudomonas sp.* strain P51. *J. Bacteriol.* 173, 7077–7083.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies-the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31–46. doi:10.1038/nrg2626.
- Miller, W. G., und Simons, R. W. (1993). Chromosomal supercoiling in *Escherichia coli. Mol. Microbiol.* 10, 675–684. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb00939.x.
- Montaner, B., und Pérez-Tomás, R. (2003). The prodigiosins: a new family of anticancer drugs. *Curr. Cancer Drug Targets* 3, 57–65. doi:10.2174/1568009033333772.
- Montiel, D., Kang, H.-S., Chang, F.-Y., Charlop-Powers, Z., und Brady, S. F. (2015). Yeast homologous recombination-based promoter engineering for the activation of silent natural product biosynthetic gene clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 8953–8958. doi:10.1073/pnas.1507606112.
- Mullis, K. B., und Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335–350. doi:10.1016/0076-6879(87)55023-6.
- Nanamiya, H., Sato, M., Masuda, K., Sato, M., Wada, T., Suzuki, S., et al. (2010). *Bacillus subtilis* mutants harbouring a single copy of the rRNA operon exhibit severe defects in growth and sporulation. *Microbiology* 156, 2944–2952. doi:10.1099/mic.0.035295-0.
- Nelson, D. L., und Cox, M. M. (2013). *Principles of Biochemistry*. doi:10.1007/s11655-011-0820-1.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., et al. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4, 799–808.
- Newman, D. J., und Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70, 461–477. doi:10.1021/np068054v.
- Newman, D. J., und Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311–335. doi:10.1021/np200906s.

- Newman, D. J., und Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661. doi:10.1021/np200906s.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., und Branch, N. P. (2016). Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current "State of Play". *Planta Med* 82, 775–789. doi:10.1055/s-0042-101353.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., und Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the 30 years. *J. Nat. Prod.* 66, 1022–1037. doi:10.1021/np200906s.Natural.
- Nikel, P. I., und de Lorenzo, V. (2014). Robustness of *Pseudomonas putida* KT2440 as a host for ethanol biosynthesis. *N. Biotechnol.* 31, 562–571. doi:10.1016/j.nbt.2014.02.006.
- Nikel, P. I., Martínez-García, E., und de Lorenzo, V. (2014). Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 368–79. doi:10.1038/nrmicro3253.
- Ogasawara, N., Moriya, S., und Yoshikawa, H. (1983). Structure and organization of rRNA operons in the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucleic Acids Res.* 11, 6301–6318. doi:10.1093/nar/11.18.6301.
- Oldenburg, K. R., Vo, K. T., Michaelis, S., und Paddon, C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. *Nucleic Acids Res.* 25, 451–452. doi:10.1093/nar/25.2.451.
- Orr-Weaver, T. L., und Szostak, J. W. (1983). Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 4417–4421. doi:10.1073/pnas.80.14.4417.
- Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W., und Rothstein, R. J. (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 6354–6358. doi:10.1073/pnas.78.10.6354.
- Osbourn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet.* 26, 449–457. doi:10.1016/j.tig.2010.07.001.
- Perucho, M., Hanahan, D., Lipsich, L., und Wigler, M. (1980). Isolation of the chicken thymidine kinase gene by plasmid rescue. *Nature* 285, 207–210. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Peters, J. E. (2014). Tn7. *Microbiol. Spectr.* 2, 1–20. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0010-2014.

- Pickens, L. B., Tang, Y., und Chooi, Y.-H. (2011). Metabolic engineering for the production of natural products. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2, 211–236. doi:10.1146/annurev-chembioeng-061010-114209.
- Piel, J. (2011). Approaches to capturing and designing biologically active small molecules produced by uncultured microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 431–453. doi:10.1146/annurev-micro-090110-102805.
- Pitera, D. J., Paddon, C. J., Newman, J. D., und Keasling, J. D. (2007). Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 9, 193–207. doi:10.1016/j.ymben.2006.11.002.
- Poblete-Castro, I., Becker, J., Dohnt, K., dos Santos, V. M., und Wittmann, C. (2012). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* und related species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2279–2290. doi:10.1007/s00253-012-3928-0.
- Prentki, P., und Krisch, H. M. (1984). In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29, 303–313. doi:10.1016/0378-1119(84)90059-3.
- Pridmore, R. D. (1987). New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* 56, 309–312. doi:10.1016/0378-1119(87)90149-1.
- Priya, K. A., Satheesh, S., Ashokkumar, B., Varalakshmi, P., Selvakumar, G., und Sivakumar, N. (2013). "Antifouling Activity of Prodigiosin from Estuarine Isolate of *Serratia marcescens* CMST 07", in *Microbiological Research in Agroecosystem Management* (India: Springer India), 11–21. doi:10.1007/978-81-322-1087-0.
- Puchałka, J., Oberhardt, M. a, Godinho, M., Bielecka, A., Regenhardt, D., Timmis, K. N., et al. (2008). Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. *PLoS Comput. Biol.* 4, 1–18. doi:10.1371/journal.pcbi.1000210.
- Ramakrishna, A., und Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* 6, 1720–1731. doi:10.4161/psb.6.11.17613.
- Raymond, C. K., Pownder, T. A., und Sexson, S. L. (1999). General Method for Plasmid Construction Using Homologous recombination. 26, 134–141.
- Reva, O., und Tümmler, B. (2008). Think big Giant genes in bacteria. *Environ. Microbiol.* 10, 768–777. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01500.x.

- Reznikoff, W. S. (1993). The Tn5 transposon. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 945–963. doi:10.1146/annurev.mi.47.100193.004501.
- Reznikoff, W. S. (2008). Transposon Tn 5. *Annu. Rev. Genet.* 42, 269–286. doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091656.
- Reznikoff, W. S., Bhasin, a, Davies, D. R., Goryshin, I. Y., Mahnke, L. a, Naumann, T., et al. (1999). Tn5: A molecular window on transposition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 729–734. doi:10.1006/bbrc.1999.1891.
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A., et al. (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by Streptomyces. *EMBO Rep.* 9, 670–675. doi:10.1038/embor.2008.83.
- Rinehart, K. L. (1977). Mutasynthesis of new antibiotics. *Pure Appl. Chem.* 49, 1361–1384. doi:10.1351/pac197749091361.
- Rodrigues, A. L., Trachtmann, N., Becker, J., Lohanatha, A. F., Blotenberg, J., Bolten, C. J., et al. (2013). Systems metabolic engineering of Escherichia coli for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein. *Metab. Eng.* 20, 29–41. doi:10.1016/j.ymben.2013.08.004.
- Rohmer, M., Grosdemange-Billiard, C., Seemann, M., und Tritsch, D. (2004). Isoprenoid biosynthesis as a novel target for antibacterial and antiparasitic drugs. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 5, 154–162.
- Sahner, J. H., Sucipto, H., Wenzel, S. C., Groh, M., Hartmann, R. W., und Müller, R. (2015). Advanced mutasynthesis studies on the natural α-pyrone antibiotic myxopyronin from *Myxococcus fulvus*. *ChemBioChem* 16, 946–953. doi:10.1002/cbic.201402666.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491. doi:10.1126/science.2448875.
- Samrot, A. V, Chandana, K., Senthilkumar, P., und Narendra Kumar, G. (2011). Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* SU-10 and evaluation of its bioactivity. *Int. Res. J. Biotechnol.* 2, 128–133.
- Sánchez, C., Braña, A. F., Méndez, C., und Salas, J. A. (2006). Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationship to indolocarbazole biosynthesis. *ChemBioChem* 7, 1231–1240. doi:10.1002/cbic.200600029.

- Schalk, I. J., und Guillon, L. (2013). Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environ. Microbiol.* 15, 1661–1673. doi:10.1111/1462-2920.12013.
- Schimmer, A. D., O'Brien, S., Kantarjian, H., Brandwein, J., Cheson, B. D., Minden, M. D., et al. (2008). A phase i study of the pan bcl-2 family inhibitor obatoclax mesylate in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin. Cancer Res.* 14, 8295–8301. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0999.
- Schmitz, S., Nies, S., Wierckx, N., Blank, L. M., und Rosenbaum, M. A. (2015). Engineering mediator-based electroactivity in the obligate aerobic bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Front. Microbiol.* 6, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2015.00284.
- Schulz, V. P., und Reznikoff, W. S. (1991). Translation initiation of IS50R read-through transcripts. *J. Mol. Biol.* 221, 65–80. doi:10.1016/0022-2836(91)80205-9.
- Schwecke, T., Aparicio, J. F., Molnár, I., König, A., Khaw, L. E., Haydock, S. F., et al. (1995). The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7839–7843. doi:10.1073/pnas.92.17.7839.
- Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 285–295. doi:10.1016/S1367-5931(03)00020-6.
- Shendure, J., und Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26, 1135–1145. doi:10.1038/nbt1486.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350, 3–41. doi:10.1016/S0076-6879(02)50954-X.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 1–6. doi:10.1038/msb.2011.75.
- Simon, O., Klaiber, I., Huber, A., und Pfannstiel, J. (2014). Comprehensive proteome analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to the flavor compound vanillin. *J. Proteomics* 109, 212–227. doi:10.1016/j.jprot.2014.07.006.
- Simon, R., O'Connell, M., Labes, M., und Pühler, A. (1986). Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* 118, 640–659.

- Simon, R., Priefer, U., und Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat. Biotechnol.* 1, 784–791. doi:10.1038/nbt1183-784.
- Slater, H., Crow, M., Everson, L., und Salmond, G. P. C. (2003). Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Mol. Microbiol.* 47, 303–320. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03295.x.
- Smanski, M. J., Zhou, H., Claesen, J., Shen, B., Fischbach, M. A., und Voigt, C. A. (2016). Synthetic biology to access and expand nature's chemical diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 135–149. doi:10.1038/nrmicro.2015.24.
- Solovyev, V., und Salamov, A. (2011). "Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences.", in *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*, 1–18.
- Song, M. J., Bae, J., Lee, D. S., Kim, C. H., Kim, J. S., Kim, S. W., et al. (2006). Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from Serratia sp. KH-95. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 157–161. doi:10.1263/jbb.101.157.
- Sousa, C., Lorenzo, V. De, und Cebollat, A. (1997). Modulation of gene expression through chromosomal positioning in Escherichia coli. *Microbiology* 143, 2071–2078.
- Stankovic, N., Senerovic, L., Ilic-Tomic, T., Vasiljevic, B., und Nikodinovic-Runic, J. (2014). Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3841–3858. doi:10.1007/s00253-014-5590-1.
- Starcevic, A., Zucko, J., Simunkovic, J., Long, P. F., Cullum, J., und 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 Res.* 36, 6882–6892. doi:10.1093/nar/gkn685.
- Steiniger, M., Adams, C. D., Marko, J. F., und Reznikoff, W. S. (2006). Defining characteristics of Tn5 Transposase non-specific DNA binding. *Nucleic Acids Res.* 34, 2820–2832. doi:10.1093/nar/gkl179.
- Stevens, C. D., Henry, M. R., Murphy, K. A., und Boddy, C. N. (2010). Heterologous expression of the oxytetracycline biosynthetic pathway in *Myxococcus xanthas*. *Appl. Environ*. *Microbiol*. 76, 2681–2683. doi:10.1128/AEM.02841-09.

- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R. K., und Schmidt, T. M. (2014). rrnDB: Improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res.* 1, 1–6. doi:10.1093/nar/gku1201.
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28, 1102–1104.
- Strieker, M., Tanović, A., und Marahiel, M. A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: Structures and dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 234–240. doi:10.1016/j.sbi.2010.01.009.
- Studier, F. W. (1972). Bacteriophage T7. *Science* 176, 367–376. doi:10.1126/science.176.4033.367.
- Studier, F. W., und Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130. doi:10.1016/0022-2836(86)90385-2.
- Su, W.-T., Tsou, T.-Y., und Liu, H.-L. (2011). Response surface optimization of microbial prodigiosin production from *Serratia marcescens. J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 42, 217–222. doi:10.1016/j.jtice.2010.05.009.
- Sumathi, C., MohanaPriya, D., Swarnalatha, S., Dinesh, M. G., und Sekaran, G. (2014). Production of prodigiosin using tannery fleshing and evaluating its pharmacological effects. *ScientificWorldJournal*. 1–8. doi:10.1155/2014/290327.
- Suryawanshi, R. K., Patil, C. D., Borase, H. P., Salunke, B. K., und Patil, S. V. (2014). Studies on production and biological potential of prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173, 1209–1221. doi:10.1007/s12010-014-0921-3.
- Suryawanshi, R. K., Patil, C. D., Koli, S. H., Hallsworth, J. E., und Patil, S. V. (2016). Antimicrobial activity of prodigiosin is attributable to plasma-membrane damage. *Nat. Prod. Res.*, 1–6. doi:10.1080/14786419.2016.1195380.
- Swords, E. (2003). "Chemical Transformation of *E. coli*", in *Methods in molecular biology*, 49–53. doi:10.1385/1-59259-409-3:49.
- Széliová, D., Krahulec, J., Šafránek, M., Lišková, V., und Turňa, J. (2016). Modulation of heterologous expression from P<sub>BAD</sub> promoter in *Escherichia coli* production strains. *J. Biotechnol.* 236, 1–9. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.08.004.

- Tabor, S., und Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes (T7 DNA polymerase/T7 gene 5 protein/proteolysis/13-lactamase/rifampicin). *Biochemistry* 82, 1074–1078. doi:10.1073/pnas.82.4.1074.
- Tanaka, Y., Nanamiya, H., Yano, K., Kakugawa, K., Kawamura, F., und Ochi, K. (2013). rRNA (rrn) operon-engineered *Bacillus subtilis* as a feasible test organism for antibiotic discovery. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1948–1951. doi:10.1128/AAC.02604-12.
- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 148, 63–106. doi:DOI 10.1007/10\_2014\_295.
- Thomas, C. M., und Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat.Rev.Microbiol.* 3, 711–721. doi:10.1038/nrmicro1234.
- Tsao, S.-W., Rudd, B. A. M., He, X.-G., Chang, C.-J., und Floss, H. G. (1985). Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives. *J. Antibiot. (Tokyo).* 38, 128–131. doi:10.7164/antibiotics.38.128.
- Tyo, K. E. J., Ajikumar, P. K., und Stephanopoulos, G. (2009). Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. *Nat. Biotechnol.* 27, 760–765. doi:10.1038/nbt.1555.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., et al. (2012).

  Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, 1–12. doi:10.1093/nar/gks596.
- Vaishnav, P., und Demain, A. L. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 29, 223–229. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.11.006.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., et al. (2001).

  The sequence of the human genome. *Science*. 291, 1304–1351.

  doi:10.1126/science.1058040.
- Vincent, A. T., Derome, N., Boyle, B., Culley, A. I., und Charette, S. J. (2015). Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *J. Microbiol. Methods*, 1–12. doi:10.1016/j.mimet.2016.02.016.
- Vining, L. C. (1990). Functions of secondary metabolites. Annu. Rev. Microbiol. 44, 395–427.
- Vogelstein, B., und Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 615–619. doi:10.1073/pnas.76.2.615.

- Walsh, C. T. (2004). Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science*. 303, 1805–1810. doi:10.1126/science.1094318.
- Wang, H., Fewer, D. P., Holm, L., Rouhiainen, L., und Sivonen, K. (2014). Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 9259–9264. doi:10.1073/pnas.1401734111.
- Wang, H., und Stillman, D. J. (1993). Transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae* by a SIN3-LexA fusion protein. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1805–1814. doi:10.1128/MCB.13.3.1805.Updated.
- Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Bruccoleri, R., et al. (2015). antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.* 43, 237–243. doi:10.1093/nar/gkv437.
- Weihmann, R. (2016). Hefe-basierte Klonierung von Genclustern und deren Expression in *Pseudomonas putida* mit Hilfe des yTREX Systems.
- Weinberg, E. D. (1971). Secondary Metabolism: Raison d'Être. *Perspect. Biol. Med.* 14, 565–577.
- Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T. R., Fareed, G. C., und Richardson, C. C. (1968). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 243, 4543–4555.
- Weissman, K. J., und Leadlay, P. F. (2005). Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 925–936. doi:10.1002/9783527619979.ch46.
- Weist, S., und Süssmuth, R. D. (2005). Mutational biosynthesis A tool for the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 141–150. doi:10.1007/s00253-005-1891-8.
- Widenhorn, K. A., Somers, J. M., und Kay, W. W. (1988). Expression of the divergent tricaryboxylate transport operon (tctl) of *Salmonella typhimurium*. 170, 3223–3227.
- Williamson, N. R., Fineran, P. C., Gristwood, T., Chawrai, S. R., Leeper, F. J., und Salmond, G.
  P. C. (2007). Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines.
  Future Microbiol. 2, 605–618. doi:10.2217/17460913.2.6.605.
- Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J., und Salmond, G. P. C. (2006). The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 887–899. doi:10.1038/nrmicro1531.

- Williamson, N. R., Simonsen, H. T., Ahmed, R. a a, Goldet, G., Slater, H., Woodley, L., et al. (2005). Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amyl-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in Streptomyces. *Mol. Microbiol.* 56, 971–989. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04602.x.
- Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A., und Brinkman, F. S. L. (2015). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the Pseudomonas genome database. *Nucleic Acids Res.* 44, 646–653. doi:10.1093/nar/gkv1227.
- Winsor, G. L., Lam, D. K. W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., Yu, N. Y., et al. (2011). Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res.* 39, 596–600. doi:10.1093/nar/gkq869.
- Woodall, C. A. (2003). "Elektroporation of *E. coli*", in *Methods in molecular biology*, 55–59. doi:10.1385/1-59259-409-3:55.
- Wrede, F., und Hettche, O. (1929). Über das Prodigiosin, den roten Farbstoff des *Bacillus prodigiosus*. 2678–2685.
- Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., und van der Lelie, D. (2011). Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 299–323. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00249.x.
- Xu, P., Ding, Z. Y., Qian, Z., Zhao, C. X., und Zhang, K. C. (2008). Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 325–331. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.10.016.
- Xu, P., Rizzoni, E. A., Sul, S.-Y., und Stephanopoulos, G. (2016). Improving metabolic pathway efficiency by statistical model based multivariate regulatory metabolic engineering (MRME). *ACS Synth. Biol.*, 1–11. doi:10.1021/acssynbio.6b00187.
- Yamanaka, K., Reynolds, K. A., Kersten, R. D., Ryan, K. S., Gonzalez, D. J., Nizet, V., et al. (2014). Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 1957–1962. doi:10.1073/pnas.1319584111.

- Yano, K., Wada, T., Suzuki, S., Tagami, K., Matsumoto, T., Shiwa, Y., et al. (2013). Multiple rRNA operons are essential for efficient cell growth and sporulation as well as outgrowth in *Bacillus subtilis*. *Microbiol*. (*United Kingdom*) 159, 2225–2236. doi:10.1099/mic.0.067025-0.
- Yenkejeh, R. A., Sam, M. R., und Esmaeillou, M. (2016). Targeting survivin with prodigiosin isolated from cell wall of *Serratia marcescens* induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Hum Exp Toxicol*, 1–10. doi:10.1177/0960327116651122.
- Yim, H., Haselbeck, R., Niu, W., Pujol-Baxley, C., Burgard, A., Boldt, J., et al. (2011). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat Chem Biol* 7, 445–452. doi:10.1038/nchembio.580.
- Yu, Q., Du, A., Liu, T., Deng, Z., und He, X. (2012). The biosynthesis of the polyether antibiotic nanchangmycin is controlled by two pathway-specific transcriptional activators. *Arch. Microbiol.* 194, 415–426. doi:10.1007/s00203-011-0768-8.
- Zhang, H., Wang, Y., und Pfeifer, B. A. (2008a). Bacterial hosts for natural product production. *Mol. Pharm.* 5, 212–225. doi:10.1021/mp7001329.
- Zhang, L., Ou, X., Zhao, G., und Ding, X. (2008b). Highly efficient *in vitro* site-specific recombination system based on *Streptomyces* Phage oBT1 integrase. *J. Bacteriol.* 190, 6392–6397. doi:10.1128/JB.00777-08.
- Zhang, L., Wang, L., Wang, J., Ou, X., Zhao, G., und Ding, X. (2010). Article DNA cleavage is independent of synapsis during *Streptomyces* Phage BT 1 integrase-mediated site-specific recombination. *J. Mol. Cell Biol.* 2, 264–275. doi:10.1093/jmcb/mjq025.
- Zhang, L., Zhao, G., und Ding, X. (2011). Tandem assembly of the epothilone biosynthetic gene cluster by *in vitro* site-specific recombination. *Sci. Rep.* 1, 1–5. doi:10.1038/srep00141.
- Zhang, M. M., Wang, Y., Ang, E. L., und Zhao, H. (2016). Engineering microbial hosts for production of bacterial natural products. *Nat. Prod. Rep.* 33, 1–25. doi:10.1039/c6np00017g.
- Ziemert, N., Alanjary, M., und Weber, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes

   a review. *Nat. Prod. Rep.* 33, 988–1005. doi:10.1039/C6NP00025H.

## 8 Anhang

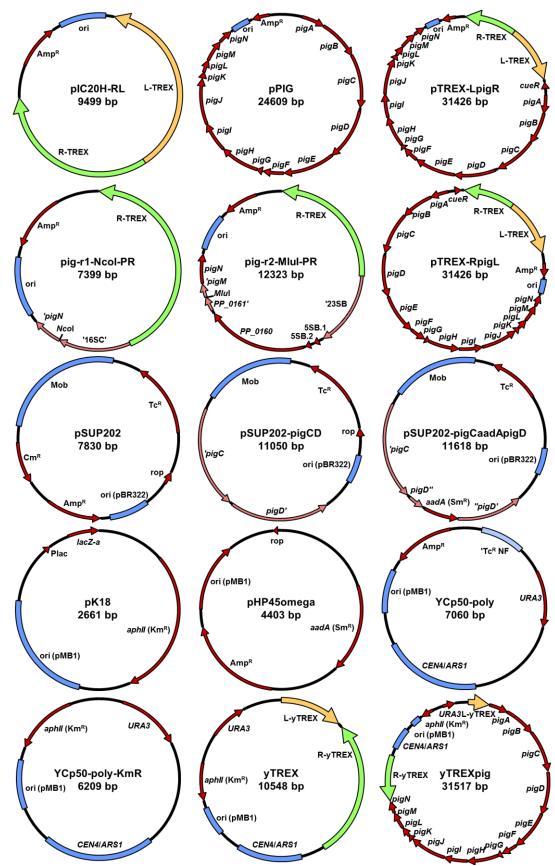


Abb. 8.1: Plasmidkarten der verwendeten Plasmide

Plasmidkarten der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (Tab. 2.2), erstellt mit der Software Clone-Manager 9.2.

Tab. 8.1: Prodigiosin-Produktion in *P. putida* pig-r1, dargestellt als Titer [mg/L] und pro Zellmasse [mg/gDCW] Anzucht der Kulturen erfolgte bei verschiedenen Temperaturen (30, 25, 20 °C), in zu 10 oder 20 % mit LB- oder TB-Medium gefüllten Erlenmeyerkolben mit (+) oder ohne (-) Schikanen. Probenentnahme erfolgte nach 6, 24, 48 und 72 h, der Prodigiosin Gehalt der entnommenen Proben wurde photometrisch bei 535 nm in angesäuertem Ethanol (4 % 1 M HCl) bestimmt und ist jeweils als Mittelwert (MW) von drei unabhängigen Experimenten mit seiner Standardabweichung (SD) angegeben. Der rote Farbgradient ermöglicht eine leichtere Übersicht der Produktionstrends, je intensiver die Rotfärbung, desto höher der jeweilige Produktionswert. Die Angabe als Titer [mg/L] und Ausbeute pro Zellmasse [mg/gDCW] wurden hierbei separat behandelt.

LB																	
mg	g/L		6	h		24h				48	3h			72	2h		
1		20% -	10% -	20% +	10% +	20% -	10% -	20% +	10% +	20% -	10% -	20% +	10% +	20% -	10% -	20% +	10% +
30°C	MW	1,2	4,2	8,6	9,0	5,3	8,5	14,3	17,2	3,5	7,2	13,7	15,8	3,1	6,3	12,7	15,9
30°C	SD	0,1	0,7	0,2	0,8	0,5	0,8	1,3	1,4	0,1	0,9	1,3	0,9	0,0	0,4	0,9	1,5
2500	MW	0,4	0,8	0,7	0,4	6,0	13,6	20,5	18,9	8,4	15,0	19,9	16,9	7,6	14,3	22,2	19,5
25°C	SD	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,8	0,5	1,5	0,8	0,1	0,8	2,3	0,3	0,8	1,0	2,2
20°C	MW	0,7	0,7	0,4	0,3	13,7	20,0	23,0	22,4	19,2	23,9	26,0	20,9	17,3	21,8	22,5	17,7
20 C	SD	0,1	0,2	0,0	0,0	0,5	1,2	2,2	3,6	1,4	1,9	1,1	1,8	2,4	1,2	1,2	1,5
									Т	В				ı			
mg	g/L	6h			24h		48h			72h							
		20% -	10% -	20% +	10% +	20% -	10% -	20% +	10% +	20% -	10% -	20% +	10% +	20% -	10% -	20% +	10% +
30°C	MW	0,8	1,9	5,4	10,1	3,1	5,8	17,0	35,5	2,6	4,8	16,1	30,9	2,7	6,8	12,3	24,1
30 C	SD	0,1	0,3	0,9	1,0	0,1	0,2	1,0	4,5	0,1	0,7	1,2	3,1	0,8	1,3	0,3	1,7
25°C	MW	0,4	0,5	0,5	0,3	3,0	9,1	28,1	48,0	4,2	8,9	31,9	46,9	5,6	11,6	35,1	56,2
25 0	SD	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,7	2,6	3,7	0,4	0,2	1,8	4,8	0,5	0,9	4,1	2,8
20°C	MW	0,4	0,4	0,1	0,1	8,6	25,0	51,7	83,9	10,2	30,3	82,0	93,7	8,8	24,5	80,4	85,3
20 0	SD	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	2,5	6,4	15,8	0,6	5,2	11,6	0,6	0,5	1,1	14,8	5,6
			LB														
mg/g	DCW	6h			24h		48h			72	2h	ı					
		20% -	10% -	20% +	10% +	20% -	10% -	20% +	10% +	20% -	10% -	20% +	10% +	20% -	10% -	20% +	10% +
30°C	MW	2,7	5,4	6,9	5,5	2,9	3,8	7,1	9,2	1,3	3,1	6,4	8,0	1,2	2,9	6,1	7,5
	SD	0,4	1,1	0,4	0,5	0,3	0,4	1,0	0,3	0,0	0,4	0,9	0,4	0,0	0,2	0,5	0,5
25°C	MW	1,4	1,8	1,6	1,0	3,9	6,4	10,4	10,1	3,1	6,1	10,2	10,7	3,1	6,5	11,5	12,4
	SD	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,4	0,2	0,2	0,4	0,7	0,1	0,3	0,2	0,1
20°C	MW	1,9	1,8	1,1	0,9	9,0	9,4	9,3	9,8	6,5	13,1	11,4	10,8	6,7	12,3	10,7	9,8
	SD	0,3	0,3	0,0	0,1	0,6	0,3	0,7	1,3	0,7	1,3	0,2	0,1	0,9	0,7	0,9	0,4
									Т	В				l			
mg/g	DCW			ih I				4h				3h		72h		I	
		20% -	10% -	20% +	10% +	20% -	10% -		10% +	20% -	10% -		10% +		10% -	20% +	
30°C	MW	1,6	1,8	2,9	3,2	1,4	1,3	2,4	4,6	0,8	0,9	2,2	4,7	0,6	1,1	1,7	3,5
	SD	0,3	0,3	0,6	0,4	0,1	0,0	0,1	0,6	0,0	0,1	0,1	0,5	0,2	0,2	0,1	0,4
25°C	MW	1,3	0,8	0,5	0,3	1,7	2,9	4,0	6,1	1,4	1,8	3,8	6,2	1,5	2,1	5,0	9,6
	SD	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,3	0,4	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,1	0,3	0,6
20°C	MW	1,3	1,1	0,4	0,3	4,1	6,4	8,3	10,7	2,7	4,9	10,1	13,9	2,0	3,9	13,8	16,7
	SD	0,0	0,1	0,1	0,0	0,5	0,7	0,4	1,8	0,2	0,8	1,7	1,1	0,1	0,2	1,9	0,3

Tab. 8.2: Identitäts-Matrix der DNA der sieben 16S rRNAs aus P. putida KT2440

Identitäts-Matrix der sieben für die 16S rRNA kodierenden Gene von *P. putida* KT2440, erstellt mit Clustal Omega (Sievers et al., 2011), durch den jeweils paarweisen Vergleich der Sequenzen. Angegeben ist jeweils die prozentuale Identität zueinander sowie die Anzahl der einzelnen Basen-Austausche (SNPs).

16S rRNA	Α	В	С	D	E	F	G	rRNA- Operon
Identität	100,00%	100,00%	99,93%	99,80%	99,93%	99,87%	99,87%	Α
SNPs	0	0	1	3	1	2	2	A
	Identität	100,00%	99,93%	99,80%	99,93%	99,87%	99,87%	В
	SNPs	0	1	3	1	2	2	В
·		Identität	100,00%	99,87%	100,00%	99,93%	99,93%	С
		SNPs	0	2	0	1	1	C
			Identität	100,00%	99,87%	99,93%	99,93%	D
			SNPs	0	2	1	1	D
				Identität	100,00%	99,93%	99,93%	Е
				SNPs	0	1	1	
					Identität	100,00%	100,00%	_
					SNPs	0	0	F
						Identität	100,00%	G
						SNPs	0	G

Tab. 8.3: Identitäts-Matrix der DNA der sieben 23S rRNAs aus P. putida KT2440

Identitäts-Matrix der sieben für die 23S rRNA kodierenden Gene von *P. putida* KT2440, erstellt mit Clustal Omega (Sievers et al., 2011), durch den jeweils paarweisen Vergleich der Sequenzen. Angegeben ist jeweils die prozentuale Identität zueinander sowie die Anzahl der einzelnen Basen-Austausche (SNPs).

23S rRNA	A	В	С	D	E	F	G	rRNA- Operon
Identität	100,00%	99,97%	99,90%	99,93%	99,90%	99,86%	99,90%	
SNPs	0	1	3	2	3	4	3	Α
	Identität	100,00%	99,86%	99,97%	99,93%	99,90%	99,93%	В
	SNPs	0	4	1	2	3	2	В
·		Identität	100,00%	99,90%	99,86%	99,83%	99,86%	
		SNPs	0	3	4	5	4	С
			Identität	100,00%	99,97%	99,93%	99,97%	D
			SNPs	0	1	2	1	D
				Identität	100,00%	99,97%	100,00%	_
				SNPs	0	1	0	E
					Identität	100,00%	99,97%	F
					SNPs	0	1	
						Identität	100,00%	G
						SNPs	0	<u> </u>

Tab. 8.4: Identitäts-Matrix von jeweils 260 bp der *upstream region* der sieben rRNA-Operons *P. putida* KT2440 Identitäts-Matrix von jeweils 260 bp der *upstream region* der sieben rRNA-Operons von *P. putida* KT2440, erstellt mit Clustal Omega (Sievers et al., 2011), durch den jeweils paarweisen Vergleich der Sequenzen. Angegeben ist jeweils die prozentuale Identität zueinander sowie die Anzahl der einzelnen Basen-Austausche (SNPs).

16S USR 260bp	A	В	С	D	E	F	G	rRNA- Operon
Identität	100,00%	99,23%	99,23%	99,23%	99,62%	99,62%	99,62%	^
SNPs	0	2	2	2	1	1	1	Α
	Identität	100,00%	99,23%	100,00%	98,85%	99,62%	99,62%	В
	SNPs	0	2	0	3	1	1	В
		Identität	100,00%	99,23%	98,85%	98,85%	98,85%	•
		SNPs	0	2	3	3	3	С
			Identität	100,00%	98,85%	99,62%	99,62%	D
			SNPs	0	3	1	1	D
				Identität	100,00%	99,23%	99,23%	_
				SNPs	0	2	2	E
					Identität	100,00%	100,00%	F
					SNPs	0	0	F
						Identität	100,00%	G
						SNPs	0	G

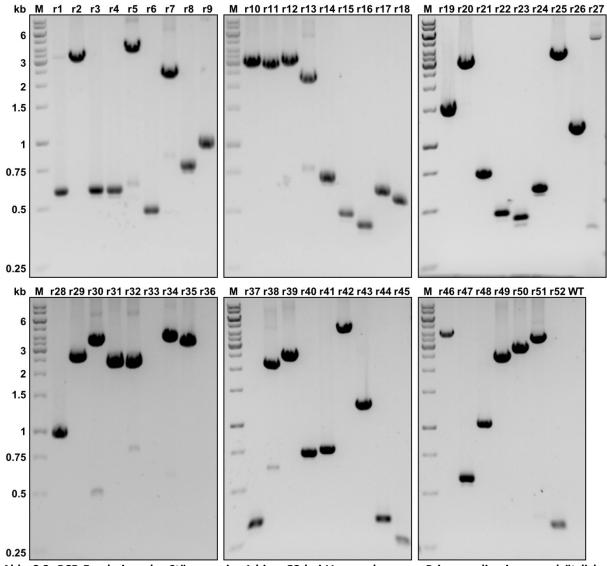


Abb. 8.2: PCR-Ergebnisse der Stämme pig-r1 bis –r52 bei Verwendung von Primern, die eine grundsätzliche Insertion des TREX-Transposons in einem rRNA-Operon anzeigen

Aufgetragen wurden jeweils  $5\,\mu\text{L}$  einer PCR, die mit dem Oligonukleotid Primerpaar AD53/AD54 und genomischer DNA der Prodigiosin-Produktionsstämme *P. putida* pig-r1 bis r52 (r1-r52) als Template durchgeführt wurde. Eine Auftrennung erfolgte in einem 1 % Agarosegel (Lautzeit 60 min). M = DNA Größenstandard (GeneRuler 1 kb DNA Ladder).

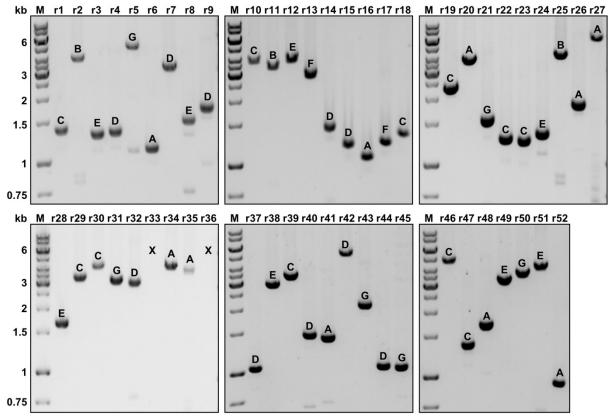


Abb. 8.3: PCR-Ergebnisse der Stämme pig-r1 bis −r52 bei Verwendung von Primern, die eine Insertion des TREX-Transposons in einem spezifischen rRNA-Operon anzeigen

Aufgetragen wurden jeweils 5 μL einer PCR, die mit den jeweils spezifischen Oligonukleotid Primerpaaren für ein rRNA-Operon (Operon **A:** AD53/AD106, **B:** AD53/AD107, **C:** AD53/AD108, **D:** AD53/AD109, **E:** AD53/AD110, **F:** AD53/AD111 und **G:** AD53/AD112) und genomischer DNA der Prodigiosin-Produktionsstämme *P. putida* pigr1 bis r52 (r1-r52) als Template durchgeführt wurde.Eine Auftrennung erfolgte in einem 1 % Agarosegel (Lautzeit 60 min). M = DNA Größenstandard (GeneRuler 1 kb DNA Ladder).

Tab. 8.5: Übersicht der Insertionsloki der Prodigiosin-Produktionsstämme pig-r1 bis r52

Angegeben sind Eckdaten des Insertionslocus des TREX-pig-Transposons für jeden der 52 T7RP-unabhängigen Prodigiosin-Produktionsstämme *P. putida* pig-r1 bis -r52 (r1-r52), nämlich der Locus Tag des Insertionsortes nach Pseudomonas GDB, die durch Sequenzierung des PCR-Produkts (**Abb. 8.3**) mit dem Oligonukleotid AD63 ermittelte Sequenz vor dem OE der L-TREX Kassette, die Position im Genom nach Pseudomonas GDB in bp sowie die Angabe der Kodierung des rRNA-Operons auf dem + oder - Strang im Genom.

	Insertionslocus TREX-pig Transposon im <i>P. putida</i> Genom					
Stamm	Locus Tag	Sequenz 5'→3' vor OE L-TREX	Position im Genom	Strang		
r1	PP 16SC	AACTGAGACACGGTCCAGACT	525266	+		
r2	PP 23SB	ACGATGTGGGAAGGCTTAGAC	179671	+		
r3	PP_16SE	AACTGAGACACGGTCCAGACT	1325820	+		
r4	PP_16SD	AACTGAGACACGGTCCAGACT	698141	+		
r5	PP_23SG	AACCGTACCCCAAACCGACAC	5308980	-		
r6	PP_16SA	AAAGCAGGGGACCTTCGGGCC	171581	+		
r7	PP_23SD	GGAACCCAGCCAGCATAAGCT	699993	+		
r8	PP_16SE	AGAATAAGCACCGGCTAACTC	1325993	+		
r9	PP_16SD	ATAGGAAGGAACACCAGTGGC	698527	+		
r10	PP_23SC	ACGATGTGGGAAGGCTTAGAC	527801	+		
r11	PP_23SB	TTAGGTAACACTGACTGGAGG	179351	+		
r12	PP_23SE	GCTCAAACCATGCACCGAAGC	1328465	+		
r13	PP_23SF	AGCCTGCGATAAGCTTTGGGG	2550797	+		
r14	PP_16SD	CAGTAAGTTAATACCTTGCTG	698277	+		
r15	PP_16SD	GCTATCAGATGAGCCTAGGTC	698041	+		
r16	PP_16SA	TTTCGAAAGGAACGCTAATAC	171541	+		
r17	PP_16SF	TGGGCGAAAGCCTGATCCAGC	2549061	+		
r18	PP_16SC	ACACGGTCCAGACTCCTACGG	525273	+		
r19	PP_16SC	AGCCGCGAGGTGGAGCTAATC	526209	+		
r20	PP_23SA	TACAAGTGCCGAGCATGGGAG	174134	+		
r21	PP_16SG	GAAGGCAGTAAGTTAATACC	5312232	-		
r22	PP_16SC	CTACGGGAGAAAGCAGGGGAC	525132	+		
r23	PP_16SC	TTTCGAAAGGAACGCTAATAC	525101	+		
r24	PP_16SE	AACTGAGACACGGTCCAGACT	1325820	+		
r25	PP_23SB	ACGATGTGGGAAGGCTTAGAC	179671	+		
r26	PP_16SA	TAAACGATGTCAACTAGCCGT	172199	+		
r27	PP_23SA	AACTTGCCTCAAGATGAGATC	175975	+		
r28	PP_16SE	GGCGAAGGCGACCACCTGGAC	1326224	+		
r29	PP_23SC	GCGAGCTTAACCGAATAGGGG	527372	+		
r30	PP_23SC	TCCAGGTTTAAGGTGGTAGGC	528231	+		
r31	PP_23SG	AGCCTGCGATAAGCTTTGGGG	5310506	+		
r32	PP_23SD	AGCCTGCGATAAGCTTTGGGG	699932	+		
r33		nicht in rRNA-Operon				
r34	PP_23SA	AGGCGACGAAGTGGTTGATAC	174749	+		
r35	PP_23SA	ACGATGTGGGAAGGCTTAGAC	174241	+		
r36		Nicht in rRNA-Operor				
r37	PP_16SD	GCAGGCCTAACACATGCAAGT	697869	+		

	Insertionslocus TREX-pig Transposon im <i>P. putida</i> Genom					
Stamm	Locus Tag	Sequenz 5'→3' vor OE L-TREX	Position im Genom	Strang		
r38	PP_23SE	TCTGAATGGGGGAACCCAGCC	1327449	+		
r39	PP_23SC	CGAAAAGAACCCCGGAGAGGG	527247	+		
r40	PP_16SD	TAATACCTTGCTGTCTTGACG	698285	+		
r41	PP_16SA	AGAATAAGCACCGGCTAACTC	1325993	+		
r42	PP_23SD	GATAGGTGGGAGGCTTTGAAG	701974	+		
r43	PP_16SG	TTTCCAGAGATGGATTGGTGC	5311675	-		
r44	PP_16SD	GCAGGCCTAACACATGCAAGT	697869	+		
r45	USR PP_16SG	TTGCTGAGCCAAGTTTAGGGT	5312719	-		
r46	PP_23SC	AATTCCTTGTCGGGTAAGTTC	528707	+		
r47	PP_16SC	GATGATCAGTCACACTGGAAC	525248	+		
r48	PP_16SA	GGGGAGCAAACAGGATTAGAT	172159	+		
r49	PP_23SE	TGACCGATAGTGAACCAGTAC	1327767	+		
r50	PP_23SG	TGAAACCGTATGCGTACAAGC	5310067	-		
r51	PP_23SE	TTAATCGACGCAGGGTTAGTC	1328650	+		
r52	PP_16SA	ACGCTGGCGGCAGGCCTAACA	171425	+		

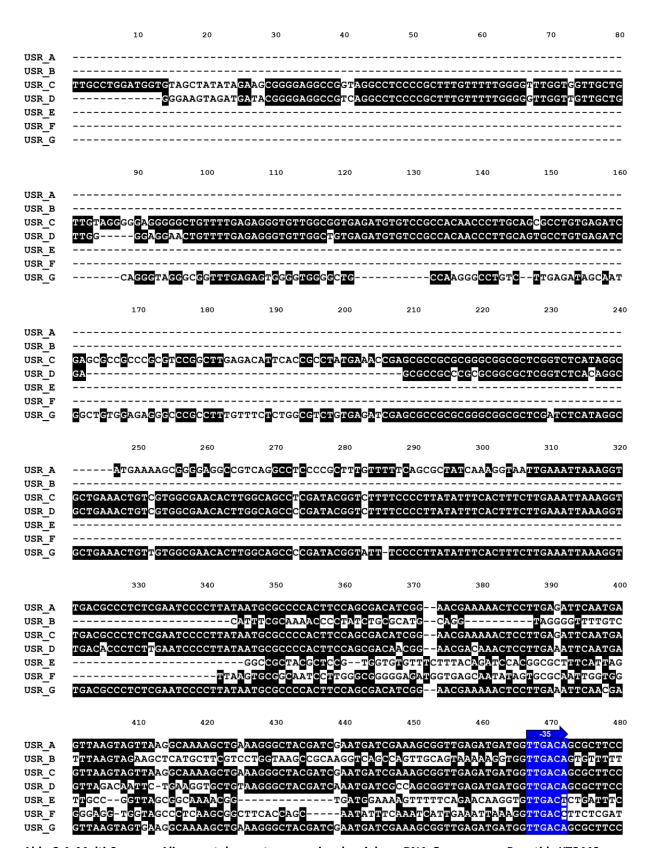
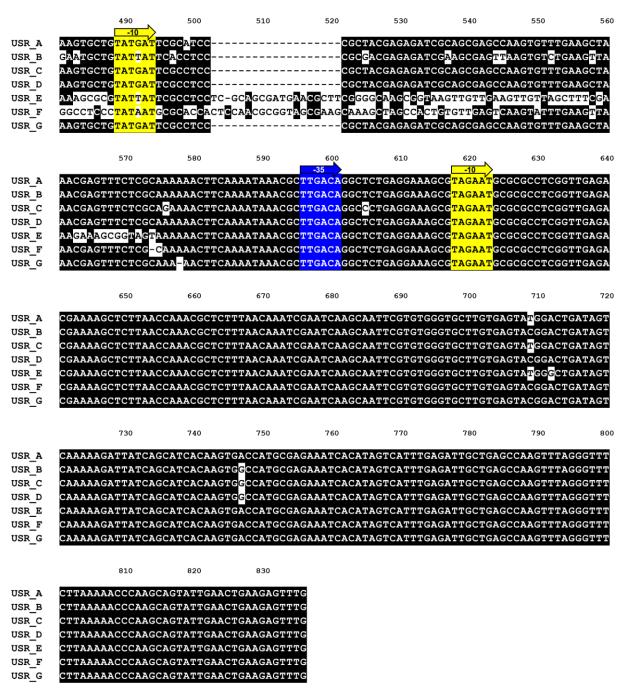


Abb. 8.4: Multi-Sequenz-Alignment der *upstream region* der sieben rRNA-Operons von *P. putida* KT2440 Ein Multi-Sequenz-Alignment der *upstream region* (USR) der sieben rRNA-Operons (A-G) von *P. putida* KT2440 durchgeführt mit Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Mehrheitlich gleiche Basen sind schwarz hinterlegt, von der Mehrheit abweichende weiß. Zusätzlich sind die beiden mit BPROM (Solovyev und Salamov, 2011) identifizierten Promotorregionen der rRNA-Operons hervorgehoben, hierbei ist die -10 Region jeweils gelb und die -35 Region blau hinterlegt. **Fortführungung nächste Seite.** 



Fortführung von Abb. 8.4: Multi-Sequenz-Alignment der upstream region der sieben rRNA-Operons von P. putida KT2440

Ein Multi-Sequenz-Alignment der *upstream region* (USR) der sieben rRNA-Operons (A-G) von *P. putida* KT2440 durchgeführt mit Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Mehrheitlich gleiche Basen sind schwarz hinterlegt, von der Mehrheit abweichende weiß. Zusätzlich sind die beiden mit BPROM (Solovyev und Salamov, 2011) identifizierten Promotorregionen der rRNA-Operons hervorgehoben, hierbei ist die -10 Region jeweils gelb und die -35 Region blau hinterlegt.

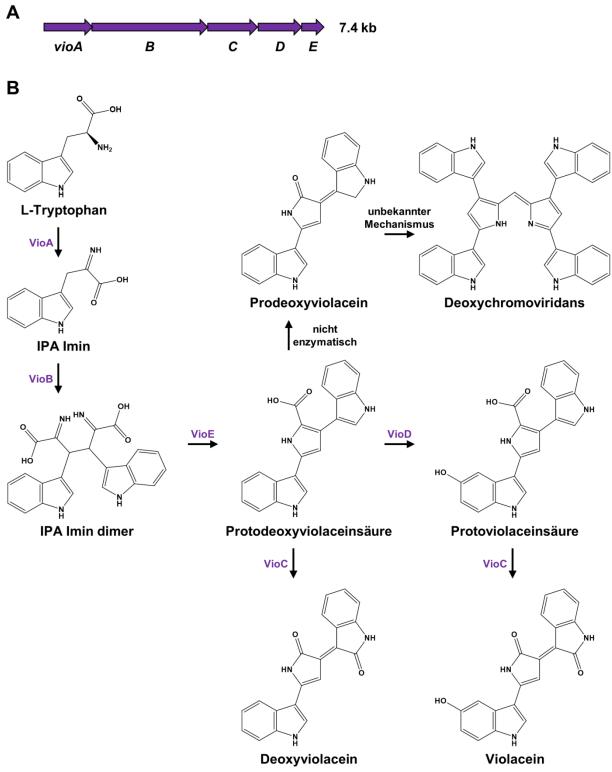
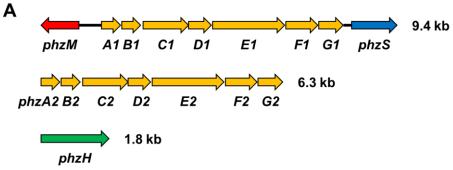
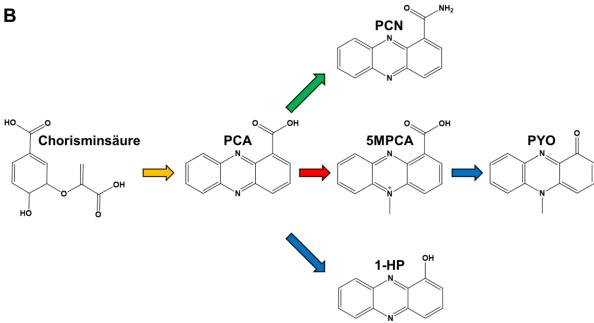


Abb. 8.5: Schematische Darstellung des Violacein Genclusters aus *Chromobacterium violaceum* sowie des von ihm kodierten Biosyntheseweges

**A:** Violacein-Gencluster aus *C. violaceum*. **B:** Violacein-Biosyntheseweg von *C. violaceum*. IPA = Indol-3-Brenztraubensäure. Modifiziert nach Lee et al. (2013).





PCA Phenazin-1-Carbonsäure

**5MPCA** 5-Methylphenazin-1-Carbonsäure

**PYO** Pyocyanin

PCN Phenazin-1-Carbonsäureamid

**1-HP** 1-Hydroxyphenazin

# Abb. 8.6: Schematische Darstellung des Phenazin-Genclusters aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sowie des von ihm kodierten Biosyntheseweges

**A:** Phenazin-Gencluster aus *P. aeruginosa* PAO1. **B:** Phenazin-Biosyntheseweg von *P. aeruginosa* PAO1. Modifiziert nach Mavrodi et al. (2001).

#### Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" erstellt worden ist.

Diese Dissertationsschrift wurde in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Fakultät eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den	
Ort, Datum	Andreas, Domröse