HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Rhodobacter capsulatus als alternativer Wirt zur Produktion pflanzlicher Sesquiterpenoide

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Katrin Troost geb. Pünder

aus Hamburg

Düsseldorf, Juni 2017

aus dem Institut für molekulare Enzymtechnologie (IMET)

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Herr Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferent: Frau Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2017

Meiner Familie und im Besonderen meinen Großvätern

VERÖFFENTLICHUNGEN

Özgür AY, Heck A, Svensson V, Troost K, Malach A, Gamer M, Jaeger K-E, Drepper T (2017). *Rhodobacter capsulatus*: An alternative platform organism for the expression of therapeutically relevant membrane proteins. *In Vorbereitung*

Troost K, Loeschcke A, Linke K, Weber TM, Klaus O, Jaeger K-E, Drepper T (2017). Heterologous production of plant terpenoids in *Rhodobacter capsulatus*. *In Vorbereitung*

PRÄSENTATIONEN BEI NATIONALEN UND INTERNATIONALEN KONFERENZEN

Özgür A, Pünder K, Heck A, Jaeger K-E, Gamer M, Drepper T (2014). The photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* as an alternative platform organism for the expression of human membrane proteins. *Cambridge Healthtech Institute´s 13th Annual PepTalk – The Protein Science Week,* Palm Springs, CA, USA *Poster-Präsentation und Vortrag*

Heck A, Özgür A, Katzke N, Svensson V, Malach A, Pünder K, Loeschcke A, Gamer M, Jaeger K-E (2015). *Rhodobacter capsulatus* – an alternative host for the production of heterologous membrane proteins. *FEMS 6th Congress of European Microbiologists*, Maastricht, Niederlande *Poster-Präsentation*

Heck A, Özgür A, Katzke N, Svensson V, Malach A, Pünder K, Loeschcke A, Gamer M, Jaeger K-E, Drepper T (2015). Functional synthesis of heterologous membrane proteins in the alternative expression host *Rhodobacter capsulatus*. *15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (ISPP)*, Tübingen, Deutschland *Vortrag*

Troost K, Loeschcke A, Jaeger K-E, Drepper T (2016). *Rhodobacter capsulatus*: an alternative microbial platform for the terpenoid production. *VAAM Jahrestagung*, Jena, Deutschland *Poster-Präsentation*

Thies S, Loeschcke A, Domroese A, Klein A, Pietruszka J, Hilgers F, Weihmann R, Binder D, Troost K, Jaeger K-E, Drepper T (2016). Novel microbial production strategies for natural products with antimicrobial properties. *IV International Conference on Antimicrobial Researche (ICAR)*, Malaga, Spanien *Poster-Präsentation*

Troost K, Loeschcke A, Jaeger K-E, Drepper T (2017). *Rhodobacter capsulatus* as alternative microbial platform for terpenoid production. *MICROBIOLOGY AND INFECTION 2017; VAAM Jahrestagung 2017 & 69-te Jahrestagung der DGHM,* Würzburg, Deutschland *Poster-Präsentation*

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger danke ich für die Herausgabe des wirklich sehr interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Bei Frau Prof. Dr. Martina Pohl möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Bei Dr. Thomas Drepper und Dr. Anita Loeschcke bedanke ich mich herzlichst für die wirklich großartige und engagierte Unterstützung und die freundschaftliche Atmosphäre, die über die Zeit entstanden ist und auch für die Korrektur dieser Arbeit, bei der auch Dr. Stephan Thies eine namentliche Erwähnung verdient.

Im Speziellen möchte ich mich bei den folgenden Personen für die erstklassige Zusammenarbeit bedanken: meinen beiden Masterstudenten Sonja Kubicki und Karl Linke, meinem damaligen Praktikanten Oliver Klaus und meiner Lieblings-TA Vera Svensson.

Darüber hinaus möchte ich dem gesamten Institut für molekulare Enzymtechnologie, besonders den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der „AG Drepper“, meinen Dank aussprechen. Und im Besonderen danke ich den Mitgliedern aus meinem geliebten Labor 409 und meinen Bürokollegen: Ihr habt es geschafft, dass ich mich auf der Arbeit immer wohl gefühlt habe, Ihr habt mir sowohl bei wissenschaftlichen als auch persönlichen Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ich hoffe ich konnte das ebenso zurückgeben.

Namentlich erwähnen möchte ich vor allen meine Mädels aus Labor 409/411: Dr. Anita Loeschcke, Fabienne Hilgers, Jennifer Hage-Hülsmann, Lena Peters, Dr. Nadine Katzke und Vera Svensson. Ihr wart für mich nicht nur Arbeitskollegen: Ihr seid mir richtig ans Herz gewachsen und ich hoffe, dass wir weiterhin noch Flammlachs essen und Kekse backen werden.

Zum Schluss geht ein besonderer Dank an meine ganze Familie, die mich während des ganzen Studiums unterstützt und mir dieses erst ermöglicht hat. Meinem Vater möchte ich besonders danken, da er sich, wie für jede meiner Abschlussarbeiten, die Zeit genommen hat, auf Rechtschreibung, Grammatik und im Besonderen auf die Kommasetzung zu achten. Außerdem möchte ich mich bei meinem Mann Nico bedanken, der immer ein Ohr für meine Probleme hat und mich wieder aufbaut, wenn ich an mir zweifle und immer hinter mir steht.

Vielen, vielen Dank!!!

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis V
Abkürzungsverzeichnis VIII
1 Einleitung 1
1.1 Terpenoide 1
1.1.1 Terpenoidbiosynthese 1
1.1.1.1 MVA-Biosyntheseweg 3
1.1.1.2 DXP-Biosyntheseweg 4
1.1.1.3 Synthese von Prenylpyrophosphat-Terpenvorstufen 5
1.1.1.4 Terpenoidproduktion 5
1.1.2 Natürliche Funktionen von Terpenoiden 7
1.1.3 Industrielle Anwendung von Terpenoiden 9
1.2 Heterologe Terpenoidproduktion 12
1.2.1 *Rhodobacter capsulatus* und seine natürliche Tetraterpenproduktion 15
1.2.2 Expressionsvektoren für *Rhodobacter capsulatus* 20
1.3 Zielsetzung 22
2 Material und Methoden 24
2.1 Bakterienstämme 24
2.2 Vektoren 24
2.3 Oligonukleotide 26
2.4 Chemikalien und Geräte 27
2.5 Puffer und Lösungen 27
2.6 Antibiotika 29
2.7 Molekularbiologische Methoden 30
2.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) 30
2.7.2 Agarose-Gelelektrophorese 30
2.7.3 Elution von DNA aus Agarosegelen 31
2.7.4 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen 31
2.7.5 Ligation von DNA-Fragmenten 32
2.7.6 Transformation von Bakterien-Zellen mit Plasmid-DNA 32
2.7.6.1 Herstellung chemisch transformationskompetenter *E. coli* Zellen 32
2.7.6.2 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA 32
2.7.7 Konjugativer Transfer mobilisierbarer Plasmide von *E. coli* zu *R. capsulatus* 33
2.7.8 Präparation von DNA (Birnboim & Doly, 1979) 33

2.7.8.1 Präparation von Plasmid-DNA 33
2.7.8.2 Präparation von genomischer DNA 34
2.7.9 Sequenzierung von DNA 34
2.8 Mikrobiologische Methoden 34
2.8.1 Anzucht von Bakterien 34
2.8.1.1 Anzucht von *E. coli* 34
2.8.1.2 Anzucht von *Rhodobacter capsulatus* (Klipp *et al.*, 1988) 35
2.8.1.3 Versuchsaufbau und Kultivierungsbedingungen für die Produktion von Patchoulol in *R. capsulatus* 36
2.8.2 Kryokonservierung (nach Koh, 2013) 39
2.8.3 Erzeugung der *knockout*-Mutante SB1003Δ*crtE* 40
2.9 Proteinbiochemische Methoden 42
2.9.1 Präparation von Proteinproben für SDS-PAGE 42
2.9.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) 42
2.9.3 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot) 43
2.9.4 Immunodetektion von Proteinen 43
2.9.5 Amidoschwarz-Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen 44
2.10 Biopyhsikalische Methoden 44
2.10.1 Bestimmung der Zelldichte 44
2.10.2 Aufnahme von Absorptionsspektren (Loeschcke, 2012) 44
2.10.3 Fluoreszenzmessung (Özgür, 2015) 44
2.10.4 Gaschromatographie (Katzke, 2010) 45
2.10.4.1 Bestimmung der Terpenausbeute 45
2.11 Verwendete Datenbanken, *sofware* und *online tools* 48
3 Ergebnisse 49
3.1 Einfluss der Zellphysiologie auf die Terpenproduktion in *Rhodobacter capsulatus* 50
3.1.1 Natürliche Terpenproduktion in *Rhodobacter capsulatus* 50
3.1.2 Sauerstoffabhängigkeit des *nif*-basierten Promotor-Systems 53
3.2 Heterologe Terpensynthese in *R. capsulatus* 56
3.2.1 Einfluss der Promotorstärke und Wahl des Mediums auf die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* 57
3.2.2 Optimierung der Patchoulolproduktion durch *metabolic engineering* 60
3.2.2.1 Strategien zur Optimierung der heterologen Terpenproduktion in *R. capsulatus*. 60
3.2.2.2 Konstruktion von Expressionsvektoren für eine optimierte heterologe Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* 63

3.2.2.3 Einfluss auf die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* durch *engineering* des FPP-Moduls ... 66

3.2.2.4 Auswirkungen auf die Patchoulolprodukion in *R. capsulatus* durch *engineering* des DXP- und MVA-Moduls ... 68

3.2.2.5 Einfluss auf die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* durch *engineering* des MVA-Moduls durch genombasierte Genexpression ... 71

3.2.2.6 Bestimmung der maximalen Patchoulol-Produktionsrate in *R. capsulatus* SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi* ... 74

3.2.3 Einfluss von *metabolic engineering* auf die wirtsfremde Produktion von Valencene in *R. capsulatus* ... 76

3.2.3.1 Einfluss von *metabolic engineering* auf die durch die Expression der *Citrus sinensis*-Valencensynthase vermittelte Valencenproduktion in *R. capsulatus* ... 77

3.2.3.2 Einfluss von *metabolic engineering* auf die durch die Expression der *Callitropsis nootkatensis*-Valencensynthase vermittelte Valencenproduktion in *R. capsulatus* ... 79

3.2.3.3 Bestimmung der maximalen Valencen-Produktionsrate in *R. capsulatus* SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA* ... 82

4 Diskussion ... 84

4.1 *Metabolic engineering* zur gesteigerten Terpenoidproduktion in *R. capsulatus* ... 85

4.1.1 Regulation der Terpenoidbiosynthese durch *feedback*- und *feedforward*-Inhibierung 85

4.1.2 Einfluss verschiedener *metabolic engineering* Strategien auf die Produktion wirtsfremder Sesquiterpenoide in *R. capsulatus* ... 88

4.1.3 Einfluss der katalytischen Effizienz von Terpensynthasen auf die Produktion wirtsfremder Sesquiterpenoide in *R. capsulatus* ... 92

4.2 Stellt *Rhodobacter capsulatus* einen alternativen Plattformorgansimus für die heterologe Terpenproduktion dar? ... 96

4.3 Weitere Optimierungmöglichkeiten der heterologen Terpenoidproduktion in *R. capsulatus* 98

4.3.1 Erhöhte Produktbildung durch Steigerung des Proteinlevels der Terpensynthase ... 98

4.3.2 Verbesserung der Produktsekretion durch Verwendung eines EPS-defizienten *R. capsulatus* Stammes 37b4 ... 100

4.3.3 Steigerung der Terpenoidproduktion unter aeroben Bedingungen ... 101

4.3.3.1 Deletion des Repressorgens *crtJ* ... 101

4.3.3.2 Implementierung Sauerstoff-insensitiver Transkriptionsaktivatoren der *nif*-Gene ... 102

4.4 Ausblick: *R. capsulatus* für zukünftige bioökonomische Anwendungen ... 104

5 Zusammenfassung ... 106

6 Summary ... 108

7 Literaturverzeichnis ... 110

8 Anhang 123
8.1 Kodonoptimierte Sequenzen der verwendeten Terpensynthasen 123
8.1.1 Kodonoptimierte DNA-Sequenz der Patchoulolsynthase aus *Pogostemon cablin* 123
8.1.2 Kodonoptimierte DNA-Sequenz der Valencensynthase aus *Citrus sinensis* 123
8.1.3 Kodonoptimierte DNA-Sequenz der Valencensynthase aus *Callitropsis nootkatensis* 124
8.2 Sequenz-Vergleich der dxs-Genvarianten aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* 124
8.2.1 DNA-Sequenz-Vergleich 124
8.2.2 Proteinsequenz-Vergleich 128
8.3 Sequenz-Vergleich der idi-Genvarianten aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* 129
8.3.1 DNA-Sequenz-Vergleich 129
8.3.2 Protein-Sequenzvergleich 130
8.4 Optische Dichte bei 660 nm einzelner Expressionskulturen 131
8.4.1 Zelldichten zur Untersuchung der natürlichen Carotinoidproduktion in *R. capsulatus* in Abhängigkeit von Sauerstoff 131
8.4.2 Zelldichten zur Untersuchung der Sauerstoffabhängigkeit des *nif*-Systems 131
8.4.3 Zelldichten zum Versuch die Patchoulolsynthase mit verschiedenen Expressionsvektoren in unterschiedlichen Medien zu exprimieren 132
8.5 Übersicht über die mit *metabolic engineering* erreichten Terpenoidausbeuten in den *R. capsulatus* Stämmen SB1003 und SB1003+MVA 132
8.6 Optimierung der heterologen Terpenoidproduktion in *R. capsulatus* 133
8.6.1 Patchoulolproduktion in dem EPS-defizienten *R. capsulatus* Stamm 37b4 133
8.6.2 Terpenoidsynthese in der knockout Mutante *R. capsulatus* SB1003 Δ*crtJ* 133
8.6.3 Verwendung von O_2-toleranten NifA-Varianten aus *K. pneumoniae* und *A. vinelandii* 134

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Übersicht über die allgemeine Terpenbiosynthese. 2
Abb. 2. Überblick über die Anwendungsgebiete von Terpenen in der Industrie. 10
Abb. 3. Natürliche Terpenbiosynthese in *R. capsulatus* 18
Abb. 4. Expressionsvektoren für *R. capsulatus*. 21
Abb. 5. Spezifischer Ablauf der Experimente für die heterologe Terpenproduktion. 37
Abb. 6. Überprüfung der Anwendbarkeit der GC-Methode zur Bestimmung der Patchoulolproduktion in *R. capsulatus*. 39
Abb. 7. Konstruktion des Mutagenesevektors zur Erzeugung der SB1003Δ*crtE*-Mutante. 40
Abb. 8. Identifizierung einer *double-crossover* Δ*crtE*-Mutante. 41
Abb. 9. Kalibration zur Quantifizierung von Terpenen in gaschromatographischer Analyse. 46
Abb. 10. Analyse von Terpen-Standards mittel GC-MS. 47
Abb. 11. Überprüfung ausgewählter Proben von Expressionskulturen zur Produktion von Patchoulol und Valencen mittels GC-MS. 48
Abb. 12. Darstellung der Sauerstoffabhängigkeit der natürlichen Carotinoidproduktion in *R. capsulatus*. 52
Abb. 13. Einfluss von O_2 auf die *nif*-Promotor-vermittelte Expression von *eyfp*. 55
Abb. 14. Einfluss verschiedener Promotoren und Medien auf die PatS-vermittelte Patchoulolproduktion in *R. capsulatus*. 58
Abb. 15. Module der Terpenbiosynthese als Ansatzpunkt zur Optimierung der Terpenproduktion in *R. capsulatus*. 61
Abb. 16. Konstruktion der verschiedenen Expressionsvektoren zur Optimierung der heterologen Patchoulolproduktion. 64
Abb. 17. Einfluss auf die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* durch *engineering* des FPP-Moduls. 67
Abb. 18. Auswirkungen auf die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* SB1003 durch *engineering* der DXP- und MVA-Module. 69
Abb. 19. Auswirkungen der Genomintegration des MVA-Biosynthesewegs in *R. capsulatus* auf dessen heterologe Patchoulolproduktion. 72
Abb. 20. Bestimmung der maximalen Patchoulol-Produktionrate in *R. capsulatus* SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi*. 74
Abb. 21. Einfluss von *metabolic engineering* auf die durch die Expression der *Citrus sinensis*-Valencensynthase vermittelte Valencenproduktion in *R. capsulatus*. 78

Abb. 22. Einfluss von *metabolic engineering* auf die durch die Expression der *Callitropsis nootkatensis*-Valencensynthase vermittelte Valencenproduktion in *R. capsulatus*. 80
Abb. 23. Bestimmung der maximalen Valencen-Produktionsrate in *R. capsulatus* SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA*. 82
Abb. 24. Mögliches Auftreten von *feedback*- und *feedforward*-Inhibierung in *R. capsulatus* bei gesteigerter Isoprenoidproduktion durch *metabolic engineering*..... 86
Abb. 25. Verwandtschaftsgrad der DNA-Sequenzen zwischen den dxs-Genen in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*. 127
Abb. 26. Verwandtschaftsgrad der Protein-Sequenzen zwischen der DxS-Proteine aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*. 129
Abb. 27. Gen-Sequenzvergleich zwischen den *idi*-Genvarianten aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides.* 130
Abb. 28. Protein-Sequenzvergleich der Idi-Proteine aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*. 130
Abb. 29. Patchoulolproduktion in dem EPS-defizienten *R. capsulatus* Stamm 37b4. 133
Abb. 30. Terpenoidsynthese in der *knockout* Mutante *R. capsulatus* SB1003 Δ*crtJ*. 133
Abb. 31. Fluoreszenz des Reporter-Gens *eyfp* durch die Expression von *eyfp* und *nifA* aus *K. pneumoniae* und *A. vinelandii* in pRhon5Hi-2-*eyfp-nifA KP/AV* unter verschiedener Sauerstoffversorgung. 134

Tabellenverzeichnis

Tab. 1. In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme 24
Tab. 2. In dieser Arbeit verwendete Vektoren..... 24
Tab. 3. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. 26
Tab. 4. Puffer und DNA-Größenstandard für Agarose-Gelelektorphorese (2.7.2) 27
Tab. 5. Puffer zum Zellaufschluss (2.10.3)..... 28
Tab. 6. Puffer und Protein-Größenstandard für SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2.9.1+2.9.2). 28
Tab. 7. Puffer und Lösungen zum Immunoblotting (Western Blot) (2.9.3+2.9.4+2.9.5) 29
Tab. 8. Eingesetzte Antibiotikakonzentrationen..... 29
Tab. 9. Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes..... 30
Tab. 10. Programm für die Polymerasekettenreaktion 30
Tab. 11. Medienkomponenten für die Kultivierung von *E. coli* 34
Tab. 12. Medienkomponenten und -zusammensetzung für die Kultivierung von *R. capsulatus* 35
Tab. 13. Übersicht verschiedener Kennzahlen zur Patchoulolproduktion..... 75
Tab. 14. Übersicht verschiedener Kennzahlen der Valencenproduktion 83
Tab. 15. Übersicht über die Effekte der modifizierten Module auf die Terpenproduktion..... 90

Tab. 16. Kinetische Konstanten der Terpensynthasen ValS, CnVS und PatS. 93
Tab. 17. Zelldichten zum Ende der Kultivierung der Expressionskulturen zur Untersuchung der Sauerstoffabhängigen Carotinoidproduktion in *R. capsulatus* (3.1.1, Abb. 12). 131
Tab. 18. Zelldichten zum Ende der Kultivierung der Expressionskulturen zur Untersuchung der Sauerstoffabhängigkeit des *nif*-Systems (3.1.2, Abb. 13). 131
Tab. 19. End-$OD_{660\ nm}$-Bestimmung der Expressionskulturen, in denen die Patchoulolsynthase mit verschiedenen Expressionsvektoren in unterschiedlichen Medien exprimiert wurden (3.2.1, Abb. 14). 132
Tab. 20. Übersicht über die mit metabolic engineering erreichten Terpenoidausbeuten in den *R. capsulatus* Stämmen SB1003 und SB1003+MVA..... 132

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A. dest.	aqua destillata (destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Centimeter
Cm	Chloramphenicol
DCW	Trockengewicht (englisch: dry cell weight)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: *acid*)
EPG	Eppendorfgefäß(e)
et al.	und andere
g	Gramm
xg	ein Vielfaches der Erdbeschleunigung
Gm	Gentamicin
h	Stunde(n)
HK	Hauptkultur
Hz	Hertz; Frequenz 1/s
kb	Kilobase(n)
Km	Kanamycin
kPa	Kilopascal
konz.	konzentriert
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m	Meter
max.	maximal
min	Minute(n)
mA	Milliampere
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.a.	per analysis
Rif	Rifampicin
t_R	Retentionszeit [min]
s	Sekunde(n)
s.o.	siehe oben
Sm	Streptomycin
Spc	Spectinomycin
Tet	Tetracyclin
ü.N.	über Nacht
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
VK	Vorkultur
λ	Wellenlänge
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
V	Volt
W	Watt

1 EINLEITUNG

1.1 Terpenoide

Terpenoide bilden in Pflanzen zusammen mit Alkaloiden und Phenylpropanoiden die Hauptgruppen der sogenannten Sekundärmetabolite (Croteau *et al.*, 2000), die u.a. zum Schutz vor Herbivoren und zum Zweck der Kommunikation dienen (Lange *et al.*, 2000). Terpenoide sind im Allgemeinen ubiquitär verbreitet, denn Bakterien, Pilze, Algen und auch einige Tiere, hauptsächlich Insekten und marine Organismen, können Terpenoide produzieren (Wang *et al.*, 2005; Paduch *et al.*, 2007). Es sind über 55.000 strukturell unterschiedliche Terpenoide bekannt (Ye *et al.*, 2016), die Mehrzahl konnte hauptsächlich aus Pflanzen und Bakterien isoliert werden (Hemmerlin *et al.*, 2012). Allein 5.000 davon wurden erst in den letzten vier Jahren neu beschrieben, ein Hinweis auf die bislang noch unentdeckte Vielfalt an Terpenoiden und auch auf das wissenschaftliche und wirtschaftliche Interesse an diesen Naturstoffen. Grundlage dieser hohen strukturellen Diversität ist nicht nur die Variation des Grundgerüstes, sondern auch dessen Dekoration mit den verschiedensten, funktionellen Gruppen. Mögliche Dekorationen sind zum Beispiel Alkohol-, Aldehyd-, Keton-, Ester-, Ether-, Phenol- und Peroxidgruppen (Harrewijin *et al.*, 2001; Bakkali *et al.*, 2008).

1.1.1 Terpenoidbiosynthese

Der Begriff der Terpenoide, wurde schon im 19. Jahrhundert durch August Kekulé geprägt, der ein Baumharz, welches neben Harzsäuren u.a. Kohlenwasserstoffe beinhaltete, als „Terpentin“ bezeichnete (Kekulé, 1863). Die Grundstruktur von Terpenoiden basiert nur auf Kohlenwasserstoffen, solche Terpenoide werden als Terpene bezeichnet. Anhand der Anzahl ihrer Kohlenstoffatome werden diese in verschiedene Terpenklassen eingeteilt (Ruzicka, 1953), den Hemi- (C_5), Mono- (C_{10}), Sesqui- (C_{15}), Di- (C_{20}), Tri- (C_{30}), Tetra- (C_{40}) und Polyterpenen (C_{5n}; n>8) (Croteau *et al.*, 2000). All diese Terpene haben gemeinsam, dass ihr Gerüst aus einer Anzahl von Kohlenstoffatomen besteht, die immer durch fünf teilbar ist. Dieses Phänomen wird als „biogenetische Isoprenregel“ bezeichnet, die 1887 erstmals von Otto Wallach für Mono- und Sesquiterpene vermutet wurde und schließlich von Leopold Ruzicka für alle Terpenklassen beschrieben wurde (Ruzicka, 1953; Ruzicka, 1963). Tatsächlich ist die kleinste gemeinsame Untereinheit von allen Terpenoiden das Isopren, welches aus fünf Kohlenstoffatomen besteht. Dies liegt in der Biosynthese der Terpenoide begründet, denn alle Terpenoide gehen auf die Isoprenderivate Isopentenyldiphosphat (IPP) und Dimethylallydiphosphat (DMAPP) zurück, aus denen die Vorstufen für die verschiedenen Terpenklassen abgeleitet werden. Die Vorläufermoleküle IPP und DMAPP können dabei über zwei verschiedene, voneinander unabhängige Biosynthesewege gebildet werden (**Abb. 1**). Über den Mevalonat-Weg (MVA-Weg) und den Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg), der auch unter dem Namen

Deoxyxylulosephosphat-Weg (DXP-Weg) bekannt ist. In dieser Arbeit wird er ausschließlich als DXP-Weg bezeichnet.

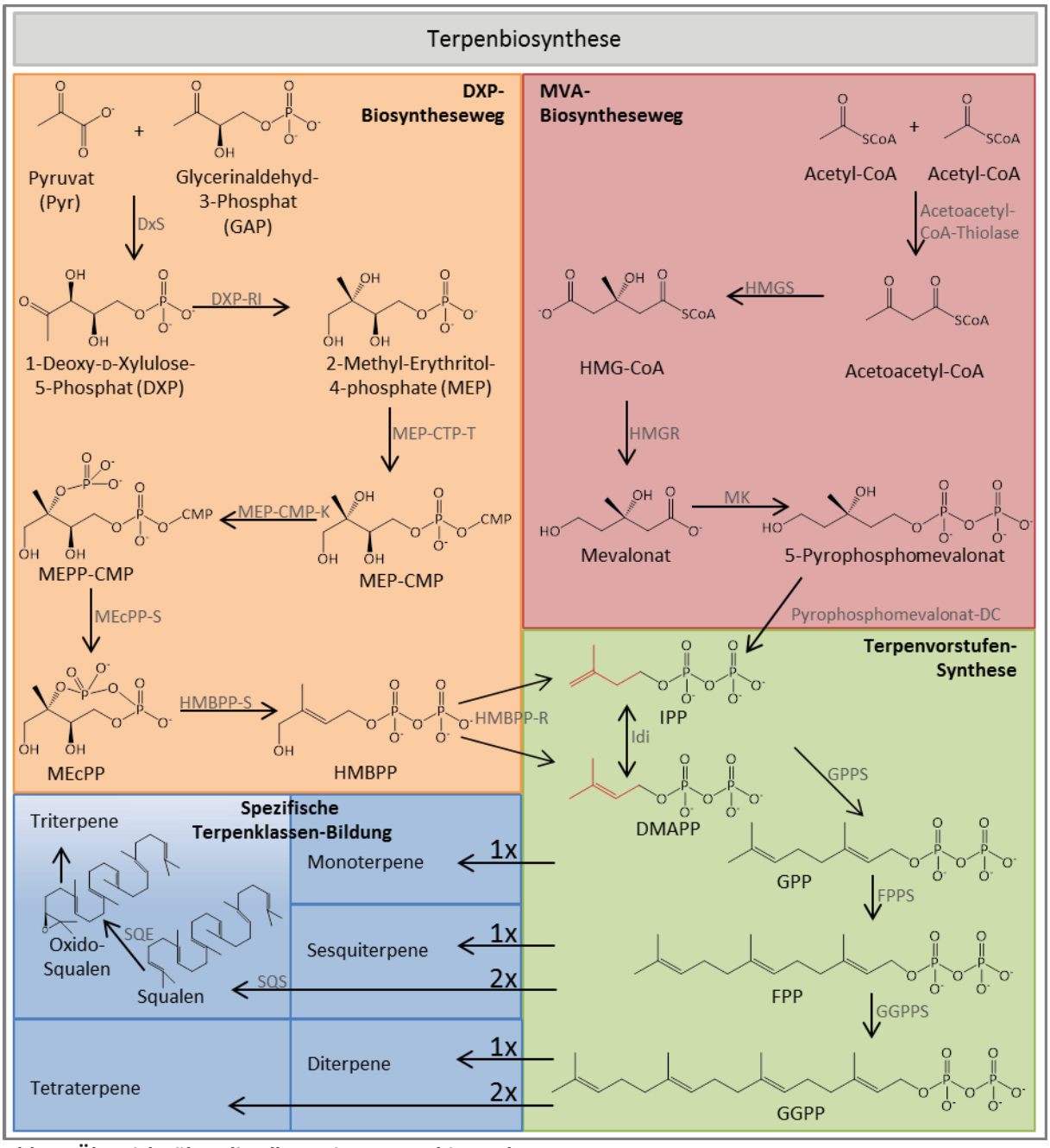

Abb. 1. Übersicht über die allgemeine Terpenbiosynthese.
Die Isoprenderivate (Isoprenteil rot markiert) Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) können über zwei verschiedene Biosynthesewege gebildet werden. Auf der einen Seite gibt es den DXP-Biosyntheseweg (orange hinterlegt) und auf der anderen Seite den MVA-Biosyntheseweg (rot hinterlegt). Der DXP-Biosyntheseweg beginnt mit Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat, wohingegen der MVA-Biosyntheseweg mit zwei Molekülen Acetyl-CoA startet. Die durch die verschiedenen Wege produzierten Moleküle IPP und DMAPP dienen als Ausgangsstoffe für die Terpenvorstufen-Synthese (grün hinterlegt), bei der die direkten Vorstufen für die verschiedenen Terpenklassen (blau hinterlegt) gebildet werden.
DxS: 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase; RI: Reduktoisomerase; CTP: Cytidyltriphosphat; CMP: Cytidylmonophosphat; T: Transferase; K: Kinase; S: Synthase; MEcPP: 2-Methyl-D-Erythritol-2,4-cylo-Pyrophosphat; HMBPP: 1-Hydroxy-2-Methyl-2-Butenylpyrophosphat; CoA: Coenzym A; HMG: β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA; MK: Mevalonatkinase; DC: Decarboxylase; Idi: Isopentenylpyrophosphat-Isomerase; GPP:

Geranylpyrophosphat, FPP: Farnesylpyrophosphat; GGPP: Geranylgeranylpyrophosphat; SQS: Squalensynthase; SQE: Squalenexpoxidase.

Der MVA-Weg konnte bereits 1967 komplett aufgeklärt werden (Allen *et al.*, 1967), wohingegen der DXP-Weg erst in den 1990ern durch *labeling*-Experimente sowohl in Bakterien (Flesch & Rohmer, 1988; Rohmer *et al.*, 1993; Broers, 1994) als auch in Pflanzen (Schwarz, 1994) nachgewiesen werden konnte. Schließlich wurde 2002 der komplette Syntheseweg von Rohdich *et al.* beschrieben. In Organismen, die Isoprene herstellen, ist meist nur einer der beiden Wege vertreten. Der MVA-Weg kommt vorzugsweise in Eukaryoten (Säugetieren, Pflanzen und Pilzen), Archaeen und einigen wenigen Bakterien vor (Flesch & Rohmer, 1988; Goldstein & Brown, 1990), während der DXP-Weg vor allem in Bakterien, Cyanobacterien, Grünalgen, Parasiten und höheren Pflanzen vorzufinden ist (Rohmer, 1999; Eisenreich *et al.*, 2004). Somit sind in Pflanzen beide Wege vorhanden, allerdings in verschiedenen Kompartimenten: Der MVA-Weg ist im Cytosol und der DXP-Weg in den Plastiden der Pflanze lokalisiert (Dewick, 2002; Boronat & Rodríguez-Concepción, 2015).

1.1.1.1 MVA-Biosyntheseweg

Der erste Schritt des MVA-Biosynthesewegs (**Abb. 1**, rot) ist eine nicht-decarboxylierende Claisenkondensation, bei der zwei Moleküle Acetyl-CoA durch eine entsprechende Thiolase reversibel zu Acetoacetyl-CoA kondensiert werden (Heath & Rock, 2002). Acetoacetyl-CoA und ein drittes Molekül Acetyl-CoA werden im nächsten Schritt durch eine β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA-Synthase (HMGS) katalysierte Aldol-Kondensationsreaktion zu HMG-CoA umgesetzt (Ajikumar *et al.*, 2008). Der Thioester des so entstandenen HMG-CoAs wird durch die HMG-CoA-Reduktase (HMGR) zu einer Alkoholgruppe reduziert, sodass in diesem irreversiblen NADPH-abhängigen Reaktionsschritt das namensgebende Mevalonat entsteht (Boronat & Rodríguez-Concepción, 2015). Dieser Schritt spielt eine sehr große Rolle in der Regulierung des MVA-Wegs (Leivar *et al.*, 2011), denn es ist bekannt, dass die HMGR, die in Tieren die Cholesterol- und in Pflanzen die Sterolbiosynthese kontrolliert, über verschiedene Wege reguliert werden kann. Beispielsweise kann posttranslational durch eine Kinase-Kaskade das Enzym durch Phosphorylierung inaktiviert werden, außerdem bestehen Regulationsmöglichkeiten über allosterische Modulationen, proteolytische Degradation der Reduktase und die Translationsrate der korrespondierenden mRNA (Jingami *et al.*, 1987; Goldstein & Brown, 1990; Sato *et al.*, 1993; Croteau *et al.*, 2000). Anschließend wird Mevalonat ATP-abhängig an der neu entstandenen OH-Gruppe durch eine Mevalonatkinase (MK) phosphoryliert, sodass zunächst 5-Phosphomevalonat entstehen kann, welches im Anschluss durch eine weitere Kinase zu 5-Pyrophosphomevalonat umgewandelt wird. Durch eine weitere ATP-abhängige Reaktion, welche durch die Pyrophosphomevalonat-Decarboxylase katalysiert wird, wird durch Decarboxylierung und Dehydrierung das Isoprenderivat Isopentenylpyrophosphat (IPP) gebildet (Okada *et al.*, 2008;

Miziorko, 2011). Da beide Vorläufermoleküle, IPP und Dimethylallylpyprophosphat (DMAPP), für die weitere Terpenbiosynthese benötigt werden, ist die Isopentenylpyrophosphatisomerase (Idi), die ein bestimmtes Gleichgewicht zwischen IPP und DMAPP herstellt, essentiell (Withers & Keasling, 2007).

1.1.1.2 DXP-Biosyntheseweg

Der erste Reaktionsschritt des DXP-Biosynthesewegs (**Abb. 1**, orange) besteht im Gegensatz zum MVA-Weg in der Kondensation von Pyruvat und Gylcerinaldehyd-3-Phosphat durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (DxS), sodass 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DXP) entsteht. DxS benötigt bei dieser Reaktion Thiaminpyrophosphat als Cofaktor und ein 2-fach geladenes Kation, wie Mn^{2+} oder Mg^{2+} (Kuzuyama *et al.*, 2000). Im nächsten Schritt wird mit Hilfe der DXP-Reduktoisomerase (DXP-RI) DXP NADPH-abhängig zu 2-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat (MEP) konvertiert (Proteau, 2004; Mac Sweeney *et al.*, 2005). Danach überträgt eine MEP-Cytidylyltransferase (MEP-CTP-T) einen Cytidinphosphat-Rest von Cytidintriphosphat (CTP) auf MEP. Das so entstandene MEP-CMP wird anschließend ATP-abhängig durch die MEP-CMP-Kinase an der Hydroxyl-Gruppe der Position 2 phosphoryliert, sodass MEPP-CMP entsteht (Rohdich *et al.*, 1999; Lüttgen *et al.*, 2000; Miallau *et al.*, 2003). Im nächsten Schritt folgt die Zyklisierung von MEPP-CMP unter Abspaltung von CMP, die durch die 2-Methyl-D-Erythritol-2,4-cylo-Pyrophosphat-Synthase (MEcPP-S) katalysiert wird (Kemp *et al.*, 2002; Steinbacher *et al.*, 2002). Anschließend wird 1-Hydroxy-2-Methyl-2-Butenylpyrophosphat (HMBPP) durch die HMBPP-Synthase gebildet, woraufhin die Vorläufermoleküle IPP und DMAPP durch die HMBPP-Reduktase (HMBPP-R) in einem Verhältnis von 5 zu 1 gebildet werden (Rohdich *et al.*, 2002). Dieses Ungleichgewicht wird durch die Isopentenylpyrophosphatisomerase (Idi), die auch bei der Beschreibung des Mevalonat-Wegs bereits erwähnt wurde, angeglichen (Wouters *et al.*, 2003). Dadurch, dass die HMBPP-R beide Vorläufermoleküle produziert, wurde in früheren Untersuchungen in *E. coli idi* als nicht essentielles Gen angesehen (Hahn *et al.*, 1999). Heute ist allerdings bekannt, dass das Genprodukt Idi neben DxS einen der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte im DXP-Weg für die Terpenoidproduktion katalysiert (Kajiwara *et al.*, 1997; Harker & Bramley, 1999; Miller *et al.*, 1999, 2000; Kuzuyama *et al.*, 2000; Lois *et al.*, 2000; Matthews & Wurtzel, 2000).

Im Vergleich zum MVA-Weg scheint der DXP-Weg der effizientere Weg zu sein, um die Vorläufermoleküle IPP und DMAPP zu produzieren, da unter Verwendung von einem Molekül Glukose als Substrat der DXP-Weg eine höhere Ausbeute an IPP aufweist als der MVA-Weg. Allerdings benötigt dieser Weg auch mehr Energie (DXP: 1 Glucose + 3 ATP+2 [H] → 1 IPP+1 CO_2 + 3 ADP; MVA: 1,5 Glucose → 1 IPP + 4 CO_2 + 8 [H]) (Steinbüchel, 2003).

1.1.1.3 Synthese von Prenylpyrophosphat-Terpenvorstufen

Die Isoprenderivate IPP und DMAPP, die über zwei verschiedene Biosynthesewege (DXP, MVA) erzeugt werden können, bilden die Ausgangsmoleküle für die Vorstufen-Synthese (**Abb. 1**, grün) bei der Terpenoidproduktion. Dabei spielen Prenyltransferasen eine entscheidende Rolle, da sie die Synthese von linearen Prenylpyrophosphaten katalysieren. Von zentraler Bedeutung sind hierbei Geranylpyrophosphat (GPP; C_{10}), Farnesylpyrophosphat (FPP; C_{15}) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP; C_{20}). Darüberhinaus gibt es weitere wie Farnesylgeranylpyrophosphat (FGPP, C_{25}) und auch solche mit weitaus längeren Kohlenstoffketten, bis hin zu natürlichem Kautschuk, der eine Kettenlänge von bis zu einigen Millionen Kohlenstoffatomen aufweist (Ogura & Koyama, 1998). Für die Länge des entstehenden Prenylpyrophosphats ist die Substratspezifität der Prenyltransferase entscheidend, die im Zusammenhang mit der Größe der *catalytic cavity* steht (Ohnuma *et al.*, 1996).

Konkret wird bei der Elongation der Prenylpyrophosphate durch eine sogenannte Kopf-zu-Schwanz-Kondensation ein IPP mit einem Prenylpyrophosphat verknüpft, indem die Allyl-Doppelbindung des Prenylpyrophosphats durch die Abspaltung eines Pyrophosphat-Ions ionisiert wird und ein resonanzstabilisiertes Carbokation entsteht, welches schlussendlich mit IPP reagieren kann (Ohnuma *et al.*, 1998; Croteau *et al.*, 2000; Wang & Ohnuma, 2000). Produkt der Kondensation ist wieder ein Prenylpyrophosphat, welches durch eine weitere Bildung eines Carbokations von IPP angegriffen werden kann, sodass die Kettenlänge immer weiter anwächst. Als Prenylpyrophosphat können dabei Initial DMAPP und im weiteren Verlauf, abhängig von der jeweiligen Prenyltransferase, GPP, FPP, GGPP etc. dienen (Tarshis *et al.*, 1994). Bei der generellen Vorstufensynthese wird als erstes durch die GPP-Synthase ein DMAPP mit IPP verbunden, sodass GPP, das C_{10}-Prenylpyrophosphat, entsteht, welches die direkte Vorstufe für Monoterpene darstellt. Als nächstes wird GPP mit IPP durch die FPP-Synthase verknüpft, sodass das C_{15}-Prenylpyrophosphat FPP gebildet wird, welches durch entsprechende Synthasen zu Sesqui- (C_{15}) und Triterpenen (C_{30}) umgesetzt wird. Als Ausgangsmolekül für die Synthese von Di- (C_{20}) und Tetraterpenen (C_{40}) dient das C_{20}-Prenylpyrophosphat GPP, welches durch die GGPP-Synthase mittels Kondensation von FPP und IPP gebildet wird.

1.1.1.4 Terpenoidproduktion

Die Synthese der eigentlichen Terpenoide (**Abb. 1**, blau) wird durch spezifische Terpensynthasen, die Prenylpyrophosphate in Terpenoide der verschiedenen Terpenklassen umwandeln, katalysiert. Die Terpensynthasen werden allgemein nach den jeweiligen Terpenklassen, die sie produzieren, benannt (zum Beispiel: Mono-, Di-, Sesquiterpensynthasen). Da die meisten Terpenoide zyklisiert vorliegen und häufig mehrere Ringsysteme beinhalten, werden Terpensynthasen häufig auch als Zyklasen bezeichnet (Croteau *et al.*, 2000).

Generell beginnt die Zyklisierung zunächst mit der Bindung des Prenylpyrophosphats an das Synthase-Enyzm, was ein sehr entscheidender Schritt ist, da die Konformation des gebundenen Prenylpyrophosphats teilweise definiert, wie das Endprodukt arrangiert ist, wie in Versuchen mit der Aristolochen-Synthase gezeigt werden konnte (Caruthers *et al.*, 2000). Während der Zyklisierungsreaktion kommt es zu einer Ionisierung des Pyrophosphatesters und zu einem Angriff des so entstandenen Carbokations auf eine interne Doppelbindung des Prenylpyrophosphats (Croteau *et al.*, 2000; Withers & Keasling, 2007). Die Funktionsweise der Terpensynthase liegt vor allem in der Stabilisierung der Carbokationen, indem sie Wasser von dem Prenylpyrophosphat fernhalten (Lesburg *et al.*, 1997; Starks *et al.*, 1997). Die Reaktionen, die bei dem ionisierten Substrat ablaufen, sind bei jeder Synthase einzigartig und verantwortlich für die schlussendliche Form des Produkts (Withers & Keasling, 2007). Synthasen, die während der Reaktion eine hohe sterische Kontrolle über das Carbokation besitzen, produzieren nur ein Hauptprodukt, wohingegen Enzyme mit einer geringeren sterischen Kontrolle über das Intermediat mehrere Nebenprodukte bilden, wie zum Beispiel bei der δ-Selinin-Synthase und der γ-Humulen-Synthase, die die Bildung von nahezu einem Dutzend verschiedener Sesquiterpen-Produkte katalysieren (Steele *et al.*, 1998). Die geringe Produktspezifität vieler Synthasen stellt u.a. einen zusätzlichen Grund dar, warum Terpenoide eine so große Diversität auf struktureller Ebene aufweisen.

Der zuvor beschriebene Reaktionsablauf ist vor allem bei Mono- und Sesqui-, aber auch bei Klasse I Diterpensynthasen zu finden, wie zum Beispiel bei der Casbene-Synthase (Croteau *et al.*, 2000). Klasse II Diterpensynthase katalysierte Reaktionen folgen einem anderen Mechanismus, bei dem die initiale Bildung eines Carbokations durch eine Protonierung der Doppelbindung am Ende des Prenylpyrophosphats erfolgt (Davis & Croteau, 2000; Hamano *et al.*, 2002), wie zum Beispiel bei der Abietadien-Synthase (Croteau *et al.*, 2000). Diesen Diterpensynthasen fehlt auf Ebene der Aminosäuresequenz häufig eine Aspartat-reiche Region, die typisch für die anderen Arten von Synthasen sind (Davis & Croteau, 2000). Das im ersten Schritt entstandene bizyklische Intermediat wird im nächsten Schritt entweder mit dem gleichen Enzym (Abietadien-Synthase) oder mit einem zweiten Enzym zyklisiert, wobei diese zweite Zyklisierungsreaktion wieder, wie zuvor beschrieben, über eine Ionisierung des Pyrophosphatesters verläuft (Vogel *et al.*, 1996; Hamano *et al.*, 2002).

Bevor Tri- (C_{30}) oder Tetraterpene (C_{40}) zyklisiert werden können, müssen zunächst die Prenylpyrophosphate mit den entsprechenden Kohlenstoffkettenlängen gebildet werden. Dafür werden bei beiden Terpenklassen zwei Vorstufenmoleküle FPP (C_{15}) bzw. GGPP (C_{20}) durch die Prenyltransferasen SQS (Squalensynthase) bzw. PSY (Phytoensynthase) im Gegensatz zur Vorstufensynthese durch eine Kopf-zu-Kopf-Kondensation verknüpft. Beide Reaktionen sind zweistufig und laufen in einem Enzym ab (Dogbo *et al.*, 1988). Im ersten Schritt läuft die Reaktion

nach einem ähnlichen Prinzip wie die Klasse II Diterpensynthasereaktion ab, nämlich über eine Protonierung, sodass in beiden Fällen ein Cyclopropyl-funktionalisiertes Intermediat entsteht. Im zweiten Schritt sind die Reaktionen jeweils für sich einzigartig. Die SQS organisiert das entstandene Presqualenpyrophosphat um und reduziert es mit Hilfe von NADPH, sodass Squalen gebildet werden kann (Rilling *et al.*, 1966; Rilling, 1971; Popják & Agnew, 1979). Das so entstandene C_{30}-Prenylpyrophosphat Squalen wird anschließend durch die Squalenepoxidase (SQE) zu Squalenepoxid oxidiert. Von diesem Molekül aus werden anschließend verschiedenste Zyklisierungsreaktionen durch sogenannte OSC's (Oxidosqualenzyklasen) durchgeführt (Christianson, 2006; Thimmappa *et al.*, 2014). Im Gegensatz zur SQS-Reaktion wird bei Prephytoenpyrophosphat das Pyrophosphat in einer nicht reduzierenden Reaktion abgespalten, sodass Phytoen entstehen kann (Bartley *et al.*, 1992; Summers *et al.*, 1993). Bevor Tetraterpenoide (Carotinoide) zyklisiert werden, kommt es zuvor zu einer Reihe an Desaturierungsschritten (Croteau *et al.*, 2000). Im Fall von β-Carotin, werden zunächst vier Doppelbindungen durch eine Desaturase eingefügt, bevor das gebildetet Lycopen durch die Lycopen-β-Zyklase an den Kettenenden sechsgliedrige Ringe formt (Misawa *et al.*, 1990).

Durch die verschiedensten Zyklisierungsreaktionen und durch spätere Modifikationen durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen, wie zum Beispiel durch weitere Zyklisierungen oder durch Dekorationen mit verschiedenen funktionellen Gruppen, entstehen unterschiedlichst strukturierte Terpenoide (Weitzel & Simonsen, 2013; Pateraki *et al.*, 2015). Bisher sind schon über 55.000 verschiedene Strukturen bekannt (Ye *et al.*, 2016). Ihre hohe strukturelle Diversität führt zu verschiedensten funktionellen Rollen (Harrewijin *et al.*, 2001; Gershenzon & Dudareva, 2007).

1.1.2 Natürliche Funktionen von Terpenoiden

Terpenoide übernehmen in der Natur eine Vielzahl von natürlichen Funktionen (Harrewijin *et al.*, 2001; Gershenzon & Dudareva, 2007). Sie spielen u.a. eine Rolle beim Schutz vor Phototoxizität in der Photosynthese (Carotinoide), beim Schutz vor Fraßfeinden oder Parasiten, in der Intra- und Interspezies-Kommunikation (Pflanzen - Bestäuber, Insekten - Insekten), bei der Regulation der Membranfluidität (bakterielle Hopanoide, eukaryotische Sterole), beim Elektronentransfer in der Atmungskette bzw. bei der Photosynthese (Ubiquinon, Plastoquinon) und auch als Wachstumshormone (Gibberillin) (Langenheim, 1994; Rohmer, 1999; Lange *et al.*, 2000).

Als Beispiel für den Schutz vor Fraßfeinden sind u.a. Driman-Sesquiterpene zu nennen, die sowohl in Pflanzen, Pilzen und einigen marinen Organismen vorkommen (Jansen & de Groot, 2004). Drimane weisen eine Aktivität gegen Bakterien (Rastogi *et al.*, 1998) und Pilze (Lunde & Kubo, 2000) auf und sind für Insekten (Justicia *et al.*, 2005), Nematoden (Lorimer *et al.*, 1996), Weichtiere und Fische (Ito *et al.*, 1997) sogar giftig. Außerdem zeigen sie eine abschreckende Wirkung auf pflanzenfressende

Insekten und schwammfressende Fische (Paul *et al.*, 1997). Das Diterpen Ingenol (Justicia *et al.*, 2005) und seine Derivate, die in *Euphorbia esula* produziert werden, können ebenfalls toxische Auswirkungen auf Pflanzenfresser haben (Halaweish *et al.*, 2002). Auch einige Monoterpene wirken toxisch auf Bakterien (Friedman *et al.*, 2002), Pilze (Hammer *et al.*, 2003) und Insekten (Lee *et al.*, 2003), einige zeigen aber auch eine abschreckende Wirkung auf Weichtiere (Frank *et al.*, 2002), Insekten (Szczepanik *et al.*, 2005) und Säugetiere (Vourc'h *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu Pflanzen können Insekten zur Abwehr von Angreifern die Substanzen gezielt verteilen. Als Beispiel können hier das Monoterpen Iridoid von Blattkäfern (Laurent *et al.*, 2003) und das klebrige Sekret von Termiten (Quintana *et al.*, 2003), das aus einer Mischung aus verschiedenen Mono-, Di- und Sesquiterpenen besteht, aufgeführt werden. Auch manche Algen können gezielt bei Gewebeverletzungen durch einen ungewöhnlich dynamischen Prozess das hoch reaktive Sesquiterpen Caulerpenyn und einige Diterpene, die zuvor in Form von Polyacetaten vorliegen, bilden (Paul & Van Alstyne, 1992; Jung & Pohnert, 2001). Aber auch in höheren Pflanzen werden Terpenoide bei Fraßschäden freigesetzt, um sich vor weiterer Beschädigung zu schützen (Miller *et al.*, 2005; Mumm & Hilker, 2006).

Die meisten Terpene, die von Organismen freigesetzt werden oder in ihnen als essentielle Öle vorliegen, sind Terpengemische. Auf molekularer Ebene ist dies durch die unterschiedlich starke Spezifität der Terpensynthasen zu erklären (**1.1.1.4**), sowie durch das Vorkommen verschiedener Terpensynthasen in einem Organismus. Es hat durchaus Vorteile, dass Gemische im Kampf gegen Schädlinge zum Einsatz kommen. Zum einen kann es dadurch zu synergistischen Effekten (Fewell & Roddick, 1993) kommen, zum anderen können durch die verschiedenen Zusammensetzungen Organismen, die sich schon an bestimmte Stoffe angepasst haben und gegen diese immun sind, durch eine Vielzahl an Terpenoiden dennoch bekämpft werden (Feeny, 1992).

Terpene können aber nicht nur zur Abwehr von anderen Spezies dienen, sondern auch zur Kommunikation innerhalb einer und zwischen verschiedenen Spezies. Dabei handelt es sich vor allem um Mono- und Sesquiterpene, da diese schon bei Raumtemperatur aufgrund ihres geringen Molekulargewichts einen hohen Dampfdruck besitzen und sich somit über größere Distanzen ausbreiten können (Gershenzon & Dudareva, 2007). Bei Insekten spielen Pheromone eine große Rolle, die neben der Anlockung von Sexualpartnern, auch als Wegweiser und zur Alamierung von Artgenossen zum Einsatz kommen (Hick *et al.*, 1999). Als Beispiel für ein Alarmsignal kann das Sesquiterpen (*E*)-β-Farnesen genannt werden. Dieses wird von Blattläusen bei einem Angriff von Fraßfeinden ausgestoßen und bewirkt, dass die Artgenossen aufhören zu fressen, sich verteilen und die Wirtspflanze verlassen (Kunert *et al.*, 2005). Pflanzen verwenden flüchtige Terpene, wie Geraniol, (*E*)-Nerolidol und Farnesol (Shields & Hildebrand, 2001), die von Blüten und Früchten freigesetzt werden, zur Anlockung von Bestäubern sowie Tieren, die ihre Samen verbreiten sollen (Knudsen *et*

al., 2006). Sie setzten diese aber auch zur unterirdischen Anlockung von Nematoden ein, die für die Pflanze schädliche Insektenlarven fressen, wenn sie von Insekten befallen werden. Beispielsweise wird in Maispflanzen das Sesquiterpen (*E*)-β-Caryophyllen bei Insektenbefall der Wurzeln freigesetzt (Rasmann *et al.*, 2005).

Dies sind nur einige wenige Beispiele für die natürlichen Funktionen von Terpenoiden. Darüber hinaus ist es von Bedeutung, dass viele natürlich vorkommende Terpenoide auch für den Menschen nützlich sein können, sei es als Therapeutikum, Duft- oder Geschmacksstoff.

1.1.3 Industrielle Anwendung von Terpenoiden

Tatsächlich kommen wir jeden Tag mit Terpenen in Kontakt: Beim Zähneputzen zum Beispiel wird der frische Minzgeschmack durch das Monoterpen Menthol hervorgerufen. Auch in Parfüms und Cremes sind häufig Terpene als Duftstoffe enthalten. Seit vielen Jahrhunderten ist die heilende Wirkung von verschiedenen Pflanzen(-extrakten) bekannt. Tee aus Fenchel kann beispielsweise eine krampflösende Wirkung haben. Japanisches Heilpflanzenöl kann zum Beispiel bei Atemwegsentzündungen, wie sie bei Erkältungen auftreten, inhaliert werden, oder aber bei Migräne zum Einsatz kommen. Dies sind zwei Beispiele für Terpene, die durch ihre verschiedenen Wirkungsweisen zu einer Linderung der Symptome führen können.

Aufgrund ihrer bioaktiven Eigenschaften können einige Terpene gegen Mikroorganismen, Pilze, Parasiten, Viren, Allergien, Verkrampfungen, Entzündungen und zur Behandlung von Krebs eingesetzt werden (Singh *et al.*, 1996; Singh & Tripathi, 1999; Frank *et al.*, 2002; Friedman *et al.*, 2002; Hammer *et al.*, 2003; Burt, 2004; Paduch *et al.*, 2007; Nedorostova *et al.*, 2009) (**Abb. 2, A**). Als Beispiel für ein antiparasitär wirkendes Terpen ist Artemisinin zu nennen, ein Sesquiterpenlacton, welches ursprünglich aus *Artemisia annua* stammt. Im Jahr 2015 wurde der Nobelpreis für Medizin an Youyou Tu für die Entdeckung von Artimisinin als Antimalariawirkstoff verliehen. Mittlerweile ist es das am weitesten verbreitete Antimalaria-Therapeutikum auf der Welt. Es wirkt gegen den Malaria-auslösenden Parasiten *Plasmodium falciparum*, indem es die Ca^{2+}-ATPase des sarco-endoplasmatischen Retikulums von asexuellen Entwicklungsstufen inhibiert, was zum Zelltod führt (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003; Krishna *et al.*, 2006). Zur Behandlung von Krebs sind vor allem das Sesquiterpen Zerumbon und das Diterpen Paclitaxel (Taxol®) zu nennen. Letzeres ist eines der verkaufsstärksten Antikrebsmedikamente (Russin *et al.*, 1995; Croteau *et al.*, 2006). Es stammt aus *Taxus brevifolia* und zerstört Tumorzellen, indem es an die Tubuline bindet, was die Beweglichkeit der Mikrotubuli stört. Dies hat zur Folge, dass die Mitose gestoppt wird und die Krebszellen sich nicht weiter teilen können (Rowinsky *et al.*, 1993; Jordan & Wilson, 2004). Zerumbon hat neben seinen entzündungshemmenden (Ozaki *et al.*, 1991) und gegen das HI-Virus wirkenden (Dai *et al.*, 1997)

Eigenschaften ebenfalls Einfluss auf die Proliferation von vielen Krebszelllinien gezeigt (Murakami *et al.*, 2002), was sein Potential in der Behandlung von vielen Krebsarten unterstreicht.

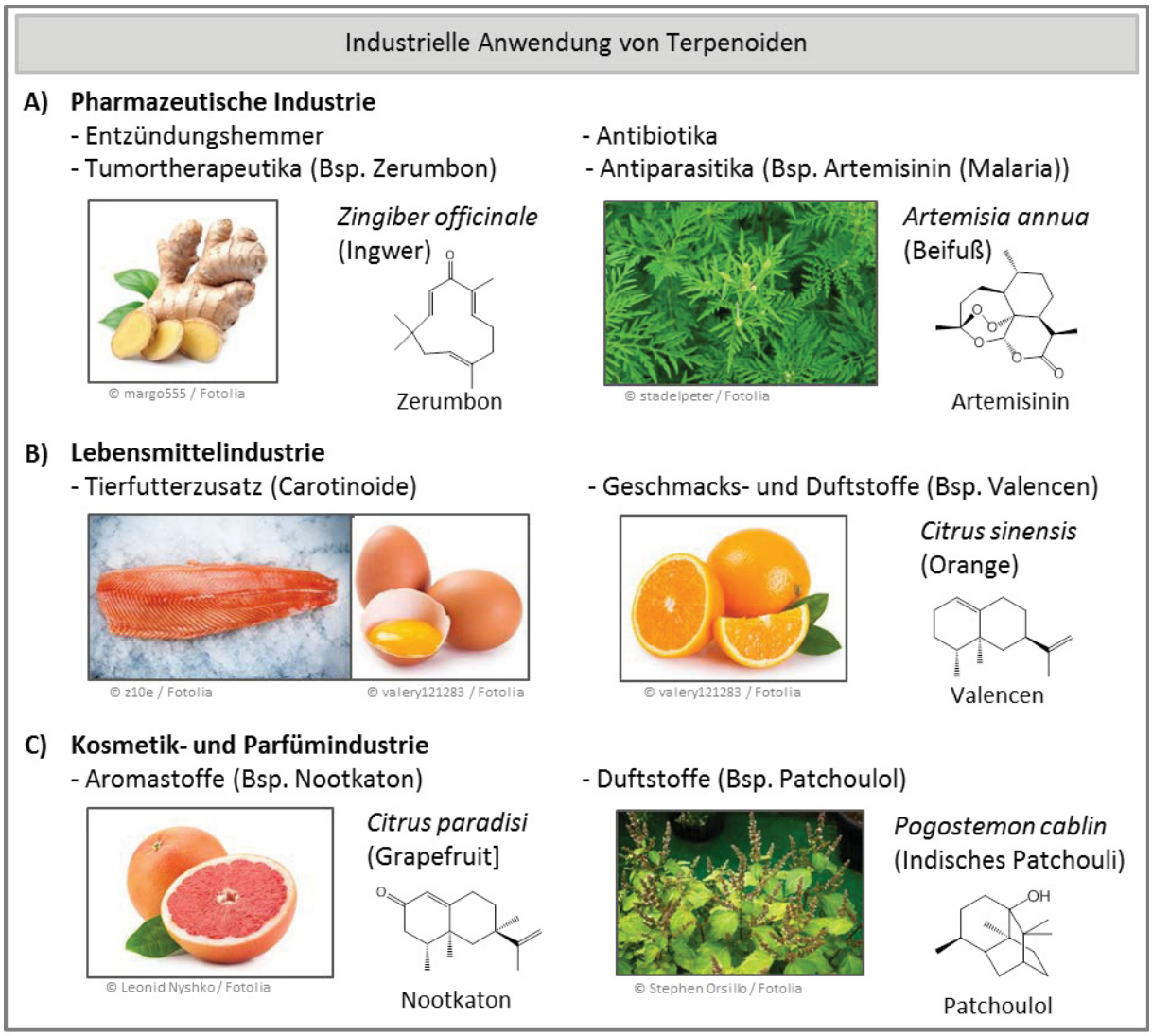

Abb. 2. Überblick über die Anwendungsgebiete von Terpenen in der Industrie.
Terpenoide finden in verschiedenen Industriezweigen Anwendung. Sie können in der pharmazeutischen Industrie **(A)** als Therapeutika eingesetzt werden. Einige Terpene zeigen eine entzündungshemmende, antibiotische oder antiparasitäre Wirkung, wie zum Beispiel Artemisin aus *A. annua*, welches erfolgreich gegen Malaria eingesetzt wird. Einige Terpenoide, wie zum Beispiel Zerumbon aus *Zingiber officinale*, können bei der Bekämpfung von Krebserkrankungen eingesetzt werden. In der Lebensmittelindustrie **(B)** werden häufig Carotinoide als Tierfutterzusatz eingesetzt, um zum Beispiel Lachsfleisch und dem Dotter von Hühnereiern eine intensivere Farbe zu verleihen. Terpene, wie beispielsweise Valencen, welches aus Citrusfrüchten gewonnen wird, werden Lebensmitteln als Geschmackstoff zugesetzt. Da viele Terpenoide olfaktorisch wahrgenommen werden können und angenehm riechen, werden sie, wie zum Beispiel Patchoulol und Nootkaton, in Kosmetika und Parfüms **(C)** verwendet.

Aus der Lebensmittelindustrie und Agrarwirtschaft sind Terpene ebenfalls nicht wegzudenken (**Abb. 2**, **B**). Aufgrund ihrer guten Hautgängigkeit und der abschreckenden Wirkung einiger Terpene (vgl. **1.1.2**), werden sie als Insektizide oder auch als Insekten-vertreibende Substanzen bei der Lagerung von agrarwirtschaftlichen Produkten eingesetzt (Isman *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2003; Theis & Lerdau,

2003; Pandey *et al.*, 2014a; Pandey *et al.*, 2014b). Sie werden aber auch als Tierfutterzusatz in der Tierhaltung eingesetzt. Die zugesetzten Carotinoide sollen zum Beispiel bei der Zucht von Lachsen und Forellen dazu führen, dass das Fleisch eine intensivere Farbe annimmt (Simpson *et al.*, 1981) und bei Hühnereiern kann durch die entsprechende Fütterung der Hühner die Farbe des Dotters intensiviert werden und je nach Zugabe von gelb bis orange variieren (Marusich & Bauernfeind, 1981). In der Lebensmittelindustrie werden Terpene vor allem als Aromastoffe eingesetzt. Als Beispiel ist hier Valencen anzubringen, was den typischen Citrusgeschmack in Limonaden bewirkt. Valencen hat ein Marktvolumen von über 15.000 kg im Jahr, wobei 5.000 kg für die Herstellung von Nootkaton verwendet wird, das für den typischen Grapefruitgeschmack verantwortlich ist (Beekwilder *et al.*, 2014). Nootkaton findet auch aufgrund seiner Duftnote und seiner biologischen Aktivität, die eine Kontaminierung mit Mikroorgansimen einschränkt, Anwendung in der Kosmetikindustrie (**Abb. 2, C**) (Furusawa *et al.*, 2005; Breitmaier, 2006; Fraatz *et al.*, 2009). Aus diesen Gründen werden auch viele andere Terpene, wie zum Beispiel Limonen, Bisabolen, Linalool und Menthol in der Kosmetikindustrie eingesetzt (Breitmaier, 2006; Liu *et al.*, 2012; Davies *et al.*, 2014). Auch Carotinoide wie β-Carotin werden dort aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften genutzt (Edge *et al.*, 1997; Del Campo *et al.*, 2007).

Wegen ihres angenehmen Geruches werden viele ätherische Öle, die hauptsächlich aus Terpenen bestehen, in der Parfümherstellung verwendet. Hier ist zusätzlich zu den bereits erwähnten Beispielen vor allem das Patchouliöl hervorzuheben, welches neben Parfüms auch Seifen und anderen Kosmetikprodukten zugesetzt wird (Bauer *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002; Frister & Beutel, 2015). Die Nachfrage ist so groß, dass auf der ganzen Welt ca. 1000 – 1500 Tonnen Patchouliöl produziert werden. Patchouliöl ist neben Sandelholzöl und Vetiveröl eines der wertvollsten ätherischen Öle, das in der Parfümindustrie eingesetzt wird: Der Weltmarktpreis liegt bei etwa 40 – 90 €/kg. Allerdings unterliegt der Preis starken Schwankungen und hat schon Werte von 150 €/kg erreicht, was darauf zurückzuführen ist, dass Patchouliöl hauptsächlich aus der Patchoulipflanze (*Pogostemon cablin*) gewonnen wird, die ursprünglich in Indien und Südostasien beheimatet ist, aber auch in subtropischen Gebieten Taiwans, Chinas, und Ostafrikas angebaut wird (Frister & Beutel, 2015). Daher wird der Preis u.a. vom Wetter und somit vom Anbauerfolg und durch kostspielige Exporte beeinflusst. Patchouliöl beinhaltet verschiedene Sesquiterpene, der typische holzig-erdige Geruch wird aber vor allem von (-)-Patchoulol, welches einen Anteil von etwa 60 % des Öls ausmacht, hervorgerufen (Frister & Beutel, 2015). Da die Nachfrage so groß ist und die Herstellung von Patchouliöl nicht nur unökologisch sondern auch unökonomisch ist, wird schon seit geraumer Zeit versucht, Patchoulol synthetisch herzustellen. Obwohl dies schon vollsynthetisch gelungen ist (Näf *et al.*, 1981), ist die synthetische Produktion erst ab 2014 wirtschaftlich geworden. Zu diesem Zeitpunkt wurde erstmalig ein biotechnologisch hergestelltes Patchouliöl erzeugt, das unter dem Namen

Clearwood® von der Firma Amyris produziert und von der Firma Firmentes vertrieben wird (Leffingwell & Leffingwell, 2015). Es ersetzt bereits mehr und mehr das pflanzlich erzeugte Patchouliöl (Frister & Beutel, 2015).

An diesem Beispiel ist zu sehen, dass die biotechnologische Synthese von Terpenen eine vielversprechende Alternative zur klassischen Extraktion aus entsprechendem pflanzlichem Material sein kann. Somit kann die Verwendung von organischen Lösungsmitteln eingeschränkt werden. Zudem können auf Agrarflächen, die für die kommerzielle Bepflanzung verwendet wurden, wieder Nutzpflanzen kultiviert werden. Im Vergleich kann bei alternativen biotechnologischen Prozessen gegenüber der herkömmlichen Gewinnung aus Pflanzenmaterial eine bedeutsame Einsparung von Energie- und Wasserressourcen erreicht werden (Frister & Beutel, 2015).

1.2 Heterologe Terpenoidproduktion

Terpenoide finden eine breite Anwendung in der Industrie (**1.1.3**). Früher wurden Terpenoide ausschließlich aus ihren natürlichen Produzenten gewonnen. In Pflanzen werden diese aber nur in geringen Mengen produziert und durch die Extraktion aus den Pflanzenmaterialien werden nur sehr kleine Ausbeuten erreicht, wie zum Beispiel bei der Extraktion von Taxol (Kingston, 1994; Goodman & Walsh, 2001). Außerdem werden dabei meist schlechte Reinheitsgrade erhalten und es kommt zu einem hohen Verbrauch von Pflanzenmaterial (Frister & Beutel, 2015). Die chemische Synthese ist eine Alternative, aber grundsätzlich schwierig und teuer in der Umsetzung (Kingston *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2003) u.a. wegen der hohen strukturellen Komplexität vieler Terpenoide (Martin *et al.*, 2003; Frister & Beutel, 2015). Außerdem geht diese Strategie häufig mit der Verwendung von Reagenzien, Katalysatoren und Lösungsmitteln, die für die Umwelt schädlich sind, einher (Fraatz *et al.*, 2009). Zudem dürfen, laut der Europäischen Lebensmittelregularien, chemisch synthetisierte Stoffe nicht als „natürliche Stoffe“ deklariert werden, was sich als ein immer größer werdender Nachteil für die Akzeptanz der Produkte auf dem Markt herausstellt (Fraatz *et al.*, 2009). Ökologischer und ökonomischer ist in Bezug auf die kommerzielle Produktion von Terpenoiden die biotechnologische Herstellung in Mikroorganismen, deren Weiterentwicklung und Optimierung gerade in den letzten Jahren massiv vorangetrieben wurde. Das *engineering* der Metabolitwege in den Wirtsorganismen ist dabei eine vielversprechende Herangehensweise (Kakinuma *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2006; Pitera *et al.*, 2007; Harada & Misawa, 2009).

So werden bereits einige für die Industrie relevante Terpenoide mikrobiologisch hergestellt. Dabei ist vor allem die Produktion von Artemisininsäure, die Vorstufe des Antimalariawirkstoffes Artemisinin zu nennen. Hier wurde unter großem Aufwand ein Verfahren zur kommerziellen Synthese mit gezielt modifizierten Mikroorganismen entwickelt (Paddon *et al.*, 2013). Aber auch Patchoulol, ein für die

Parfümindustrie sehr relevantes Sesquiterpen (Frister & Beutel, 2015), wird seit 2014 durch die Firma Firmenich unter dem Namen Clearwood™ vertrieben, was als Ersatzstoff für das aus der Patchoulipflanze extrahierte Patchoulilöl von der Firma Amyris produziert wird. Die Firma Allylix (seit 2014 Evolva) (Leffingwell & Leffingwell, 2015) produziert den Grapefruit-Aromastoff Nootkaton, der als Geschmacks- und Duftstoff in der Lebensmittelindustrie verwendet wird (Fraatz *et al.*, 2009). Auch das Diterpen Taxol, welches eine große Bedeutung in der Bekämpfung von Krebs hat, wird heute biotechnologisch hergestellt (Holton *et al.*, 1994). Aufgrund der großen Nachfrage interessieren sich viele Forschungsgruppen für die Verbesserung der biotechnologischen Herstellung von Terpenoiden. Dafür entwickeln sie Organismen, deren Biosynthesewege auf die Produktion von industriell relevanten Mengen an Terpenoiden optimiert sind (Kirby & Keasling, 2008; Chandran *et al.*, 2011; Mitchell, 2011). Amorpha-4,11-dien, ein Intermediat in der Produktion von Artemisinin, konnte in *Escherichia coli* durch Stammoptimierung (*metabolic engineering*) und die Optimierung der Fermentationsbedingungen bereits in industriell relevanten Mengen (>25 g/l) hergestellt werden (Tsuruta *et al.*, 2009).

Einige *engineering*-Methoden sind bereits als allgemein vielversprechende Strategie zur Erhöhung der Ausbeuten an produziertem Terpen gut etabliert. Dazu gehört das Einbringen des MVA-Wegs in einen Organismus, der diesen natürlicherweise nicht trägt. Zum Beispiel wurde in *E. coli*, welches von Natur aus nur den DXP-Weg für die Produktion der Terpenoidvorstufen IPP und DMAPP besitzt, das MVA-Gencluster aus *Saccharomyces cerevisiae* integriert, was zu einer stärkeren Akkumulation der Isoprenoidvorstufen führte (Martin *et al.*, 2003). *Rhodobacter sphaeroides* besitzt ebenfalls nur den DXP-Weg. Durch die plasmidbasierte Expression der Valencensynthase (CnVS) aus *Callitropsis nootkatensis* zusammen mit dem MVA-Operon von *Paracoccus zeaxanthinifaciens* konnten 352 mg/l Valencene produziert werden, was eine signifikante Steigerung (14-fach) gegenüber dem alleinigen Einsatz der Synthase darstellte (Beekwilder *et al.*, 2014). Aber auch die zusätzliche Expression von Genen, die Enzyme zur Umsetzung intrinsisch vorhandener Biosyntheseschritte kodieren, ist ein etablierter Ansatz. Durch die Expression von Idi und der GGPPS, die GGPP bildet, die die direkte Vorstufe von Taxadien darstellt, konnte zum Beispiel in *E. coli* die heterologe Produktion von Taxadien, das erste Intermediat im Biosyntheseweg von Paclitaxel (Taxol), gesteigert werden (Huang *et al.*, 2001). Die Überexpression der als geschwindigkeitsbestimmenden Gene *dxs* und *idi* führte in *E. coli* ebenfalls zu einer signifikanten Verbesserung der intrazellulären Akkumulation der Vorläufermoleküle IPP und DMAPP und somit zu einer Steigerung der heterologen Terpenoidproduktion (Huang *et al.*, 2001; Martin, Yoshikuni & Keasling, 2001).

Auch die Anpassung des Metabolitflusses spielt eine große Rolle, da sowohl für den DXP- als auch für den MVA-Biosyntheseweg bekannt ist, dass einzelne katalytische Schritte durch bestimmte

Metabolite reguliert werden. Für den MVA-Weg in *S. cerevisiae* ist zum Beispiel bekannt, dass die HMGR (**1.1.1.1**) und HMGS, die zum Beispiel durch Ergosterol inhibiert wird, kritische Schritte darstellen (Shimada *et al.*, 1998; Leivar *et al.*, 2011). Beim DXP-Weg in *E. coli* ist vor allem DxS dafür bekannt, durch seine Endprodukte IPP und DMAPP inhibiert zu werden (Cordoba *et al.*, 2009; Banerjee *et al.*, 2013). Das bedeutet, dass optimalerweise die Enzymlevel so angepasst werden müssen, dass kein Intermediat akkumulieren kann, das durch *feedback*-Inhibierung die Produktion des finalen Produkts beeinträchtigt oder gar verhindert (Chen *et al.*, 2015). Zudem kann ein schlecht angepasster Metabolitfluss aber auch toxische Effekte haben. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von HMG-CoA in *E. coli* eine Inhibierung des Wachstums hervorruft (Pitera *et al.*, 2007).

Ein gutes Beispiel für eine Optimierung des Biosynthesewegs zur Verbesserung der Terpenoidproduktion konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden. Durch die Coexpression einer verkürzten Variante der HMGR (*tHmg1*), die dadurch nicht mehr durch FPP inhibiert werden kann, einer Transkriptionsfaktor-Mutante (*upc2-1*) und der FPPS (*Erg20*) konnte die FPP-Produktion gesteigert werden, welche die direkte Vorstufe auf dem Weg zur Erzeugung von Artemisininsäure darstellt. Durch die zusätzliche Herabregulierung der Expression des Squalensynthasegens *ERG9* konnte verhindert werden, dass das erzeugte FPP ausschließlich durch die wirtseigene Ergosterolbiosynthese verbraucht wird. Diese Strategie führte zu einer Steigerung des Metabolitflusses in Richtung FPP, sodass 153 mg/l Artemisininsäure, eine Zwischenstufe im Biosyntheseweg von Artemisinin, produziert werden konnten (Ro *et al.*, 2006; Asadollahi *et al.*, 2008, 2010; Paradise *et al.*, 2008; Paddon *et al.*, 2013). Andere Möglichkeiten für die Anpassung des Metabolitflusses in *S. cerevisiae* sind der Austausch der Promotoren der geschwindigkeitsbestimmenden Gene bei der zusätzlichen Expression des vollständigen MVA-Operons, aber auch die Expression einer weiteren Kopie des *tHmg1*-Gens unter Kontrolle eines starken Promotors (Keasling *et al.*, 2010; Westfall *et al.*, 2012). Im Falle von DxS konnte deren Inhibierung durch die Vorläufermoleküle IPP und DMAPP durch die Coexpression einer DxS in einem auf die Lycopenproduktion optimierten *E. coli* Stamm verhindert werden, was zu einer Steigerung der Lycopenausbeute führte (Harker & Bramley, 1999). Eine besonders elegante Lösung ist die Technik des „*multivariate modular pathway engineering*“: Bei der Produktion des Diterpens Taxadien in *E. coli* konnten durch die Expression der Gene von vier Enzymen des DXP-Wegs (*dxs*, *ispD*, *ispF*, *idi*), die gemeinsam auf einem Plasmid angeordnet waren und die Expression der GGPPS und der Taxadiensynthase, die auf einem anderen Plasmid lokalisiert waren, durch die Variation der Plasmidkopienzahl und der Promotorstärke Mengen von 1 g/l Taxadien hergestellt werden, was eine 15.000-fache Steigerung zum Kontrollstamm bedeutete (Ajikumar *et al.*, 2010).

Neben den verschiedenen Strategien des *metabolic engineering* ist es vor allem entscheidend, einen geeigneten Produktionsorganismus zu wählen. Die am häufigsten verwendeten Mikroorganismen für die heterologe Terpenproduktion sind *E. coli* und *S. cerevisiae* (Chen *et al.*, 2015). Sie konnten im Gegensatz zu *Corynebacterium glutamicum* (Heider *et al.*, 2012) und *Bacillus subtilis* (Zhou *et al.*, 2013), die ebenfalls schon für die Terpenoidproduktion optimiert wurden, sehr hohe Ausbeuten erzeugen (s.o). Anhand der Wahl verschiedenster Wirte lässt sich schließen, dass noch kein geeignetes Wirtssystemen gefunden wurde, welches für die Herstellung der vielfältigen Terpenoidprodukte gleich gut geeignet ist. Da die Cytoplasmamembran typischerweise als Speicherort für hydrophobe Verbindungen, wie Terpenoide, bei deren Produktion dient, kann deren Beschaffenheit und Größe ein entscheidender Faktor für die Eignung eines Organismus als Produktionswirt darstellen (Das *et al.*, 2007). Das Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus* ist dafür bekannt, unter bestimmten physiologischen Bedingungen (anaerob phototroph) ein zusätzliches Membransystem auszubilden, was zu einer Vergrößerung der Cytoplasmamembran führt. Außerdem akkumuliert unter denselben Bedingungen eine große Menge an Carotinoiden, sodass der Organismus als ein „natürlicher Überproduzent“ für Tetraterpene angesehen werden kann und so eine gute Alternative für die heterologe Produktion von Terpenoiden darstellt.

1.2.1 *Rhodobacter capsulatus* und seine natürliche Tetraterpenproduktion

Das Gram-negative, stäbchenförmige Nichtschwefelpurpurbakterium *R. capsulatus* gehört zur *Rhodospirillaceae*-Familie und ist der Gruppe der α-Proteobakterien zugehörig. Es ist vor allem in den oberen Schichten von süßwasserhaltigen Teichen und Seen zu finden, die von Sonnenlicht durchdrungen werden (Weaver *et al.*, 1975). Charakteristisch ist nicht nur seine Pigmentierung, sondern auch, dass es von einer Schleimkapsel, die aus Polysacchariden besteht, umgeben ist (Bräutigam *et al.*, 1988). Im Jahr 1907 wurde *R. capsulatus* erstmals von Molisch beschrieben (Molisch, 1907) und seit 2010 ist das Genom des Stammes SB1003 vollständig sequenziert (Strnad *et al.*, 2010). *R. capsulatus* ist ein sehr anpassungsfähiges und physiologisch vielseitiges Bakterium (Imhoff *et al.*, 1984). Unter Stickstoffmangelbedingungen ist der Organismus dazu fähig, molekularen Stickstoff aus der Umgebungsluft als alternative Stickstoffquelle zu nutzen. Diese Form der Stickstofffixierung wird auch als diazotrophes Wachstum bezeichnet (Masepohl *et al.*, 2002; Drepper *et al.*, 2003; Masepohl & Hallenbeck, 2010). Außerdem ist er in der Lage Wasserstoff zu produzieren (Vignais *et al.*, 2000). Als Kohlenstoffquellen kann *R. capsulatus* sowohl organische als auch anorganische Stoffe (heterotroph), wie Kohlenstoffdioxid (Tabita, 1995), nutzen (Stoppani *et al.*, 1955). Eine besondere Eigenschaft des Bakteriums ist seine Fähigkeit, unter aeroben wie auch anaeroben Bedingungen zu respirieren (Zannoni, 1995; McCrindle *et al.*, 2005). Unter strikt anaeroben Bedingungen ist es außerdem dazu fähig, anoxygene Photosynthese zu betreiben (Gregor

& Klug, 2002), wenn Licht als Energiequelle (phototroph) zur Verfügung steht (Gregor & Klug, 1999; Bauer *et al.*, 2003).

Sobald die Sauerstoffkonzentration unter einen gewissen Schwellenwert fällt, wird die Expression von drei membrangebundenen Proteinkomplexen, dem photochemischen Reaktionszentrum (RC) und den zwei Lichtsammelkomplexen I und II (LH-I, LH-II) (Drews, 1985) induziert. Darüber hinaus wird die Ausbildung eines zusätzlichen Membransystems induziert, das als intrazytoplasmatisches Membransystem (ICM) bezeichnet wird (Oelze & Drews, 1972; Drews & Golecki, 1995; Tucker *et al.*, 2010; Drews, 2013). Dies geschieht weitestgehend unabhängig von der vorherrschenden Lichtintensität, kann aber durch deren Zunahme weiter gesteigert werden (Clark *et al.*, 1984; Klug *et al.*, 1985; Gregor & Klug, 1999, 2002; Gubellini *et al.*, 2007; Niederman, 2013; Woronowicz *et al.*, 2013). Die Membranoberfläche kann sich dabei um das 3- bis 9-fache vergrößern (Drews & Golecki, 1995), welches einen großen Vorteil bei der heterologen Produktion von Terpenoide darstellt, da die Membran als Speicherort für hydrophobe Stoffe, wie es u.a. Terpenoide sind, dienen kann (Das *et al.*, 2007). Die RC-Untereinheiten L, M und H bilden einen Komplex in der ICM, in dem die photochemische Reaktion abläuft. Dieser Komplex ist von etwa 12-18 LH-I umringt und peripher von den häufiger vorkommenden LH-II umgeben, die die Lichtenergie sammeln und diese zu den LH-I und weiter zum RC transferieren (Drews, 1985). Neben den Photosynthese-Proteinkomplexen, werden außerdem noch die Photopigmente Bacteriochlorophyll a und die Tetraterpenoide Spheroiden bzw. Spheroidenon gebildet, die nicht-kovalent an Polypeptide des RC und der LH-I und –II gebunden sind (Kiley & Kaplan, 1988). Dort absorbieren sie Licht verschiedener Wellenlängen (sichtbar bis Infrarot) (Drews & Oelze, 1981) und ermöglichen so den Energietransfer und die Photosynthese. Ihre Funktion geht zudem darüber hinaus, denn sie dienen u.a. dem Schutz der Zelle und der Photosynthesekomplexe vor reaktiven Sauerstoffspezies, die nur unter hohen Licht- und Sauerstoffintensitäten entstehen können (Griffiths *et al.*, 1955; Sistrom, Griffiths & Stanier, 1956; Drews & Oelze, 1981; Britton, 1995; D'Haene *et al.*, 2014).

Die Gene, die für die Enzyme zur Synthese der Photopigmente und für die Photosynthesekomplexe kodieren, sind in einem 46 kb großen Photosynthesegencluster organisiert. Dabei sind die für die pigmentbindenden Proteine des RC-Komplexes und LH-I verantwortlichen Gene im polycistronischen *puf*-Operon und andere Photosynthesegene im *puh*-Operon lokalisiert. Die Gene, die für den LH-II kodieren, sind im *puc*-Operon an einer anderen Stelle im Chromosom lokalisiert (Gregor & Klug, 2002). Die Regulierung der *puf*-, *puh*- und *puc*-Operons erfolgt über das Zweikomponentensystem RegB/RegA, welches durch eine Phosphorylierungskaskade deren Genexpression unter Sauerstoff limitierenden Bedingungen in hohem Maße induziert (Sganga & Bauer, 1992; Mosley *et al.*, 1994; Inoue *et al.*, 1995). RegB ist eine Membran-gebundene Histidin-Kinase, die einen Phosphatidylrest

auf den Antwortregulator RegA in einem Redox-abhängigen Prozess überträgt (Mosley *et al.*, 1994; Inoue *et al.*, 1995). RegA enthält ein *helix-turn-helix* Motiv an seinem C-Terminus, durch das es an die Promotorregionen der *puf*- und *puc*-Operons (Kirndörfer *et al.*, 1998; Hemschemeier *et al.*, 1999, 2000b) unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus binden kann. Nur durch die Phosphorylierung ist RegA durch eine Konformationsänderung dazu in der Lage die RNA-Polymerase zu rekrutieren, die die Transkription der Photosynthesegene aktiviert (Hemschemeier *et al.*, 2000a). Die Regulierung ist zudem auch von anderen Transkriptionsfaktoren abhängig, denn bei hohen Sauerstoffkonzentrationen wird zum Beispiel die Expression des *puc*-Operons durch die Proteine CrtJ und PPBP reprimiert (Bauer, 1995; Ponnampalam *et al.*, 1995; Elsen *et al.*, 1998; Gregor & Klug, 2002). RegA ist nur in der Lage, an die DNA seiner Zielorte zu binden, wenn CrtJ und PPBP bei geringen Sauerstoffleveln nicht mehr an die DNA binden, da sich die Binderegionen von CrtJ und PPBP mit denen von RegA teilweise überschneiden (Gregor & Klug, 2002).

In Mutanten, in denen RegB oder RegA ausgeschaltet wurden, konnte eine signifikant niedrigere Expression der *puf*- und *puc*-Operons beobachtet werden, aber es konnten keine messbaren Effekte in der Expression der Bakeriochlorophyll- (*bch*) oder der Carotinoid-Biosynthesegene (*crt*) festgestellt werden (Sganga & Bauer, 1992; Mosley *et al.*, 1994), auch wenn Hinweise auf einen Einfluss von RegA/B auf die Expression einzelner *crt*-Gene beschrieben wurden (Willett *et al.*, 2007). Außerdem kommt ein geringes Level der *puc*-Transkription durch die Promotoren der *upstream* gelegenen *bch*- und *crt*-Genen zustande (Wellington *et al.*, 1991). Dadurch wird vermutet, dass die Expression der *crt*- und *bch*-Gene auch über andere Faktoren/Systeme reguliert sein müssten.

Natürliche Carotinoidsynthese und deren Regulation in *R. capsulatus*

Das Purpurbakterium *R. capsulatus* trägt seinen Namen aufgrund seiner auffälligen rot-orangebraunen Pigmentierung, die durch die Akkumulation von Bakteriochlorophyll a und den Carotinoiden Spheroiden und Spheroidenon hervorgerufen wird. Diese Photopigmente werden durch die Photosynthesekomplexe gebunden, die in der ICM lokalisiert sind (s.o.). Die Carotionoidbiosynthese (**Abb. 3, A**) startet mit den Vorläufermolekülen IPP und DMAPP, die in *R. capsulatus* über den DXP-Weg (**1.1.1.2**) erzeugt werden und die zentralen Ausgangsmetabolite für die Synthese von Carotinoiden bilden (Hahn *et al.*, 1996). Die Synthese der Tetraterpenvorstufe GGPP erfolgt nach der ebenfalls oben beschriebenen Reaktionskaskade, die in carotinogenen Organismen hoch konserviert ist (Bartley *et al.*, 1990). Dies geschieht mit Hilfe von IspA, welche sowohl die Funktion einer GPPS als auch einer FPPS übernimmt, und der GGPPS, die in *R. capsulatus* als CrtE bezeichnet wird. Die Phytoensynthase CrtB kondensiert im nächsten Schritt zwei GGPP, sodass Phytoen entsteht. Die Phytoendesaturase CrtI setzt dieses im Anschluss in drei Desaturierungsschritten über die Intermediate Phytofluen und ζ-Carotin zu Neurosporin um. Im

weiteren wird durch die im Folgenden beschriebenen Reaktrionsschritte Spheroiden gebildet (Hunter *et al.*, 2009), welches das primäre Carotinoid unter strikt anaeroben Bedingungen darstellt (Goodwin, 1980). Dabei kommt es zuerst zu einer Hydrierung durch die Hydroxyneurosporinsynthase (CrtC) zu Hydroxyneurosporin, danach erfolgt eine Desaturierung am C-3,4 durch die Methoxyneurosporindehydrogenase (CrtD), sodass Demethylspheroiden entsteht. Zum Schluss wird durch die Hydroxyneurosporin-O-Methyltransferase (CrtF) eine Methylierung an der C-1 Hydroxygruppe durchgeführt.

Wenn molekularer Sauerstoff zur Verfügung steht, führt die Spheroidenmonooxygenase (CrtA) eine Ketogruppe am C-2 von Spheroiden ein, sodass Spheroidenon entsteht (Hunter *et al.*, 2009), welches unter (mikro-)aeroben Wachstumsbedingungen in *R. capsulatus* das dominierende Carotinoid darstellt (Goodwin, 1980).

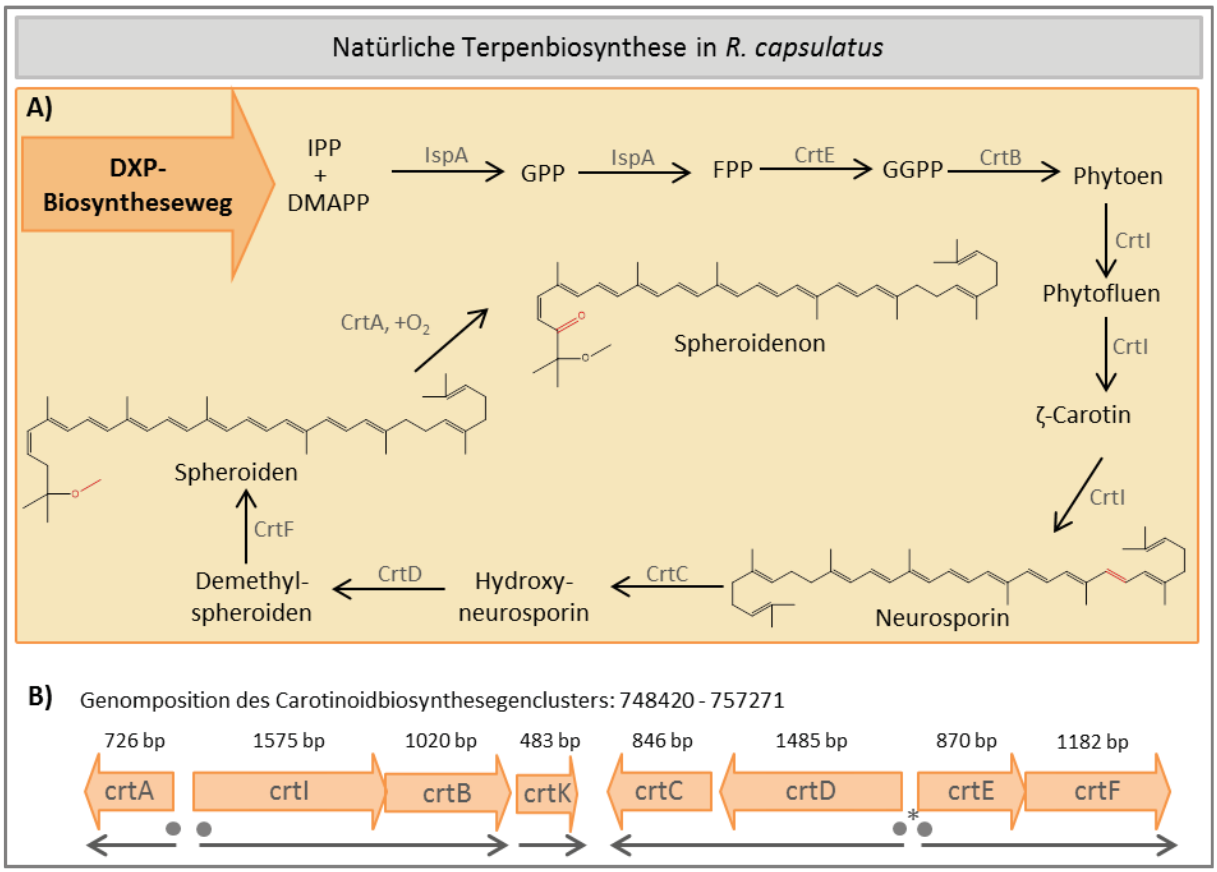

Abb. 3. Natürliche Terpenbiosynthese in *R. capsulatus*
A) Bei der Carotinoidbiosynthese in *R. capsulatus* erfolgt die Synthese der Carotinoide Spheroiden ($-O_2$) und Spheroidenon ($+O_2$) aus den Vorläufermolekülen IPP und DMAPP über den DXP-Weg mit Hilfe der Enzyme IspA und CrtA-E über die Zwischenstufen GPP, FPP, GGPP, Phytoen, Phytofluen, ζ-Carotin, Neurosporin, Hydroxyneurosporin und Demethylspheroiden. **B)** Die *crt*-Gene bilden ein Biosynthesegencluster (bp 748420 – 757271; Strnad *et al.*, 2010) und sind in fünf verschiedenen Operons (graue Pfeile) organisiert. Zwischen den Operons *crtA* und *crtIB* liegen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel CrtJ (graue Punkte).

Das Wissen um die Regulation der *crt*-Gene in *R. capsulatus* ist entscheidend, um ideale Voraussetzungen für hohe Ausbeuten bei der heterologen Terpenoidproduktion durch *R. capsulatus* zu schaffen.

Die *crt*-Gene, die für die Enzyme der Carotinoidbiosynthese kodieren, sind wie auch das *puf*-Operon in dem 46 kb großen Photosynthesegencluster des Chromosoms lokalisiert (Armstrong *et al.*, 1989; Gregor & Klug, 2002). Die *crt*-Gene bilden fünf eigene Operons, die direkt nebeneinander angeordnet, aber unterschiedlich zueinander ausgerichtet sind (**Abb. 3, B**): *crtA*, *crtIB, crtK*, *crtDC*, *crtEF* (Armstrong *et al.*, 1989). Die Expression der Operons *crtA* und *crtIB* wird unter anaeroben Bedingungen von RegA induziert (Willett *et al.*, 2007) und unter aeroben Bedingungen durch den Repressor CrtJ reprimiert (Elsen *et al.*, 1998). Laut Elsen *et al.* (2005) befinden sich auf Grundlage von Sequenzanalysen zwischen den Operons *crtDC* und *crtEF* putative Bindestellen für CrtJ. Die molekularen Mechanismen der Regulation der anderen *crt*-Gene sind in *R. capsulatus* bisher nicht eingehend charakterisiert. Allerdings konnten Armstrong *et al.* (1993) eine Erhöhung der mRNA Level der Gene *crtA*, *crtC*, *crtD*, *crtE*, *crtF* und *crtK* durch eine Verringerung der Sauerstoffkonzentration im Medium feststellen, während die mRNA Level von *crtI* und *crtB* keine Erhöhung zeigten. Anscheinend ist die Aktivität von CrtI und CrtB unter diesen Bedingungen nicht auf mRNA-Ebene reguliert.

Zusammenfassend ist Sauerstoffmangel das dominierende Umweltsignal für die Induktion der Carotinoidbiosynthese. Durch die kontinuierliche Reduktion der Sauerstoffkonzentration in einer im Dunkeln wachsenden Kultur kann die Carotinoidakkumulation gesteigert werden (Schumacher & Drews, 1978; Biel & Marrs, 1985). Darüber hinaus kann die Photopigmentbiosynthese durch Licht moduliert werden, wobei Schwachlicht zu einer Steigerung der Carotinoidakkumulation führt (Golecki *et al.*, 1980; Kaufmann *et al.*, 1982).

In *R. capsulatus* konnten bereits erfolgreich unter aeroben Bedingungen die Triterpene Squalen und Botryococcen (Khan *et al.*, 2015) produziert werden. Allerdings ist bekannt, dass im Vergleich zu aeroben Wuchsbedingungen im Dunkeln die Carotinoidakkumulation unter anaeroben Wuchsbedingungen im Licht größer ist (Golecki *et al.*, 1980; Kaufmann *et al.*, 1982). Demnach könnte davon ausgegangen werden, dass unter anaeroben Bedingungen die Vorstufen, die für die heterologe Produktion von verschiedenen Terpenklassen (GPP -> Monoterpene, FPP -> Sesqui- und Triterpene, GGPP -> Di- und Tetraterpene) benötigt werden, in höherem Maß zur Verfügung stehen. Das hätte zur Folge, dass mit anaeroben Bedingungen höhere Mengen an Terpenoid erzielt werden könnten, vorausgesetzt die heterologen Enzyme, die die Reaktionen zum gewünschten Terpenoid katalysieren, benötigen keinen Sauerstoff, wie es zum Beispiel bei der Umsetzung von Spheroiden zu Spheroidenon der Fall ist. Hierbei könnte es allerdings hilfreich sein in *R. capsulatus* das Gen, welches

für den Repressor CrtJ kodiert, zu deletieren, da dies unter aeroben Wuchsbedingungen zu einer Steigerung der Carotinoidakkumulation führt (Ponnampalam *et al.*, 1995).

1.2.2 Expressionsvektoren für *Rhodobacter capsulatus*

Um wirtsfremde Proteine in Mikroorganismen produzieren zu können, werden häufig Vektoren, die das entsprechende Zielgen beinhalten, verwendet. Für *R. capsulatus* konnte bereits ein Set an Expressionsvektoren erfolgreich etabliert werden. Dazu gehören die Vektoren pRhokHi-2 und pRhotHi-2 (**Abb. 4**), die 2010 von Katzke *et al.* durch die Kombination der Vektoren pBBR22b (Rosenau & Jaeger, 2004), der auf den *broad host range* Vektoren pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994) und pET22b (Novagen) basiert, und pBSL15 (Alexeyev, 1995) erzeugt wurden. Durch den gewählten Replikationsursprung (REP) sind beide Vektoren für die Anwendung in verschiedensten Gram-negativen Organismen, wie *E. coli*, *Pseudomonas putida* und *R. capsulatus*, geeignet. Durch die Mobilitätskassette (MOB) ist der konjugative Transfer von Donorstämmen, wie *E. coli*, zu Akzeptorstämmen, wie *R. capsulatus* oder *P. putida*, möglich. Die Vektoren besitzen zwei Gene, die Antibiotikaresistenzen gegen Chloramphenicol (Cm) und Kanamycin (aphII) vermitteln, um eine Selektion von Zellen mit Plasmid zu ermöglichen. Zusätzlich befindet sich auf den Vektoren die Sequenz für einen Hexahistidin-tag (His-tag), um durch eine C-terminale translationale Fusion mit dem His-tag gegebenenfalls die Zielproteine, die in die multiple-cloning-site (mcs) kloniert wurden, isolieren und/oder immunologisch nachweisen zu können (**2.9.4**).

Die beiden Vektoren unterscheiden sich nur in der Orientierung der Kanamycinresistenzkassette (*aphII*). In pRhokHi-2 ist sie so orientiert, dass sich die Zielgenexpression unter Kontrolle des konstitutiven Promotors des *aphII*-Gens befindet. In pRho**t**Hi-2 ist sie genau andersherum orientiert, sodass nur durch die T7-RNA-Polymerase eine Expression der Zielgene, die unter Kontrolle des T7-Promotors (P_{T7}) liegen, erreicht werden kann. Um den pRho**t**Hi-2-Vektor in *R. capsulatus* zu verwenden, wird ein spezieller Stamm benötigt. Dafür wurde der *R. capsulatus* Stamm B10S-T7 erzeugt (Katzke *et al.*, 2010), in dessen Genom an die Stelle des *recA*-Gens eine Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens, das unter der Kontrolle des wirtseigenen Fruktose-induzierbaren Promotors P_{Fru} (Duport *et al.*, 1994) steht, integriert wurde. Die Expression des T7-RNA-Polymerase-Gens wird durch Zugabe von Fruktose ins Medium induziert (Katzke *et al.*, 2010). Zudem wurde im Jahr 2016 von Frau Katzke (unveröffentlicht) ein weiterer *R. capsulatus* Stamm basierend auf dem Wildtyp SB1003 nach demselben Prinzip erzeugt, sodass der Stamm SB1003-T7 in dieser Arbeit verwendet werden konnte.

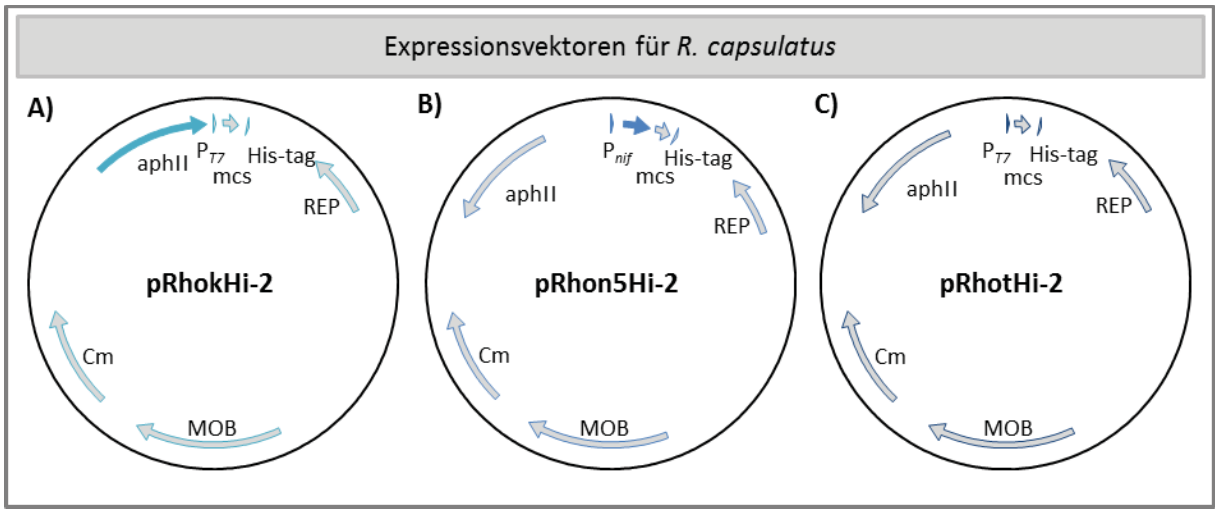

Abb. 4. Expressionsvektoren für *R. capsulatus*.
Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pRhokHi-2 (**A**), pRhon5Hi-2 (**B**) und pRhotHi-2 (**C**). Die Vektoren beinhalten zwei Antibiotikaresistenzgene, die für die Chloramphenicol- (Cm) und Kanamycinresistenzen (aphII) kodieren. Außerdem tragen sie eine Mobilitätskassette (MOB) für den konjugativen Transfer der Expressionsvektoren und einen *broad host range* Replikationsursprung (REP), sowie eine Sequenz, die für einen Hexahistidin-Tag (His-tag) kodiert. In die *multiple-cloning-site* (mcs) werden die Zielgene kloniert. Die Vektoren pRhokHi-2 und pRhotHi-2 unterscheiden sich lediglich durch die Orientierung des *aphII*-Gens. In pRhokHi-2 ist sie so orientiert, dass die Zielgenexpression unter Kontrolle des konstitutiven Promotors von *aphII* liegt, während in pRhotHi-2 das *aphII*-Gen andersherum orientiert ist, sodass die Zielgenexpression, die unter Kontrolle des T7-Promotors (P_{T7}) liegt, nur durch die T7-RNA-Polymerase unter Verwendung eines speziellen T7-RNA-Polymerase exprimierenden Stammes realisiert werden kann. Der pRhon5Hi-2 Vektor basiert auf pRhotHi-2 und unterscheidet sich von diesem durch seinen Promotor. Der P_{T7} wurde gegen den *nifHDK*-Promotor (P_{nif}) ausgetauscht, sodass in pRhon5Hi-2 die Zielgenexpression unter Kontrolle des P_{nif} liegt.

Ein weiterer, kürzlich entwickelter Expressionsvektor für *R. capsulatus* (pRhon5Hi-2 (Özgür, 2015)) basiert auf dem pRhotHi-2-Vektor, dessen Promotor durch den *R. capsulatus* spezifischen *nifHDK*-Promotor (P_{nif}) ausgetauscht worden ist. In *R. capsulatus* ist die Expression der *nif*-Gene spezifisch durch die Verfügbarkeit der Stickstoffquellen und abhängig vom Sauerstoffgehalt reguliert. Dieser Vektor hat sich unter anaeroben Bedingungen durch die gute Induzierbarkeit des starken Promotors bereits u.a. in der Expression von Membranproteinen besonders ausgezeichnet (Özgür, 2015).

Regulation der *nif*-Gene

Die Gene *nifHDK* sind in dem gemeinsamen Operon organisiert und kodieren für die Dinitrogenase-Reduktase (NifH) und Dinitrogenase (NifDK), die zusammen den Eisen-Molybdän-(FeMo)-Nitrogenasekomplex bilden (Weaver *et al.*, 1975; Schüddekopf *et al.*, 1993). Neben der Eisen-(Fe)-Nitrogenase (Schneider *et al.*, 1991) ist die FeMo-Nitrogenase für die Fixierung von molekularem Stickstoff entscheidend (Masepohl & Hallenbeck, 2010), wobei die Dinitrogenaseeinheit molekularen Stickstoff zu Ammoniak reduziert und die Dinitrogenase-Reduktaseeinheit dabei als physiologischer Elektronendonor dient (Masepohl & Hallenbeck, 2010). Da die Reduktion von Stickstoff ein sehr energieaufwendiger Prozess ist, der sich in einem hohen ATP-Verbrauch darstellt (Kern *et al.*, 1998),

ist die Expression der *nifHDK*-Gene neben Licht und Sauerstoff sehr strikt durch Ammonium reguliert (Masepohl *et al.*, 2002).

Die Expression der *nif*-Gene, wird durch die Transkriptionsaktivatoren NifA1 und NifA2 induziert (Masepohl *et al.*, 2002; Wu & Bauer, 2008), indem die NifA Proteine zusammen mit einer RNA-Polymerase, die mit Hilfe des alternativen Sigmafaktors RpoN, an eine spezifische Bindestelle bindet, die sich 100 - 200 bp vor dem Transkriptionsstart befindet und als UAS bezeichnet wird (Morett & Buck, 1988; Preker *et al.*, 1992). Beide NifA Proteine sind aufgrund ihrer Cystein-reichen Linkerdomäne zwischen dem zentralen Teil und dem C-terminalen Teil des Proteins sauerstoffsensitiv (Masepohl *et al.*, 1988; Fischer, 1994; Dixon, 1998; Kern *et al.*, 1998), sodass die *nif*-Genexpression Sauerstoff-abhängig ist. Die Genexpression der NifA Proteine ist Ammonium-abhängig und wird durch das Zweikomponentensystem NtrB/C reguliert (Cullen *et al.*, 1996; Masepohl *et al.*, 2002; Wu & Bauer, 2008). Unter Stickstoffmangelbedingungen, die eintreten, wenn die bevorzugte Stickstoffquelle Ammonium nicht zur Verfügung steht, wird über NtrB/C die Transkription der *nif*-Gene aktiviert. Das NtrB/C System kann die Verfügbarkeit von Ammonium über das Verhältnis von Glutamin zu 2-Ketoglutarat bestimmen (Temple *et al.*, 1998). Übergeordnet reguliert das PII-Signaltransduktionsprotein-System GlnB/K Ammonium-abhängig an verschiedenen Stellen auf Protein-Ebene. Wenn Ammonium zur Verfügung steht, inhibiert einerseits GlnB NtrB, sodass NtrC nicht phosphoryliert wird und zudem verhindert GlnB/K durch Protein-Protein-Wechselwirkungen, dass NifA an die UAS binden kann. In beiden Fällen kommt es nicht zu einer Induktion der *nif*-Genexpression (Drepper *et al.*, 2003; Masepohl & Kranz, 2009). Somit ist die *nif*-Genexpression nur in Abwesenheit von Ammonium und Sauerstoff voll induziert. Das daraus abgeleitete Expressionssystem (s.o., pRhon5Hi-2) ist somit bislang sehr vielversprechend für die heterologe Genexpression in *R. capsulatus* unter anaerob phototrophen Bedingungen. Die Stickstofflimitierung kann unter diesen Bedingungen durch die Verwendung von Serin als alternative Stickstoffquelle im Medium realisiert werden.

1.3 Zielsetzung

Terpenoide gehören zu einer sehr großen und wichtigen Stoffgruppe, die in verschiedensten Bereichen Anwendung finden. Einen in der Parfümindustrie sehr häufig verwendeten Duftstoff stellt beispielsweise das pflanzliche Patchouliöl dar, dessen typischer erdig-holziger Geruch durch das Sesquiterpenoid Patchoulol hervorgerufen wird. Terpenoide werden in ihren natürlichen Produzenten oft nur in geringen Mengen erzeugt, sodass durch Extraktion typischerweise nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden. Aufgrund der hohen strukturellen Komplexität der Terpenoide ist die chemische Synthese oftmals eine schwierige und teure Alternative. Die biotechnologische Herstellung von Terpenoiden in Mikroorganismen kann dem gegenüber ökonomische und

ökologische Vorteile haben. Phototrophe Mikroorganismen wie das Bakterium *R. capsulatus* bieten dabei spezifische physiologische Vorteile wie die intrinsische Biosynthese von Tetraterpenen (Carotinoiden) und die Bildung eines zusätzlichen Membransystems unter phototrophen, anaeroben Bedingungen, welches sich für die Speicherung von hydrophoben Stoffen, wie es Terpenoide sind, prinzipiell eignet. Die Optimierung der Stoffwechselwege (*metabolic engineering*) gilt als vielversprechende Strategie zur Produktionssteigerung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte *R. capsulatus* als alternativer Plattformorganismus für die heterologe Terpenoidproduktion evaluiert und durch *metabolic engineering* optimiert werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst die physiologischen Bedingungen für eine hohe natürliche Terpenproduktion in *R. capsulatus* evaluiert. Dazu wurden der Einfluss von verschiedenen Wuchsbedingungen (anaerob phototroph, aerob chemotroph) auf die natürliche Terpenoidproduktion sowie auf die Expressionsleistung des P_{nif}-basierten Expressionssystems pRhon5Hi-2 untersucht. Anschließend sollte am Beispiel des Sesquiterpens Patchoulol durch die Expression der Patchoulolsynthase aus *Pogostemon cablin* ein optimales Expressions-Setup gefunden werden, welches anschließend für die Optimierung des wirtsfremden Terpens durch *metabolic engineering* zur Anwendung kam. Dabei sollte die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* auf verschiedenen Ebenen beeinflusst werden:

(i) Die Bereitstellung der nötigen Biosynthesevorstufe FPP sollte sowohl durch einen erhöhten metabolischen Zufluss durch die Coexpression der FPP-Synthase IspA als auch durch Verhinderung des metabolischen Abflusses durch die Unterbrechung der natürlichen Carotinoidbiosynthese verbessert werden.

(ii) Der Pool an Isoprenbausteinen sollte durch die Unterstützung des intrinsischen DXP-Wegs mittels Coexpression der geschwindigkeitsbestimmenden Enzymen DxS und Idi erhöht werden.

(iii) Durch den Transfer des heterologen MVA-Wegs aus *Paracoccus zeaxanthinifaciens* in *R. capsulatus* sollte eine zusätzliche Verknüpfung vom Primärstoffwechsel zum Aufbau von Isoprenoiden geschaffen und so die Produktion heterologer Terpenoide weiter gesteigert werden.

Schließlich wurde die allgemeine Anwendbarkeit des neuen Systems auf die Produktion anderer Sesquiterpenoide am Beispiel von Valencen durch die Verwendung von zwei unterschiedlich effizienten Valencensynthasen aus *Callitropsis nootkatensis* und *Citrus sinensis* überprüft.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme

Tab. 1. In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

	Stamm	Eigenschaften	Referenz
E. coli	DH5α	F⁻ *end*A1 *gln*V44 *thi*-1 *rec*A1 *rel*A1 *gyr*A96 *deo*R *nup*G Φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, *hsd*R17(r_K^- m_K^+), λ–	Hanahan, 1983
	S17-1	F⁻, *rec*A, *hsd*R, RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)	Simon *et al.*, 1983
R. capsulatus	37b4	EPS-defizienter Wildtypstamm	Omar *et al.*, 1983
	SB1003	Wildtypstamm, Rif^R	Yen & Marrs, 1976
	SB1003-T7	SB1003 mit *recA*:: (P_{Fru}>*T7Pol*Gm^R), Rif^R	Katzke, unveröffentlicht
	SB1003+MVA	SB1003 mit MVA-Operon, Rif^R, Gm^R, Tet^R	Weber, 2016
	SB1003Δ*crtE*	SB1003 Δ*crtE* (Ω-Spc^R)	diese Arbeit
	SB1003Δ*crtJ*	SB1003 Δ*crtJ* (Ω-Spc^R)	diese Arbeit

2.2 Vektoren

Tab. 2. In dieser Arbeit verwendete Vektoren

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
Leervektoren		
pRhokHi-2	pBBR1mcs (Basisvektor, *rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*)	Katzke *et al.*, 2010
pRhon5Hi-2	pBBR1mcs (Basisvektor, *rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}	Özgür, 2015
pRhotHi-2	pBBR1mcs (Basisvektor, *rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{T7}	Katzke *et al.*, 2010
Expressionsvektoren		
pRhokHi-2-*PatS*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), *PatS*-His6	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*PatS*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *PatS*-His6	diese Arbeit
pRhotHi-2-*PatS*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{T7}, *PatS*-His6	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*PatS-ispA*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *PatS*-ispA	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*PatS-dxs*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *PatS-dxs*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*PatS-idi*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *PatS-idi*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*PatS-MVA*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *PatS-MVA*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*PatS-*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS,	diese Arbeit

ispA-dxs	*pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *PatS-ispA-dxs*	
pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *PatS-ispA-dxs-idi*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi-MVA*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *PatS-ispA-dxs-idi-MVA*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*CnVS*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *CnVS*-His6	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *CnVS-ispA*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*CnVS-MVA*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *CnVS-MVA*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA-dxs-idi*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *CnVS-ispA-dxs-idi*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA-dxs-idi-MVA*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *CnVS-ispA-dxs-idi-MVA*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*ValS*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *ValS*-His6	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*ValS-ispA*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *ValS-ispA*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*ValS-MVA*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *ValS-MVA*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*ValS-ispA-dxs-idi*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *ValS-ispA-dxs-idi*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-*ValS-ispA-dxs-idi-MVA*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, *ValS-ispA-dxs-idi-MVA*	diese Arbeit
pRhokHi-2-e*yfp_*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), e*yfp*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-e*yfp_*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, e*yfp*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-e*yfp-nifA AV*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK} e*yfp-nifA AV*	diese Arbeit
pRhon5Hi-2-e*yfp-nifA KP*	pBBR1mcs (*rep mob* Cm^R), pET22b (MCS, *pelB*), pBSL15 (*aphII*), P_{nifHDK}, e*yfp-nifA KP*	diese Arbeit
Mutageneseplasmide		
pSUP202-*crtE*up/dw<Spc	pBR325, Amp^R, Cm^R, Tet^R, *mob*, Spc^R flankiert von 500 bp *up*- und *downstream* von *crtE*	diese Arbeit
pSUP202-*crtJ*up/dw<Spc	pBR325, Amp^R, Cm^R, Tet^R, *mob*, Spc^R flankiert von 500 bp *up*- und *downstream* von *crtJ*	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Tab. 3. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.
Es sind alle Primer dargestellt, die in dieser Arbeit zur Erzeugung von Mutagenesevektoren, Expressionsvektoren und zur Überprüfung der selbigen verwendet wurden. Innerhalb der angegebenen Nukleotidsequenzen unterstrichene Bereiche zeigen den homologen Bereich zum Zielgen an und die farbig markierten Bereiche zeigen die Restriktionsschnittstellen (*Eco*RI, *Pst*I, *Bam*HI, *Nde*I, *Hind*III, **Stopkodon**, *Xho*I, *Spe*I, *Kpn*I, *Mlu*I) für die anschließende Klonierung an.

Funktion	Name	Nukleotidsequenz
Mutagenesevektoren		
Erzeugung einer *R.c* Δ*crtE*-Mutante	*Pst*I_*crtE*_up fw	AAACTGCAGCGGCGATTCGCCAAAGATCC
	*Bam*HI_*crtE*_up rv	AAAGGATCCCACGACGCACATTGGCATTC
	*Bam*HI_*crtE*_dw fw	AAAGGATCCACCTGAAAGACGCGCTGATG
	*Eco*RI_*crtE*_dw rv	TATGCAGCACCCGGAATTCGAC
Expressionsvektoren		
Klonierung der kodonoptimierten *CnVS*	*Nde*I_*oCnVS*_fw	AGAGGAGGCCCTTCATATGG
	*Hind*III_*oCnVS*_rv	ATAAAGCTTCGGGATGATCGGTTCCACG
Klonierung von *ispA* hinter eine Terpenesynthase	*Hind*III*ST_*ispA R.c.* fw	ATTAAGCTT**TGA**AAGAAGGAGATATAATGTTTT CCGAACGTTTG
	*Xho*I_*ispA R.c.* rv	AATACTCGAGCTTGTCGCGTTCGATCACATAG
Klonierung von *dxs* hinter eine Terpenesynthase	*Hind*III*ST_*dxs* fw	ATTAAGCTT**TGA**AAGAAGGAGATATAATGACCG ACAGACCCTGC
	*Xho*I_*dxs* rv	AATACTCGAGTCAGGCGCGGCGGGCGAG
Klonierung von *idi* hinter eine Terpenesynthase	*Hind*III*ST_*idi* fw	ATTAAGCTT**TGA**AAGAAGGAGATATAATGACGG AAATGGTTCCCGC
	*Xho*I_*idi* rv	AATACTCGAGTTACTGCACGACGCGCAGC
Klonierung von *MVA* hinter eine Terpenesynthase	*Hind*III*ST_*MVA* fw	ATTAAGCTT**TGA**AAGAAGGAGATATAATGATGC AGAACGAAGAAGC
	MVA rev *Xho*I	ATATACTCGAGTCAACGCCCCTCGAACG
Klonierung von *ispA* hinter eine Terpenesynthase	*Hind*III*ST_*ispA R.c.* fw	ATTAAGCTT**TGA**AAGAAGGAGATATAATGTTTT CCGAACGTTTG
	ispA rev *Xho*I *Mlu*I	ATATACTCGAGATATAACGCGTTCACTTGTCGCG TTCGATCAC
Klonierung von *dxs* hinter *ispA*	*dxs* for *Mlu*I	ATATAACGCGTATAAGGAGATATACACATGACC GACAGACCCTGC
	dxs rev *Xho*I *Spe*I	ATATACTCGAGATATAACTAGTTCAGGCGCGGC GGGCGAG
Klonierung von *idi* hinter *dxs*	*idi* for *Spe*I	ATATAACTAGTGCCTTTGACAAGGAATTGAATG ACGGAAATGGTTCCCGC
	idi rev *Xho*I *Kpn*I	ATATACTCGAGATATACCATGGTTACTGCACGAC GCGCAGC
Klonierung von *MVA* hinter idi	*MVA* for *Kpn*I	ATATACCATGGTCTAGAAATAATTTTGTTTAAC
	MVA rev *Xho*I	ATATACTCGAGTCAACGCCCCTCGAACG
Klonierung der e*yfp-nifA* Vektoren	*nifA*_av *Hind*III fw	ATAAAGCTTATAAGGAGATATACACATGAATGC
	*nifA*_av *Xho*I rv	CTCGAGCTAGATTTTCCGCATGT
	*nifA*_kp *Hind*III fw	ATAAAGCTTATAAGGAGATATACACATGATTCA

		TAAG
	*nifA*_kp *Xho*I rv	CTCGAGCTAGAGGCGCGG
Sequenzierungsprimer		
für pRhon5Hi-2-Vektoren	Pnif	TGACAGCACCCGTCTGATCC
Kontrolle der Mutagenesevektoren	pSUP/pUC18(Amp) fw	TGCCGGGAAGCTAGAGTAAG
	pSUP/pUC18(Cm) rv	ATCACCAGCTCACCGTCTTTC
aus *ispA* in eine Terpenesynthase lesen	*ispA* in TS<	TTTCCACGGCGTCCTGAATCTC
aus *oCnVS* rauslesen	*oCnVS*->	ACCCATAGCAACCGCAAAG
aus *PatS* rauslesen	*PatS*->	GAAGGCGACTCGTATACC
aus *idi* rauslesen	*idi* ->	TGGCTCCGGATCTATCTG
aus *ValS* rauslesen	*ValS*->	CGGGCGATCGACTTCATCTAC

2.4 Chemikalien und Geräte

Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn nicht explizit erwähnt, mit einem Reinheitsgrad entsprechend der Anwendung bei folgenden Firmen bestellt: BD, Merck, Gerbu, Invitrogen, PanReac AppliChem, Roth, Sigma-Aldrich, Thermo Scientific, TCI.

Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete besondere Laborgeräte wurden in den folgenden Methoden-Beschreibungen erwähnt. Wenn Geräte nicht ausdrücklich erwähnt wurden, entsprachen sie allgemeinen Laborstandards.

2.5 Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, für 20 min bei 200 kPa und 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Komponenten, wie beispielsweise Antibiotika (**2.6**) wurden sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm (VWR)) und dem Medium nachträglich zugesetzt (T < 60 °C).

Tab. 4. Puffer und DNA-Größenstandard für Agarose-Gelelektorphorese (2.7.2)

TBE-Puffer 5x (pH 8,3)	
Tris-HCL	89 mM
Borat	89 mM
EDTA	2,5 mM
DNA-Probenpuffer 5x	
EDTA	100 mM
Glycerol	43 % (v/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

DNA-Molekulargewichtsstandard	
Gene Ruler TM 1 kb DNA Ladder (Fermentas)	kb 10 – 8 – 6 – 5 – 4 - 3,5 – 3 - 2,5 – 2 - 1,5 - 0,75 - 0,5 - 0,25

Tab. 5. Puffer zum Zellaufschluss (2.10.3)

SP-Puffer (pH 7,2)	
K_2HPO_4	40 mM
KH_2PO_4	22 mM
NaCl	150 mM
Protease Inhibitor (Roche)(pH 8)	1 Tablette auf 250 ml

Tab. 6. Puffer und Protein-Größenstandard für SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2.9.1 + 2.9.2)

SDS-Probenpuffer	
Sammelgel-Puffer 4x (pH 6,8)	200 µl
Glycerol 10 % (v/v)	200 µl
SDS 4 % (w/v)	800 µl
β-Mercaptoethanol 2 % (v/v)	40 µl
Bromphenolblau 0,03 % (w/v)	120 µl
A. dest.	640 µl
Sammelgel Puffer 4x (pH 6,8)	
Tris-HCl	12,2 g
A. dest.	ad 200 ml
Trenngel-Puffer 4x (pH 8,8)	
Tris-HCl	36,4 g
A. dest.	ad 200 ml
SDS-Trenngel 12 % (für 2 Mini-Gele)	
Acrylamid/Bis (30:0,8)	4 ml
Tris/HCl 1,5 M (pH 8,8)	2,5 ml
A. dest.	3,35 ml
SDS 10 % (w/v)	100 µl
APS 10 % (w/v)	100 µl
TEMED	10 µl
SDS-Sammelgel (5 %) (für 2 Mini-Gele)	
Acrylamid/Bis (30:0,8)	0,83 ml
Tris/HCl 0,5 M (pH 6,8)	1,25 ml
A. dest.	2,77 ml
SDS 10 % (w/v)	50 µl
APS 10 % (w/v)	50 µl
TEMED	10 µl
SDS-Laufpuffer (pH 8,3)	
Tris-HCl	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
A dest.	ad 1000 ml
Proteinmolekulargewichtsstandard	
Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-RAD)	kDa 250 – 150 – 100 – 75 – 50 – 37 – 25 – 20 – 15 – 10 (25 – 75 kDa rot gefärbt)

Tab. 7. Puffer und Lösungen zum Immunoblotting (Western Blot) (2.9.3 + 2.9.4 + 2.9.5)

PBS-Puffer 10x	
NaCl	80 g
KH_2PO_4	2 g
Na_2HPO_4	11,1 g
KCl	2 g
A. dest.	ad 1000 ml
PBS-T-Puffer	
PBS-Puffer 10x	100 ml
Tween	0,05 % (v/v)
A. dest.	900 ml
Blocking-Puffer	
Magermilchpulver	1,5 g
A. dest	ad 50 ml
Blot-Laufpuffer 10x (pH 8,4)	
Tris-HCl	30 g
Glycin	112 g
A. dest.	ad 1000 ml
Blot-Laufpuffer 1x	
Blot-Puffer 10x	100 ml
Ethanol vergällt	100 ml
A. dest.	ad 1000 ml
ECL-Lösung	
Wasserstoffperoxid 30 %	0,3 µl
11 mg p-Cumarinsäure in 10 ml DMSO	100 µl
50 mg Luminol in 500 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,6)	1 ml
Amidoschwarz-Färbelösung	
Amidoschwarz	0,1 % (w/v)
Ethanol	45 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
A. dest.	45 % (v/v)

2.6 Antibiotika

Tab. 8. Eingesetzte Antibiotikakonzentrationen

	gelöst in	**in LB-Medium/Agar**	**in PY-Agar**	**in RCV-Medium**
Tetracyclin	Ethanol 70 %	10 µg/ml	1,5 µg/ml	0,25 µg/ml
Kanamycin	A. dest.	50 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml
Spectomycin	A. dest.	100 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml
Ampicillin	A. dest.	100 µg/ml	-	-
Gentamicin	A. dest.	10 µg/ml	4 µg/ml	4 µg/ml
Rifampicin (TCI)	DMSO 100 %	-	25 µg/ml	25 µg/ml

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten diente die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988), die mit Hilfe der Phusion High Fidelity DNA-Polymerase von ThermoFisher Scientific in dem PCR-Automaten *TProfessional basic* (Biometra) durchgeführt wurde. Die verwendeten Primer und ihre Eigenschaften sind in **Tab. 3** (**2.5**) zusammengefasst. Ein PCR-Ansatz hatte ein Gesamt-Volumen von 50 µl und enthielt:

Tab. 9. Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes

Phusion HF-Puffer 5x	10 µl
10 mM dNTP	1 µl
10 pM Primer 1+2	je 2,5 µl
DNA	1 µl
DMSO	1,5 µl
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase	0,5 µl
Nuklease freies Wasser (Qiagen)	ad 50 µl

Die PCR-Reaktionen erfolgten nach folgendem Schema:

Tab. 10. Programm für die Polymerasekettenreaktion

	Temperatur	**Zeit**	**Zyklus**
Denaturierung	98 °C	1 min	1
Denaturierung	98 °C	10 s	30
Hybridisierung	+3 °C der niedrigeren Anlagerungstemperatur des Primerpaares	20 s	
Elongation	72 °C	15 s (Plasmid-DNA) 30 s (genomische DNA)	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1

Nach erfolgter Reaktion wurde die amplifizierte DNA durch Auftragung von 1 µl des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel (**2.7.2**) dahingehend untersucht, ob die Größe des Fragmentes mit den Erwartungen übereinstimmt. Wenn dies der Fall war, wurde der PCR-Ansatz mittels des *innuPREP DOUBLEpure Kits* (Analytik Jena) gereinigt und in 30 µl Nuklease-freiem Wasser (Qiagen) eluiert.

2.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989) diente zur Größenbestimmung hydrolysierter DNA-Moleküle (**2.7.4**), zur Konzentrationsabschätzung von DNA-Lösungen, zur Überprüfung von PCR-Ansätzen (**2.7.1**), sowie zur Isolierung von DNA-Fragmenten (**2.7.3**). Es wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet, die hergestellt wurden, in dem 1 g Agarose in 100 ml 0,5x TBE-Lösung (**Tab. 4**)

aufgekocht und diese Lösung in eine Gelkammer gegossen wurde. Um die DNA unter UV-Licht visualisierbar zu machen, wurde den Gelen 0,1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) pro ml Gel-Lösung zugesetzt. Danach wurde ein Gel-Kamm, dessen Anzahl und Größe der Zähne abhängig vom Volumen der aufzutragenden DNA-Probe war, eingesetzt. Nach etwa einer viertel Stunde war das Agarosegel erkaltet und fest, sodass der Gel-Kamm entfernt und das Agarosegel in eine Gelelektrophorese-Kammer (BioRad) gelegt werden konnte. Anschließend wurde 0,5x TBE-Puffer (**2.5, Tab. 4**) in die Kammer gegossen, bis das Gel damit überschichtet war. Die DNA-Proben, die zuvor mit dem 5x DNA-Probenpuffer (**2.5, Tab. 4**) versetzt wurden, konnten daraufhin in die Geltaschen überführt werden. Mit Hilfe des *PowerPac Basic* von BioRad (135 V für 30 min) wurden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt.

Zum Schluss wurde das Gel mit dem *Gel iXImager*-System der Firma Intas photografiert. Die DNA wurde dabei durch Bestrahlung mit UV-Licht (λ = 254 - 366 nm) sichtbar gemacht, indem das dem Gel zugefügte Ethidiumbromid in die doppelsträngige DNA interkalierte und bei einer Bestrahlung mit UV-Licht sichtbares Licht (λ = 590 nm) emittierte, so dass die Lage der DNA-Banden sichtbar wurde.

2.7.3 Elution von DNA aus Agarosegelen

(nach Vogelstein & Gillespie, 1979)

Für die Elution von DNA aus Agarosegelen (**2.7.2**) wurde das *innuPREP DOUBLEpure* Kit der Firma Analytik Jena genutzt. Dafür wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern weiterverarbeitet. Die Elution erfolgte mit 20 µl Nuklease-freiem Wasser (Qiagen).

2.7.4 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

(nach Smith & Birnstiel, 1976)

Die gezielte hydrolytische Spaltung der Phosphodiester-Bindungen von Nukleinsäuren (Restriktion) wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (Fermentas), die an eine spezifische Nukleotidsequenz binden und innerhalb dieser Erkennungssequenz die DNA spalten, durchgeführt. Zur Erzeugung rekombinanter Plasmide (Klonierung) wurde diese Methode verwendet. Dafür wurden 16 µl DNA, je 1 µl des benötigten Enzyms und 2 µl eines entsprechenden Puffers eingesetzt. Zur Überprüfung von Plasmiden (Testrestriktion) wurden nur 5 µl DNA und zusätzlich noch 11 µl Nuklease-freies Wasser eingesetzt, um ein Gesamtvolumen von 20 µl für den Restriktionsansatz zu erhalten. Die Hydrolyse erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, bei 37 °C für mindestens 2 h. Danach wurden die Ansätze mit 5 µl DNA-Probenpuffer (**2.5**; **Tab. 4**) versetzt und die entstandenen Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (**2.7.2**) getrennt.

2.7.5 Ligation von DNA-Fragmenten

(modifiziert nach Dugaiczyk *et al.*, 1975)

Die Ligation von DNA-Fragmenten und entsprechend hydrolysierter Plasmid-DNA wurde durch die T4-DNA-Ligase (Fermentas) katalysiert. In einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurden 6 µl Fragment-DNA, 2 µl Vektor-DNA, 2 µl des 10x T4-Ligase-Puffers (Fermentas), 9 µl Nuklease-freies Wasser (Qiagen) mit 1 µl T4-DNA-Ligase vermischt und für 2 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die Ligase Hitze-inaktiviert (10 min, 65 °C) und 10 µl des Reaktionsansatzes entweder direkt in *E. coli* DH5α-Zellen transformiert (**2.7.6.2**) oder der gesamte Reaktionsansatz bei -20 °C gelagert.

2.7.6 Transformation von Bakterien-Zellen mit Plasmid-DNA

2.7.6.1 Herstellung chemisch transformationskompetenter *E. coli* Zellen

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Als erstes wurden 50 ml LB-Medium mit einer Vorkultur (**2.8.1.1**) von *E. coli* Zellen auf eine $OD_{580\,nm}$ von 0,05 inokuliert. Anschließend wurde die Kultur bei 37 °C unter Schütteln (130 UpM) inkubiert, bis eine Zelldichte von 0,5 - 0,6 erreicht wurde. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4000 UpM, 4 °C) pelletiert und nachdem der Überstand verworfen und das Pellet in 2,5 ml 100 mM $MgCl_2$ (vorgekühlt) resuspendiert wurde, wurden die Zellen für 20 – 30 min in einem Eisbad gekühlt. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 4000 UpM, 4 °C), nach dem der Überstand wieder verworfen wurde. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen in 5 ml 100 mM $CaCl_2$ + 15 % Glycerol (vorgekühlt) resuspendiert und zum Schluss in Aliquots von 150 µl in EPGs pipettiert. Die chemisch kompetenten Zellen wurden entweder direkt für eine Transformation (**2.7.6.2**) verwendet oder für den späteren Gebrauch bei – 80 °C gelagert.

2.7.6.2 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Für jede Transformation wurde ein Aliquot (150 µl) transformationskompetenter *E. coli*-Zellen (**2.7.6.1**) mit 1 µl Plasmid-DNA versetzt. Die Zellen wurden anschließend für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock (42 °C, 90 s) unterzogen. Sofort nach dem Hitzeschock wurde der Ansatz auf Eis gekühlt und mit 700 µl LB-Medium vermischt. Damit sich die Plasmid-vermittelte Antibiotikaresistenz in den Zellen ausbilden konnte, wurden diese im Anschluss für eine bestimmte Zeit bei 37 °C im EPG rotierend auf einem Brutroller (*Rotator SB2,* Stuart) inkubiert (Km^R 2 h, Tc^R 3 h). Bei der Transformation von Ligationsansätzen wurde die Zellsuspension daraufhin 1 min bei 8.000 xg zentrifugiert und 800 µl des Überstandes abgenommen. Anschließend wurde das Zellpellet im restlichen Überstand resuspendiert und auf Antibiotika-haltigem LB-Agar ausplattiert. Bei der

Transformation von schon sequenzierten Plasmiden (Retransformation) wurden nach der Inkubation bei 37 °C direkt 100 µl der Zellsuspension auf Selektivagar ausplattiert. Die Agar-Platten wurden danach ü.N. bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag entweder für eine Plasmidpräparation (**2.7.8.1**) oder Konjugation (**2.7.7**) verwendet.

2.7.7 Konjugativer Transfer mobilisierbarer Plasmide von *E. coli* zu *R. capsulatus*

(nach Elhai & Wolk, 1988)

R. capsulatus nimmt im Gegensatz zu *E. coli* fremde Plasmide nicht durch Transformation auf. Stattdessen müssen Plasmide mittels eines konjugativen Transfers von *E. coli* auf *R. capsulatus* Zellen übertagen werden. Die zu übertragenden Plasmide wurden zuvor in den konjugationskompetenten *E. coli*-Stamm S17-1 transformiert (**2.7.6.2**). Von diesen Transformationsplatten und von frischen *R. capsulatus* Platten wurden Zellen mit Hilfe einer Impföse unter sterilen Bedingungen in eine Lösung aus 500 µl PY-Medium ohne Eisen (**2.8.1.2, Tab. 12**) und 500 µl Ammonium-haltigem RCV-Medium übertragen und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 10 min bei 16.000 xg zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde für jede Konjugation eine PY-Agarplatte ohne Antibiotikum vorbereitet, indem mittig auf den Agar ein Celluloseacetat-Filter (Whatman™) gelegt wurde. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis auf einen kleinen Rest von ca. 100 µl verworfen und das Pellet aus *E .coli* und *R. capsulatus* Zellen darin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach mittig auf den Filter auf der PY-Agarplatte pipettiert. Die Platte wurde schließlich ü.N. aerob bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Filter und 1 ml Ammonium-haltiges RCV-Medium in ein EPG überführt und die Zellen mittels Vortexen vom Filter gewaschen. Nachdem der Filter entfernt wurde, wurden die Zellen für 10 min bei 16.000 xg pelletiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen. Zum Schluss wurde das Zellpellet mit dem Rest des Überstandes resuspendiert und mit Hilfe einer Impföse auf Antibiotika-haltigem PY-Agar verteilt. Die Inkubation erfolgte zwei bis drei Tage unter phototrophen Bedingungen (**2.8.1.2**).

2.7.8 Präparation von DNA (Birnboim & Doly, 1979)

2.7.8.1 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden zunächst *E. coli*-DH5α-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid transformiert (**2.7.6.2**). Nach der Inkubation bei 37 °C ü.N. wurden Einzelzell-Kolonien mit Zahnstochern von der Platte gepickt und in TB-Medium (**2.8.1.1, Tab. 11**), welches mit einem entsprechenden Antibiotikum (**2.6**) versetzt war, überführt. Die Kultivierung bei 37 °C fand ü.N. in *FlowerPlate®s*(48 well MTP, flower; m2plab) mit Hilfe eines Plattenschüttlers (Edmund Bühler GmbH) statt. Am nächsten Tag wurden die Zellkulturen mit dem *innuPrep Plasmid Mini Kit* (Analytik Jena)

behandelt und am Ende mit 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.7.8.2 Präparation von genomischer DNA

Zur Präparation genomischer DNA aus Bakterien wurden die Zellen nach der für den Organismus üblichen Methode bis zur stationären Phase angezogen oder es wurden Zellen, die auf Festmedium angezogen wurden, mittels Imfpöse in Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen in jedem Fall pelletiert. Danach wurde die Isolierung der genomischen DNA mit dem *DNEasy Tissue Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben (ausgehend von „Appendix D: Preparation of genomic DNA from Gram-negative bacteria“) durchgeführt.

2.7.9 Sequenzierung von DNA

Nach der Erzeugung neuer Plasmide und anschließender Überprüfung mittels Testrestriktion (**2.7.4**) wurden positiv getestete Plasmide als Auftragsarbeit durch MWG Eurofins Genomics sequenziert.

2.8 Mikrobiologische Methoden

2.8.1 Anzucht von Bakterien

2.8.1.1 Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde entweder auf LB-Agarplatten, in TB-Flüssigmedium oder in LB-Flüssigmedium (**Tab. 11**) in Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen: maximal 1/10 des Maximalvolumens) ü.N. bei 37 °C inkubiert. Als Vorkultur (VK) werden Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h inkubiert wurden. Diese wurden entweder mit einem sterilen Zahnstocher mit einer Einzelkolonie von Leerstamm- bzw. Transformations-Agarplatten oder mit 20 µl aus einer Gefrierkultur (**2.8.2**) inokuliert. Hauptkulturen (HK) wurden mit einer VK auf eine Zelldichte, die einer $OD_{580\,nm}$ von 0,05 entspricht, inokuliert. Bakterien mit eingebrachten Plasmiden wurden durch Zugabe eines geeigneten Antibiotikums (**2.6**) unter Selektionsdruck kultiviert.

Tab. 11. Medienkomponenten für die Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium	
LB-Medium (Luria/Miller) (Roth)	25 g
A. dest.	ad 1000 ml
LB-Agar	
Agar	15 g
LB-Flüssigmedium	ad 1000 ml
TB-Medium	
Terrific-Broth modifiziert (Roth)	47,6 g
Glycerin	4 ml
A. dest.	ad 1000 ml

2.8.1.2 Anzucht von *Rhodobacter capsulatus* (Klipp *et al.,* 1988)

Die Kultivierung von *R. capsulatus* auf Festmedien erfolgte auf PY-Agarplatten, nach Bedarf mit benötigtem Antibiotikum (**2.6**). Nach dem Ausstreichen der Bakterien wurden die Platten in speziellen Anaerob-Inkubationstöpfen unter Verwendung des Microbiology Anaerocult A (Merck) im Starklicht (sechs Glühbirnen a 60 W, vgl. Heck, 2008) bei 30 °C für zwei bis drei Tage inkubiert.

Die Anzucht von Vorkulturen (VK) erfolgte, je nach Bedingung, in luftdichten, verschließbaren Hungate-Röhrchen (Hungate, 1969) (phototroph, anaerob im Starklicht) oder in 100 ml-Erlenmeyerkolben (chemotroph, aerob im Dunkeln). Als Medium wurden 15 ml oder 40 ml Ammonium-haltiges RCV-Flüssigmedium (**Tab. 12**) verwendet und je nach Bedarf mit Antibiotikum (**2.6**) versetzt, um Selektionsdruck zu erzeugen. Eine kleine Menge Zellen wurde mit Hilfe einer Impföse von PY-Agarplatten in das Medium überführt, um die VK zu inokulieren. Die Hungate-Röhrchen wurden im Gegensatz zu den Erlenmeyerkolben anschließend zusätzlich mittels Septen luftdicht verschlossen. Die Inkubation erfolgte danach für zwei bis drei Tage im Starklicht (s.o.; photoheterotroph) oder im Dunkeln unter Schütteln (130 UpM) bei jeweils 30 °C.

Photoheterotroph anzuziehende Hauptkulturen (HK) von *R. capsulatus* wurden in Hungate-Röhrchen (15 ml) inkubiert. Als Medium wurde je nach verwendetem Expressionssystem Serin-haltiges oder Ammonium-haltiges RCV-Flüssigmedium (**Tab. 12**) verwendet. Das Medium wurde je nach Bedarf mit Antibiotikum (**2.6**) versetzt. Die Inokulation der HK erfolgte aus einer phototroph gewachsenen VK zu einer optischen Dichte ($OD_{660\,nm}$) von 0,05. Die Gefäße wurden anschließend mittels Septen luftdicht verschlossen und die Kulturen für zwei Tage unter Starklicht (s.o.) bei 30 °C inkubiert.

Mikroaerobe HK wurden in 60 ml Serin- oder Ammonium-haltigem RCV-Medium, welches je nach Bedarf mit Antibiotikum versetzt wurde, in Erlenmeyerkolben (100 ml) inkubiert. Die Inokulation auf eine optische Dichte ($OD_{660\,nm}$) von 0,05 wurde unter Verwendung von aerob kultivierten VK durchgeführt. Die anschließende Kultivierung erfolgte für zwei Tage unter aeroben Bedingungen bei 30 °C.

Die spezifischen Anzuchtbedingungen für die Terpenproduktion werden im nachfolgenden Kapitel ausführlich beschrieben.

Tab. 12. Medienkomponenten und -zusammensetzung für die Kultivierung von *R. capsulatus*

RCV-Medium (nach Weaver *et al.*, 1975)	
Malat 10 %	40 ml
EDTA 1 %	2 ml
$MgSO_4$ 20 %	1 ml 2 ml für RCV 2/3 Py
Spurenelemte-Lösung	1 ml
$CaCl_2$ 7,5 %	1 ml
$FeSO_4$ 0,5 %	2,4 ml

Thiamin 0,1 %	1 ml 2 ml für RCV 2/3 PY
A. dest.	Ad 980 ml
Nach dem Autoklavieren werden dem Medium 9,6 ml Phosphatpuffer (1 M) und je nach Expressionsbedingung entweder 10 ml Ammoniumsulfat (10 %) oder 10 ml Serin (10 %) hinzugefügt.	
PY-Medium/Agar (nach Sambrook *et al.*, 1989)	
Bacto™ Peptone	10 g 20g für RCV/2/3 PY
Bacto™ Yeast Extract	0,5 g 20g für RCV/2/3 PY
Select Agar (Invitrogen)	20 g
A. dest.	Ad 1000 ml
Nach dem Autoklavieren werden dem PY-Medium/Agar 2 ml $MgCl_2$ (1 M), 2 ml $CaCl_2$ (1 M) und 2,4 ml $FeSO_4$ (0,5 %) zugesetzt.	
Spurenelemente-Lösung 5x	
$MnSO_4$	0,4 g
H_2BO_3	0,7 g
$Cu(NO_3)_2$	0,01 g
$ZnSO_4$	0,06 g
Na_2MoO_4	0,2 g
A. dest.	Ad 250 ml
Phosphatpuffer 1 M (pH 6,8)	
KH_2PO_4	81,3 g
K_2HPO_4	78,7 g
A. dest.	Ad 500 ml
$FeSO_4$ 0,5 %	
konz. HCl	1 ml
$FeSO_4$ 0,5 %	Ad 200 ml
PYG-Medium	
Bacto™ Peptone	0,3 g
Bacto™ Yeast Extract	0,3 g
$MgCl_2$ 20 %	0,25 ml
$CaCl_2$ 7,5 %	0,4 ml
A. dest.	Ad 100 ml
RCV 2/3 PY-Medium	
RCV-Medium für RCV 2/3 PY	900 ml
PY-Medium für RCV 2/3 PY	100 ml
VN-Medium (pH 7)	
Bacto™ Yeast Extract	10 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4$	0,5 g

2.8.1.3 Versuchsaufbau und Kultivierungsbedingungen für die Produktion von Patchoulol in *R. capsulatus*

Als erstes erfolgte die Transformation von *E. coli* S17-1-Zellen (**2.7.6.2**) mit den benötigten Expressionsvektoren (**Abb. 5, A**), danach wurden letztere mittels konjugativen Transfers (**2.7.7**) in ausgewählte *R. capsulatus* Stämme übertragen. Nach zweimaligem Ausstreichen (**Abb. 5, B**) auf PY-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz (**2.6**) zur Vermeidung von Kontaminationen mit *E. coli* und jeweils 2-3-tägigem Inkubieren in Anaerob-Inkubationstöpfen (**2.8.1.2**) unter

kontinuierlicher Belichtung mit Starklicht (sechs Glühbirnen a 60 W, vgl. Heck, 2008) wurden die konjugierten *R. capsulatus* Stämme in Flüssigmedium vorkultiviert (**Abb. 5, C**). Bei jeder Vorkultur wurde Ammonium-haltiges RCV-Medium (**2.8.1.2, Tab. 12**) verwendet, da die Expression der *nif*-basierten Expressionsvektoren somit vollständig reprimiert werden kann (Özgür, 2015). Das Medium wurde mit Hilfe einer Impföse mit konjugierten *R. capsulatus*-Zellen inokuliert und für 2 Tage unter den jeweiligen Bedingungen kultiviert. Je nachdem, ob die Hauptkulturen unter anaerob phototrophen oder mikroaerob chemotrophen (60 ml) Bedingungen wachsen sollten, wurden die Vorkulturen unter denselben Bedingungen inkubiert. Anaerobe Vorkulturen wurden in luftdicht verschlossenen Hungates in 15 ml Medium unter durchgehender Belichtung im Starklicht und mikroaerobe Vorkulturen in 40 ml Medium im Dunkeln und unter Schütteln (130 UpM) für jeweils 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

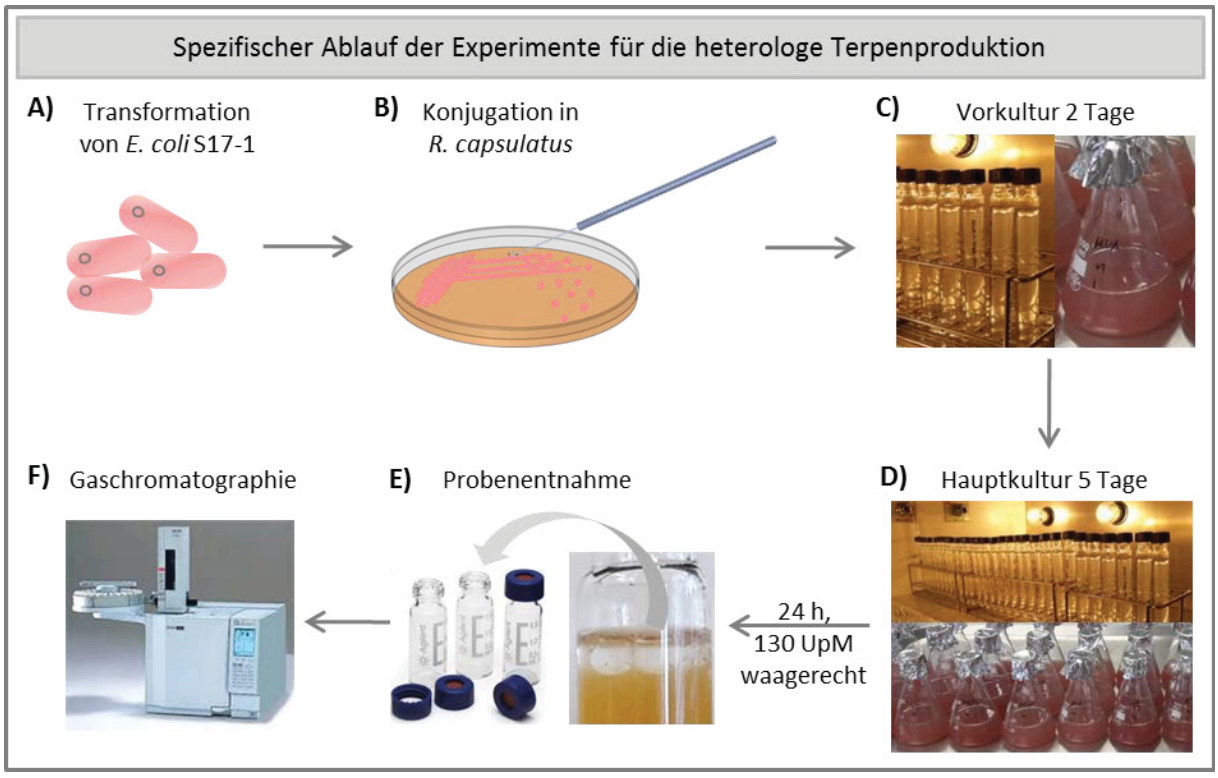

Abb. 5. Spezifischer Ablauf der Experimente für die heterologe Terpenproduktion.
Der Ablauf der Terpenproduktionsexperimente beginnt mit der Transformation von *E. coli* S17-1 mit den Expressionsvektoren, wird gefolgt von der Konjugation in *R. capsulatus* und dem zweimaligen Überstreichen auf Antibiotika-haltigem PY-Agar mit anschließender 2-tägiger Vorkultivierung. Danach schloss sich die 5-tägige Kultivierung unter anaerob phototrophen oder mikroaerob chemotrophen Bedingungen an, bei denen die Medien mit n-Dodecan (1/30 des Kulturvolumens) überschichtet wurden. Nachdem die anaeroben Kulturen zusätzlich für einen weiteren Tag waagrecht im Dunkeln bei 130 UpM inkubiert wurden, wurde die n-Dodecan-Phase abgenommen und davon 100 µl entnommen und für die Analyse mit dem Gaschromatographen eingesetzt.

Im Anschluss wurden die Hauptkulturen (**Abb. 5, D**) auf eine $OD_{660\,nm}$ von 0,05 mit den entsprechenden Vorkulturen inokuliert. Dafür wurden entsprechende Zellmengen der Vorkulturen pelletiert und in 200 µl Serin-haltigem Medium resuspendiert, um noch potentiell enthaltenes

Ammonium aus der Kultur zu entfernen, da die Expression der Zielgene unter Kontrolle des *nifHDK*-Promotors in den *nif*-basierten Expressionsvektoren nur unter Abwesenheit von Ammonium induziert wird. Für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Expressionvektoren wurden alle Hauptkulturen in Serin-haltigem Medium inkubiert. Die anaeroben Hauptkulturen wurden in Hungates in 14 ml Medium unter durchgehender Belichtung im Starklicht und die mikroaeroben Hauptkulturen in 60 ml Medium im Dunkeln und unter Schütteln (130 UpM) jeweils für 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Um die hydrophoben Terpene aus dem Medium zu extrahieren, wurden die Medien der Hauptkulturen von Beginn an mit dem organischen Lösungsmittel n-Dodecan überschichtet (anaerob: 500 µl, mikroaerob: 2 ml), eine etablierte Strategie in Studien zur mikrobiellen Produktion von Terpenen (Girhard *et al.*, 2009; Frohwitter *et al.*, 2014; Lauersen *et al.*, 2016). Nach 5 Tagen wurden die anaeroben Kulturen zusätzlich für 24 h waagerecht liegend im Dunkeln bei 130 UpM geschüttelt, um eine bessere Extraktionseffizienz bzw. einen besseren Übertrag des hydrophoben Terpens aus dem hydrophilen Medium in die hydrophobe Phase des n-Dodecans zu erreichen (**Abb. 5, E**). Für die mikroaeroben Kulturen war dies nicht nötig, da sie bereits 5 Tage geschüttelt wurden und es dabei zu einer kontinuierlichen Durchmischung der zwei Phasen kam. Danach wurden die n-Dodecan-Phasen in EPG überführt und jeweils 100 µl als Probe entnommen und in geeignete Gefäße zur gaschromatographischen Analyse (GC-Vials) überführt und anschließend mittels GC (**2.10.4**) analysiert (**Abb. 5, F**).

Um ausschließen zu können, dass bei der gewählten Methode das Patchoulol-Signal von spezifischen Signalen, die durch das n-Dodecan oder durch zelluläre Komponenten, die unter den getesteten Kultivierungsbedingungen in *R. capsulatus* akkumulieren, überlagert wird, wurden zuvor entsprechende Proben mittels GC analysiert (**Abb. 6**). Dabei wurde deutlich, dass *R. capsulatus* SB1003 während der Kultivierung keine in die n-Dodecan-Phase übergehende Stoffe produzierte, die nach dieser Analyse-Methode mit dem Patchoulol-Signal interferieren würden. Durch den Vergleich der Chromatogramme des Standards mit dem des reinen n-Dodecans konnte zusätzlich ausgeschlossen werden, dass der Patchoulol-Peak durch andere unspezifische Signale überlagert wird.

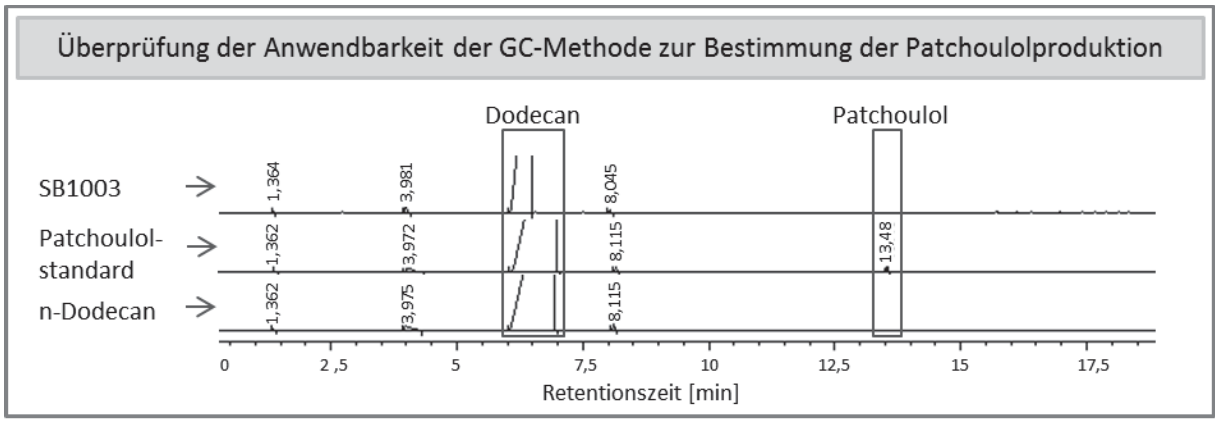

Abb. 6. Überprüfung der Anwendbarkeit der GC-Methode zur Bestimmung der Patchoulolproduktion in *R. capsulatus.*
In der Abbildung sind die GC-Chromatogramme von reinem n-Dodecan, von verdünntem Patchoulolstandard (0,25 mg in 500 µl n-Dodecan) und von n-Dodecan, welches während der Kultivierung über *R. capsulatus* SB1003-Kulturen geschichtet worden war, dargestellt. Patchoulol konnte ausschließlich im entsprechenden Standard spezifisch mit einer Retentionszeit von 13,48 min detektiert werden. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass das Patchoulol-Signal von Signalen anderer Substanzen aus *Rhodobacter*-Zellextrakten und n-Dodecan überlagert wird

Um die Patchoulolausbeuten verschiedener Stämme vergleichend bewerten zu können, wurde eine Eichung mit kommerziell erhältlichem Patchoulol als Referenzsubstanz vorgenommen. Mit deren Hilfe wurden die im GC-Chromatogramm ermittelten Peakflächen mit der für Patchoulol entsprechenden Retentionszeit (t_R = 13,48 min) anschließend in Milligramm pro Liter Kultur (mg/l) umgerechnet (**2.10.4.1**).

2.8.2 Kryokonservierung (nach Koh, 2013)

E. coli

Zur dauerhaften Lagerung von *E. coli* Stämmen wurden Gefrierkulturen hergestellt. Hierfür wurden 2 ml einer VK (**2.8.1.1**) mit 2 ml Glycerol (80 %-ig) vermengt und in 500 µl Aliquots aufgeteilt und anschließend bei -80 °C gelagert.

R. capsulatus

Um Gefrierkulturen von *R. capsulatus* Stämmen zu erzeugen, wurden 5 ml Ammonium-haltiges RCV-Flüssigmedium (**2.8.1.2, Tab. 12**) mit Zellmaterial einer anaerob inkubierten Platte inokuliert und ü.N. bei 30 °C aerob mit 130 UpM geschüttelt. Danach wurde die Kultur durch Zentrifugation (10 min, 16.000 xg) pelletiert und in 2 ml PYG-Medium (**2.8.1.2, Tab. 12**) resuspendiert und mit 2 ml Glycerol vermischt. Danach wurde die Zellsuspension in 500 µl Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C gelagert.

2.8.3 Erzeugung der *knockout*-Mutante SB1003Δ*crtE*

Um das *crtE*-Gen in *R. capsulatus* zu deletieren, wurde zunächst der Mutagenesevektor pSUP202-*crtEup/dw*<Spc erzeugt (**Abb. 7**).

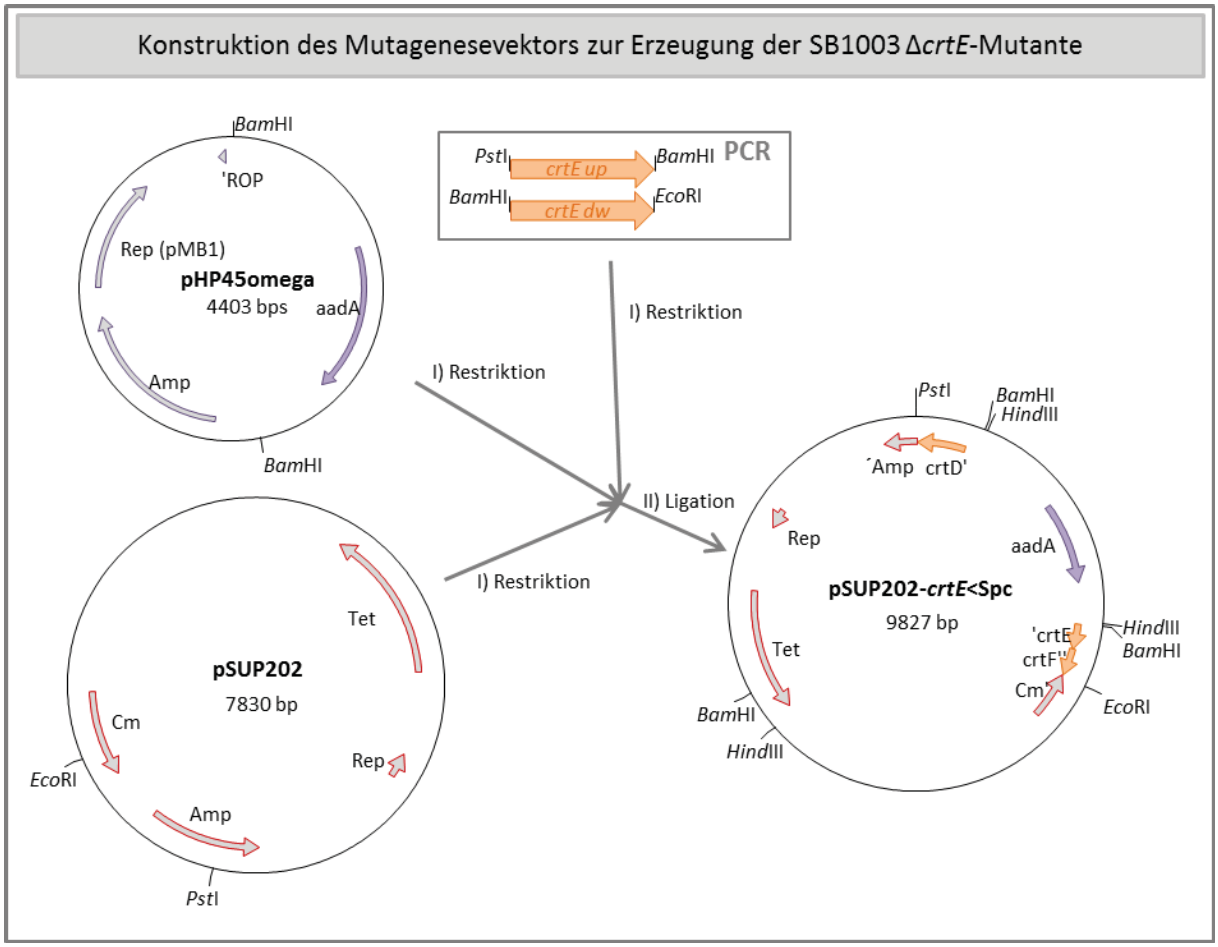

Abb. 7. Konstruktion des Mutagenesevektors zur Erzeugung der SB1003Δ*crtE*-Mutante.
Der Mutagenesevektor pSUP202-*crtE*up/dw<Spc wurde hergestellt, indem zunächst der Vektor pSUP202 mit *Pst*I und *Eco*RI und der Vektor pHP45omega mit *Bam*HI und die durch PCR hergestellten Fragmente, die den *up*- und *downstream* Bereich von *crtE* beinhalten, mit *Pst*I, *Bam*HI bwz. *Bam*HI, *Eco*RI hydrolysiert wurden. Anschließend wurde das pSUP202-Fragment, das den Replikationsursprung (Rep) trägt, die Spc-Kassette (*aadA*) aus pHP45omega und die hydrolysierten PCR-Fragmente gemeinsam ligiert.

Dafür wurden zunächst 500 bp lange Bereiche, die im Chromosom von *R. capsulatus* direkt vor (*upstream*) und hinter (*downstream*) dem Gen *crtE* liegen mittels PCR (**2.7.1**) mit entsprechenden Oligonukleotiden (**2.3**) amplifiziert. Anschließend wurden die erhaltenen Fragmente nach der Reinigung (**2.7.2 + 2.7.3**) mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I, *Bam*HI bzw. *Bam*HI, *Eco*RI hydrolysiert (**2.7.4**). Gleichzeitig wurden die Vektoren pSUP202 (*Eco*RI, *Pst*I) und pHP45omega (*Bam*HI) geschnitten. Danach wurden die PCR-Fragmente gereinigt und das Fragment aus pSUP202, das den Replikationsursprung enthält, und das Fragment aus pHP45omega, das die Spc-Kassette (*aadA*) enthält, mittels Agararose-Gelelektrophorese (**2.7.2**) aufgetrennt, isoliert und ebenfalls gereinigt (**2.7.3**). Anschließend wurden alle Fragmente in einem Ansatz (**2.7.5**) ligiert. Nachdem der

Ligationsansatz in *E. coli* DH5α transformiert wurde (**2.7.6.2**), wurden einzelne Klone in TB-Medium inkubiert und deren Plasmid-DNA isoliert (**2.7.8.1**). Nach anschließender Testrestriktion (**2.7.4**) wurde die Plasmid-DNA von positiv bewerteten Klonen mittels Sequenzieren (durch die Firma MWG) überprüft. Nach der erfolgreichen Sequenzierung wurde der neu entstandene Vektor als pSUP202-*crtE*up/dw<Spc bezeichnet.

Der Austausch des *crtE* Gens durch die Spc-Kassette erfolgte anschließend durch homologe Rekombination. Dazu wurde *E. coli* S17-1 mit dem Mutagenesevektor pSUP202-*crtE*/dw<Spc transformiert (**2.7.6.2**). Danach wurde der Vektor mittels Konjugation in den *R. capsulatus* Stamm SB1003 transferiert (**2.7.7**), welcher anschließend auf PY-Agar, der mit Rif/Spc versetzt war, ausgestrichen wurde. Während der homologen Rekombination kann entweder nur ein Rekombinationsereignis stattfinden, sodass eine *single-crossover* Mutante entsteht, oder direkt zwei Rekombinationsereignisse, sodass eine *double-crossover* Mutante entsteht, die einen stabilen Genotyp zeigt. Die *single-crossover* Mutante trägt nach der Rekombination den kompletten Vektor im Genom, sodass sowohl eine Spc- als auch eine Tet-Resistenz auftritt. Die *double-crossover* Mutante hat den Vektoranteil mit der Tet-Resistenz verloren, sodass sie nur gegen Spc eine Resistenz aufweist (**Abb. 8**).

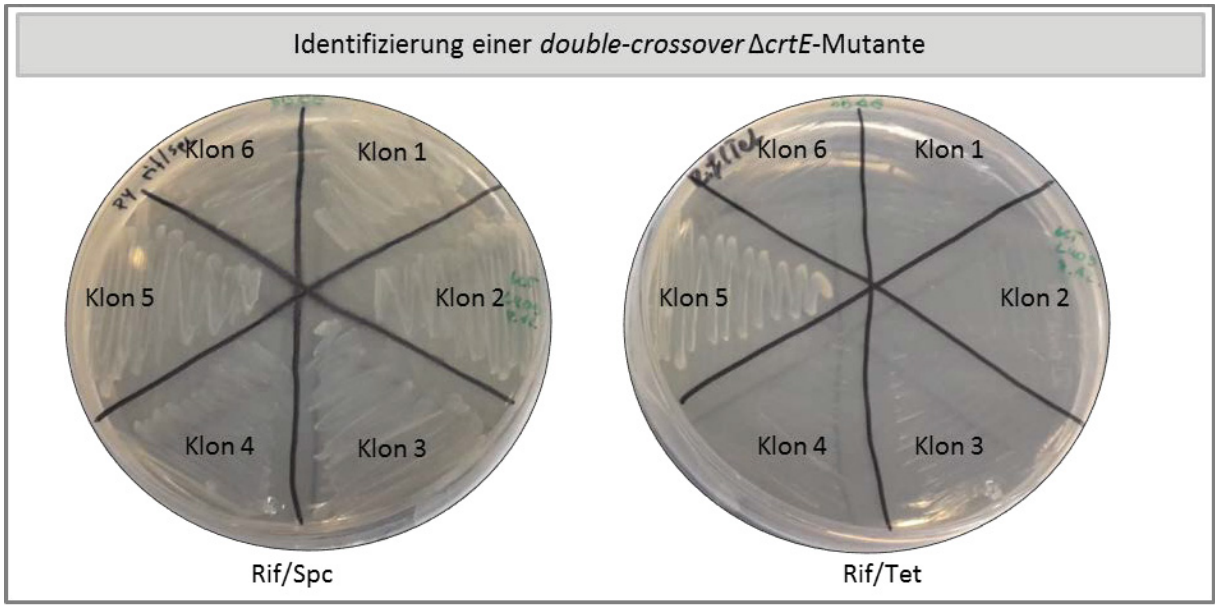

Abb. 8. Identifizierung einer *double-crossover* ΔcrtE-Mutante.
Die *double-* oder *single-crossover ΔcrtE*-Mutanten können anhand ihrer verschiedenen Resistenzen unterschieden werden. *Double-crossover* Mutanten tragen nur noch die Spc-Kassette des Mutagenesevekors im Genom, während die *single-crossover* Mutante (Klon 5) den gesamten Vektor in sich tragen, sodass sie im Gegensatz zu *double-crossover* Mutanten (Klone 1 - 4, 6) sowohl auf Rif/Spc als auch auf Rif/Tet PY-Agar wachsen können.

Beide Rekombinationsereignisse führten zu einer grünen Pigmentierung (blassgrün bei aerober Kultivierung, wie in **Abb. 8**, dunkelgrün bei anaerober Kultivierung). Diese beruhte darauf, dass die

natürliche Carotinoidproduktion durch die Deletion von *crtE* unterbrochen worden ist, sodass die roten Pigmente fehlten und sich die Farbe des grünen Bacteriochlorophyll a durchsetzte. Da aber beide Mutanten nicht nur den gleichen Phänotyp aufwiesen, sondern auch auf Rif/Spc-PY-Agar wuchsen, wurden die einzelnen grünen Klone parallel auf PY-Agarplatten, die entweder mit Rif/Spc oder mit Rif/Tet versetzt waren (**2.6**) mit Zahnstochern übertragen. Durch das parallele Übertragen und die Auswertung des Resistenz-Phänotyps konnten somit stabile Mutanten identifiziert und eine davon ausgewählt werden (Klon 1), die anschließend durch Kryokonservierung (**2.8.2**) zur dauerhaften Lagerung bei -20 °C haltbar gemacht wurde.

2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Präparation von Proteinproben für SDS-PAGE

(Özgür, 2015)

Nach der Kultivierung von Expressionskulturen wurden Proben, die einer Zelldichte von $OD_{580\ nm/660\ nm}$ = 1 entsprachen, aus der Kultur entnommen und durch Zentrifugation bei 16.000 xg (*R. capsulatus*: 5 min; *E. coli*: 1 min) pelletiert. Die Zellpellets wurden in 50 µl SDS-Probenpuffer (**2.5, Tab. 6**) resuspendiert und anschließend für 10 min bei 99 °C unter ständigem Schütteln (800 UpM) erhitzt. Die Proben wurden entweder direkt im Anschluss für die SDS-PAGE (**2.9.2**) verwendet oder zunächst bei -20 °C gelagert. Im letzteren Fall mussten die Proben nach dem Auftauen ein weiteres Mal für 10 min bei 99 °C unter ständigem Schütteln (800 UpM) inkubiert werden.

2.9.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

(nach Laemmli, 1970)

Das Verfahren der SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe. Die SDS-PAGE wurde in einer Mini-Protein-Gelkammer (BioRad) durchgeführt. Als erstes wurde das SDS-Gel hergestellt (**2.5, Tab. 6**). Dafür wurde zunächst das Trenngel, welches anschließend mit Isopropanol überschichtet wurde, gegossen. Nach etwa 15 min war dieses vollständig polymerisiert, sodass das Isopropanol entfernt und nach anschließendem Waschen mit A. dest. das Sammelgel darüber geschichtet werden konnte. Nach dem ein geeigneter Gel-Kamm eingesetzt wurde, wurde das Gel nach erfolgter Polymerisation (ca. 30 min) in eine Elektrophorese-Kammer überführt und diese mit SDS-Laufpuffer (**2.5, Tab. 6**) gefüllt. Nachdem der Gel-Kamm entfernt wurde, wurden die Proteinproben (10 µl) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit Hilfe des *Electrophoresis Power Supply – EPS 601* (GE Healthcare Life Science) zunächst für 15 min bei 100 V, bis sich die Proben am Beginn des Trenngels verdichtet hatten, und anschließend für etwa 1 h bei

180 V, bis der Blaumarker den unteren Gel-Rand erreichte. Nach der erfolgten Elektrophorese wurden die Proteine mittels Western Blot (**2.9.3**) von den Gelen auf Membranen übertragen.

2.9.3 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

(Wilson & Juan, 1989)

Mit dem Western Blot Verfahren werden nach der Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE (**2.9.2**) die Proteine auf eine *Sequi-Blot™-PVDF-Membran* (BioRad) übertragen, sodass gesuchte Proteine anschließend durch einen immunologischen Nachweis (**2.9.4**) spezifisch detektiert werden können. Dafür wurde die PVDF-Membran zunächst für 1 min in Ethanol (p.a) equilibriert, danach für 5 min in A. dest. gewaschen und zum Schluss für mindestens 10 min in 1x Blot-Puffer (**2.5**, **Tab. 7**) inkubiert. Das SDS-Gel wurde in der Zwischenzeit für 10 min ebenfalls mit 1x Blot-Puffer gewaschen. Die Transferapparatur wurde nach Herstellerangaben (BioRad) zusammengebaut und in die Blot-Kammer eingesetzt. Die Blot-Kammer wurde danach vollständig mit 1x Blot-Puffer gefüllt. Ein Eisblock und ein Magnetrührer in der Kammer dienten dazu, dass der Puffer während des Transfers (15 min, 150 mA, anschließend 30 min, 300 mA) nicht überhitzte. Die gesuchten Proteine, die mit allen anderen Zellproteinen auf die PVDF-Membran übertragen wurden, konnten anschließend durch Immunodetektion (**2.9.4**) spezifisch nachgewiesen werden.

2.9.4 Immunodetektion von Proteinen

Nachdem die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert wurden (**2.9.3**), wurden diese ü.N. bei 4 °C in Blocking-Puffer (**2.5, Tab. 7**) inkubiert, um freie Proteinbindestellen der Membran zu besetzen. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für jeweils 5 min mit PBS-T-Puffer (**2.5, Tab. 7**) unter leichtem Schütteln gewaschen. Anschließend wurde die Membran in PBS-T-Puffer, welchem der Antikörper *Anti-GFP* (Roche) in einer Verdünnung von 1:5.000 zugesetzt worden war, für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran drei weitere Male für 5 min mit PBS-T-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und dann mit dem Zweitantikörper *Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate* (BIO-RAD) versetzt (1:10.000 in PBS-T) und wieder für 1 h bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Nachdem die Membran anschließend ein letztes Mal wie zuvor gewaschen wurde, erfolgte die Detektion mittels frisch angesetzter ECL-Lösung (**2.5, Tab. 6**). Die Membran wurde dazu luftblasenfrei auf eine klare Plastikunterlage gelegt und die Lösung mehrmals auf der Membran verteilt. Mit Hilfe des *Science Imaging* konnte im *Advanced Fluorescence Imager* (Intas) die durch die Reaktion der an den Mausantikörper gekoppelten Peroxidase mit der ECL-Lösung entstehende Chemolumineszenz detektiert werden. Die aufgenommenen Bilder konnten anschließend mit dem Programm *ChemoStar Imager* (Intas) bearbeitet und gespeichert werden.

2.9.5 Amidoschwarz-Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach der Detektion der auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine (**2.9.4**) wurde die Membran für 10 min in eine Amidoschwarz-Färbelösung (**2.5, Tab. 7**) gelegt, um alle übertragenen Proteine anzufärben. Die Membranen wurden anschließend kurz mit A. dest. gewaschen und danach auf ein Tuch zum Trocknen gelegt, wodurch sich die an die Membran gebundenen Proteine vom Hintergrund deutlich abhoben.

2.10 Biopyhsikalische Methoden

2.10.1 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) einer Flüssigkultur wurden von dieser 100 µl entnommen und mit 900 µl A. dest. in einer Halbmikro-Küvette (VWR) gemischt. Anschließend wurde die verdünnte Probe einer photometrischen Messung mit dem *Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer* (Thermo Scientific) unterzogen. Der Nullwert (*blank*) wurde ebenfalls mit A. dest. eingestellt. Für *R. capsulatus* erfolgte die Messung bei 660 nm und für *E. coli* bei 580 nm.

2.10.2 Aufnahme von Absorptionsspektren (Loeschcke, 2012)

Zur photospektrometrischen Untersuchung der Pigmente in *R. capsulatus* wurden Zellen entsprechend einer $OD_{660\,nm}$ = 1 durch Zentrifugation (3 min, 21.000 xg) pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 50 µl A. dest. resuspendiert und mit 1 ml Ethanol vermischt und anschließend geschüttelt. Danach wurden die Zelltrümmer mittels Zentrifugation vom Überstand getrennt (1 min, 21.000 xg), der nun pigmentierte Überstand in Halbmikro-Küvetten (VWR) überführt und das Absorptionsspektrum des Überstandes am *Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer* (Thermo Scientific) zwischen 300 und 900 nm gemessen.

2.10.3 Fluoreszenzmessung (Özgür, 2015)

Zur Bestimmung der Fluoreszenzemission des Fluoreszenz-Reporterproteins EYFP wurde zunächst die OD der Expressionskultur bestimmt, und Zellen in einem 1,5 ml-EPG entsprechend einer $OD_{660\,nm}$ = 1 durch Zentrifugation (10 min, 21.000 xg) pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml SP-Puffer (**2.5, Tab. 5**) mit Lysozym (1 mg/ml) resuspendiert und die Zellsuspension mit Glasperlen (Ø 0,25 - 0,5 mm; Roth), einem Volumen von ca. 250 µl entsprechend, versetzt. Danach wurde das 1,5 ml-EPG mit den Zellen und den Glasperlen für 10 min bei 4 °C mit einer Frequenz von 30 Hz in der *Schwingmühle MM 400* (Retsch) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer und *inclusion bodies* in 10 min mit 21.000 xg sedimentiert und 300 µl des Überstandes in eine Mikrotiterplatte (*MICROPLATTE, 96 WELL, PS, F-BODEN, TRANSP.;* Greiner) überführt und für 2 h bei Raumtemperatur

leicht geschüttelt (*HS 260 basic*; IKA), um durch Zuführung von Sauerstoff die autokatalytische Bildung des EYFP-Fluorophors zu ermöglichen. Zur Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten des gereiften EYFP wurden die Proben im Mikrotiterplatten-Photometer *Infinite®M1000 Pro* (Tecan) bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von 527 nm aufgezeichnet (Exzitationsbandbreite 9 nm, Emissionsbandbreite 20 nm, Verstärkung 100).

2.10.4 Gaschromatographie (Katzke, 2010)

Die gaschromatographische Analyse von Terpenen erfolgte im Gaschromatograph *6890N* (Agilent). Als Säule wurde eine (5%-Phenyl)-Methylpolysiloxan *HP-5* Säule (Länge 30 m, Innendurchmesser 0,32 mm, Beschichtungsdicke 0,25 µm, Temperaturbereich: von -60 °C bis 325 °C, max. 350 °C; Agilent Technologies) zur Analyse bei folgendem Ofenprogramm und folgenden Geräteeinstellungen verwendet:

Ofenprogramm: keine Äquilibrierungszeit; Initialtemperatur 100 °C (5 min), 1. Temperaturanstieg 10 °C/min auf 180 °C, 2. Temperaturanstieg 20 °C/min auf 300 °C, Endtemperatur 300 °C; Endzeit 19 min.

Geräteeinstellungen: Injektor: Waschen mit Probe 2x, Pumpen 6x; Injektionsvolumen 4 µl (für Patchoulol) bzw. 2 µl (für Valencen); vor und nach Injektion 2x Waschen mit Methanol. Inlet: Modus Splitless, Anfangstemperatur 240 °C; Druck 24,3 kPa; Gesamtfluss 3,9 ml/min, Gas Saver off; Gastyp Helium. Säule: Modus Ansteigender Fluss; Initialdruck 92 kPa für 5 min, 1. Druckanstieg 5,3 kPa/min auf 107 kPa, 2. Druckanstieg 0,5 kPa/min auf 116 kPa, 5 min halten; Initial-Fluss 2,4 ml/min; Nominaldruck 92 kPa; Durchschnittsgeschwindigkeit 42 cm/s; Auslassdruck *ambient*. Detektor (FID): Temperatur 250 °C; Wasserstoff-Fluss 40,0 ml/min; Luft-Fluss 450 ml/min,

2.10.4.1 Bestimmung der Terpenausbeute

Um festzustellen, ob und wieviel Patchoulol bzw. Valencen von *R. capsulatus* in den Kulturen produziert wurde, wurden zunächst Kalibrationen mit entsprechenden Standards (Patchouli Alkohol von Carbosynth; (+)-Valencen (*technical*, ≥70 %) von Sigma-Aldrich) erstellt. Dazu wurden Standard-n-Dodecan-Gemische mit verschiedenen Konzentrationen erzeugt und anschließend mittels Gaschromatographie (GC) (**2.10.4**) gemessen (vgl. **Abb. 11**). Mit den entsprechenden Methoden konnte eine Retentionszeit (t_R) von 13,47 min für Patchoulol und von 11,22 min für Valencen bestimmt werden. Daraus konnten folgende Korrelationen zwischen der Peakfläche und der Terpenkonzentration gezogen werden:

$$\frac{Peakfläche}{792{,}61} = Patchoulol\ (mg\ in\ 500\ \mu l\ n-Dodecan)$$

$$\frac{Peakfläche}{1391{,}5} = Valencen\ (mg\ in\ 500\ \mu l\ n-Dodecan)$$

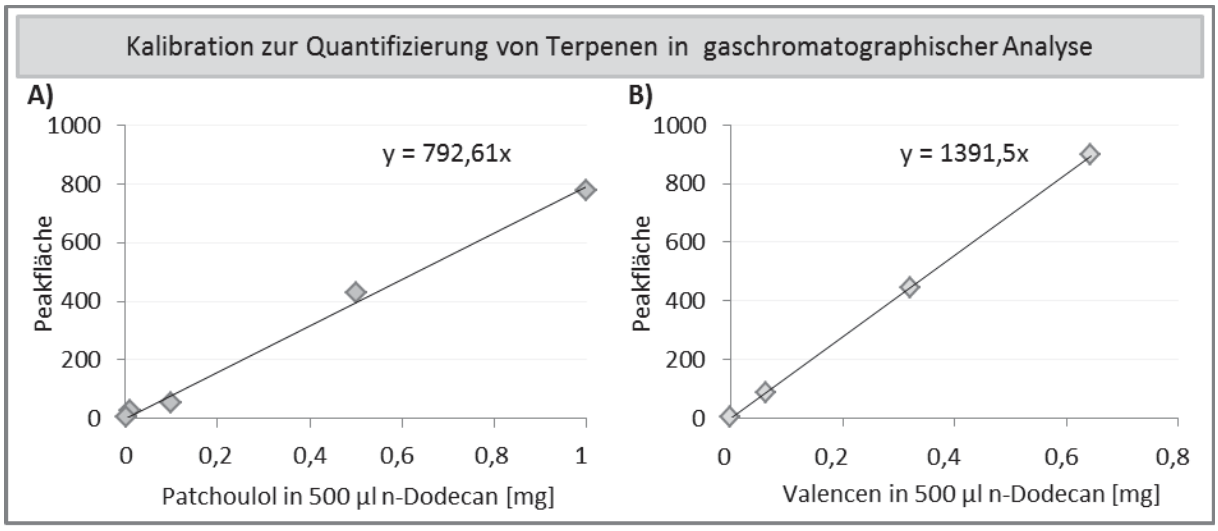

Abb. 9. Kalibration zur Quantifizierung von Terpenen in gaschromatographischer Analyse.
Links **(A)** ist die Kalibierungsgerade für Patchoulol mit der Steigung 792,61 und rechts **(B)** die Gerade mit der Steigung 1391,5 zu sehen.

Außerdem wurde die Verteilungskoeffizienz der Stoffe aus dem Medium in die Dodecan-Phase bestimmt. Dazu wurden jeweils 30 µl des Valencen-Standards (≥ 70 % Valencen; Dichte: 0,92 g/ml → ≥ 0,644 mg/µl Valencen) und 30 µl des Patchoulol-Standards (Patchoulol in Dodecan gelöst; Konzentration: 0,25 mg/µl) mit 30 ml RCV-Medium gemischt und diese Mischung anschließend in drei Hungates mit jeweils 14 ml (Valencen: 6,01 mg; Patchoulol: 2,33 mg) aufgeteilt und schließlich mit 500 µl n-Dodecan überschichtet. Danach wurden die Hungates unter den gleichen Bedingungen wie die Expressionskulturen inkubiert (5 Tage, anaerob, im Licht, 30 °C) und im Anschluss damit gleich verfahren (vgl. **3.2**). Das bedeutet, dass die Hungates nach der fünftägigen Inkubation für einen weiteren Tag bei 30 °C waagrecht liegend mit 130 UpM geschüttelt wurden und schließlich geöffnet und die n-Dodecan-Phasen in EPG überführt wurden. Proben von 100 µl wurden danach in GC-Vials (Agilent Technologies) mit Mikroeinsätzen (CS) pipettiert, um diese anschließend gaschromatographisch (**2.10.4**) analysieren zu können.

Nachdem die Peakflächen ermittelt wurden (~370 für Patchoulol und ~285 für Valencen), konnte mit Hilfe der jeweiligen Kalibration bestimmt werden, welche Menge an Patchoulol (0,467 mg) und Valencen (0,205 mg) jeweils in die n-Dodecan-Phase extrahiert wurde. Der Anteil an Patchoulol betrug demnach 20 % und an Valencen nur 3,4 %.

Mit diesen Werten konnten somit die Terpenausbeuten der Expressionskulturen berechnet werden:

$$\text{I)} \qquad \frac{Peakfläche}{Steigung\ der\ Eichgerade} = x\ mg\ in\ 500\ \mu l\ Dodecan$$

$$\text{II)} \qquad \frac{x\ mg\ in\ 500\ \mu l\ Dodecan}{Übertragsanteil} * 100 = x\ mg\ in\ 14\ ml\ RCV - Medium$$

$$\text{III)} \qquad \frac{x\ mg\ in\ 14\ ml\ RCV}{14\ ml} * 1000\ ml = x\ mg\ in\ 1\ l\ Kultur$$

Um bestätigen zu können, dass in den Proben tatsächlich Patchoulol bzw. Valencen enthalten ist, wurden ausgewählte Proben in der Zentralanalytik (ZEA-3) des Forschungszentrum Jülich mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. Mit Hilfe der entsprechenden Standards konnte sowohl Patchoulol als auch Valencen identifiziert werden (siehe unten **Abb. 10 + Abb. 11.**)

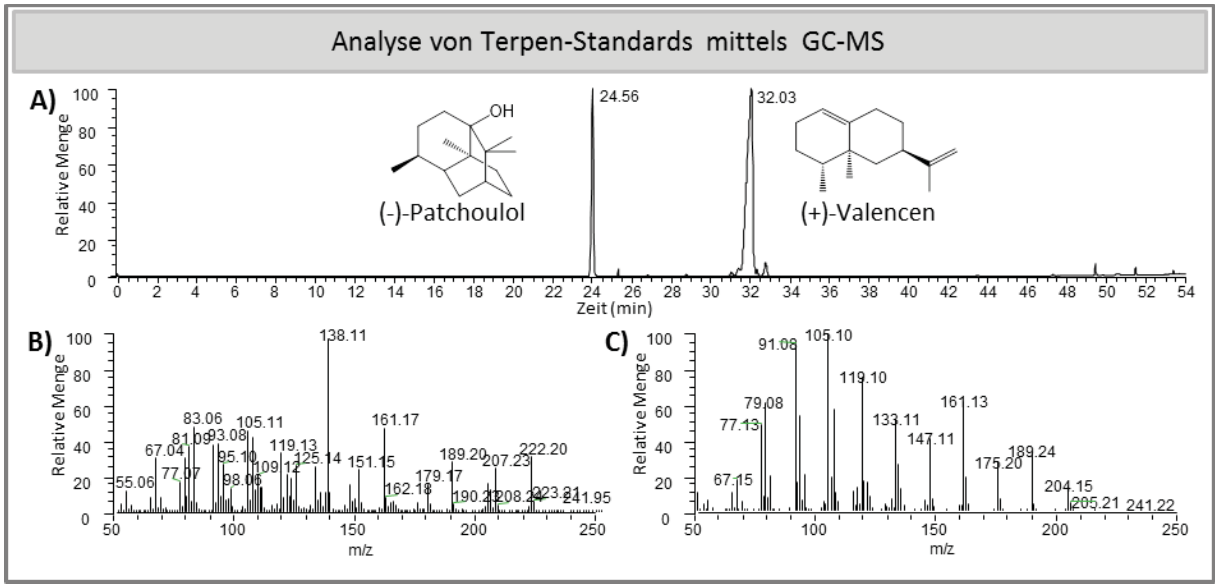

Abb. 10. Analyse von Terpen-Standards mittel GC-MS.
Graphik **A** zeigt die übereinandergelegten Chromatogramme der gaschromatographischen Analyse der Standards Patchoulol (t_R: 24,56 min) und Valencen (t_R: 32,03 min) in der Zentralanalytik (ZEA-3) des Forschungszentrum Jülich. In der Graphik sind ebenfalls die zugehörigen Strukturformeln dargestellt. Darunter sind die Daten der Massenspektroskopie für den Patchoulol- (**B**) und Valencen-Peak (**C**) zu sehen.

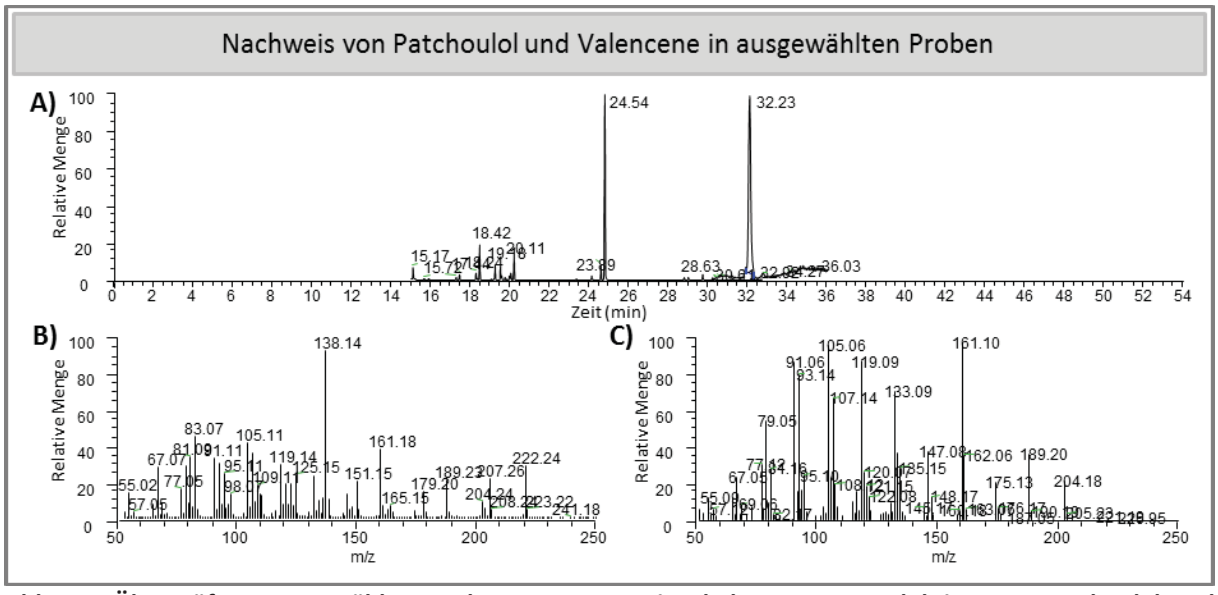

Abb. 11. Überprüfung ausgewählter Proben von Expressionskulturen zur Produktion von Patchoulol und Valencen mittels GC-MS.
Es sind die überlagerten Chromatogramme (**A**) der gaschromatographischen Messungen der Patchoulol- (t_R: 24,54 min) und Valencen-Proben (t_R: 32,32 min) dargestellt und die zu den jeweiligen Peaks gehörigen Massenspektrogramme (**B** Patchoulol, **C** Valencen).

2.11 Verwendete Datenbanken, *sofware* und *online tools*

Zur Erzeugung von kodonoptimierten DNA-Sequenzen wurde das *Codon Optimization Tool* (https://eu.idtdna.com/CodonOpt) verwendet, um die Aminosäuresequenz von gesuchten Proteinen (Brenda Enzyme) in entsprechende kodonoptimierte cDNA umzuwandeln. Anschließend wurde mit Hilfe des *Graphical Codon Usage Analyzers* (http://gcua.schoedl.de/sequential_v2.html) die Kodons für *R. capsulatus* auf ihre Häufigkeit getestet und mit Hilfe des *Manual Codon Optimization Tools* von *integrated DNA technologies* (https://eu.idtdna.com/CodonOpt/Home/ManualOpt) die Kodons an die natürliche Häufigkeit im Wirt angepasst. Für die spätere Verwaltung, Planung und Analyse von Klonierungen wurde die Software *Clone Manager* (Sci-Ed) verwendet.

Für Sequenzvergleiche sowohl auf Basis der DNA und Aminosäuren wurde das *Multiple Sequence Alignment Tool* von Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (Sievers *et al.*, 2011) angewendet.

Das *online-tool Double Digest* der Firma ThermoScientific wurde für die Planung von Restriktionen benutzt.

Mittels *ChemBioDraw-Ultra-14.0* (CambridgeSoft) wurden chemische Strukturformeln erstellt.

Zur Textverarbeitung, Auswertung von Daten und Darstellung von Diagrammen wurden die *Microsoft-Office-Programme Word, Excel* und *PowerPoint* (2010) benutzt.

3 ERGEBNISSE

Terpenoide gehören zu einer sehr großen und wichtigen Stoffgruppe, die sowohl in der Kosmetik-und Parfüm- als auch Lebensmittelindustrie, sowie im Pharmabereich große Anwendung finden (**1.1.3**). Das Sesquiterpenoid Artemisinin zum Beispiel wird weltweit und mit großem Erfolg gegen den Malaria auslösenden Parasiten *Plasmodium falciparum* eingesetzt. Ebenso bedeutend ist das Sesquiterpen Paclitaxel (Taxol®), welches das weltweit am häufigsten verkaufte Krebsmittel darstellt. Für die Parfümindustrie stellt das aus verschiedenen Terpenoiden bestehende Patchouliöl eines der bedeutendsten Duftstoffe dar. Der typisch erdig-holzige Geruch des Patchouliöl wird vor allem durch das Sesquiterpenoid Patchoulol hervorgerufen. Allerdings werden Terpenoide in ihren natürlichen Produzenten oft nur in geringen Mengen erzeugt und durch die Extraktion aus deren Geweben werden nur sehr kleine Ausbeuten erzielt. Eine Alternative bildet die chemische Synthese, die jedoch u.a. wegen der hohen strukturellen Komplexität der Terpenoide schwierig und teuer ist. Ökologischer und ökonomischer ist in Bezug auf die kommerzielle Produktion von Terpenoiden die biotechnologische Herstellung in Mikroorganismen, die sich in den letzten Jahren etabliert hat. Neben den bereits häufig verwendeten Organismen *Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* ist *Rhodobacter capsulatus* eine weitere Alternative. Er akkumuliert unter anaerob phototrophen Bedingungen in großen Mengen die Tetraterpenoide Spheroiden und Spheroidenon, sodass die Vorstufen aus der natürlichen Carotinoidbiosynthese, die für eine erfolgreiche heterologe Terpenoidproduktion benötigt werden, zur Verfügung stehen sollten. Ein großer Vorteil ist außerdem, dass er unter diesen Bedingungen ein zusätzliches Membransystem ausbildet, welches als Speicherort für hydrophobe Substanzen, wie es Terpenoide sind, dienen kann. Diese spezifischen physiologischen Eigenschaften sollten dazu führen, dass *R. capsulatus* ein guter alternativer Wirt für die Produktion von wirtsfremden Terpenoiden ist. Diese Annahme soll innerhalb der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Da der effektive Fluss von Isoprenbausteinen in den verschiedenen Ebenen der Terpenoidbiosynthese (**1.1.1**) schon in anderen Organismen als entscheidend für eine erfolgreiche Produktion in ansprechenden Ausbeuten identifiziert wurde (**1.2**), sollte am Beispiel der Patchoulolsynthese durch Expression einer kodonoptimierten Variante der Patchoulolsynthase (PatS) aus *Pogostemon cablin* mit Hilfe von *metabolic engineering* überprüft werden, ob auch in *R. capsulatus* der Zu- und Abfluss der Metabolite eine wichtige Rolle für eine effiziente Terpenproduktion spielt.

3.1 Einfluss der Zellphysiologie auf die Terpenproduktion in *Rhodobacter capsulatus*

R. capsulatus ist ein fakultativ phototorphes Bakterium, das unter photoauto- und photoheterotrophen Kultivierungsbedingungen die Synthese der Tetraterpenoide Spheroiden und Spheroidenon stark induziert. Zudem wird unter diesen Bedingungen die intrazytoplasmatische Membran (ICM) ausgebildet, die durch die stark vergößerte Membranoberfläche erhöhte Mengen hydrophober Substrate, Produkte und membranständige Enzyme aufnehmen kann. Diese besonderen physiologischen Eigenschaften sollen im Rahmen dieser Arbeit für die Produktion heterologer Terpene genutzt werden. Da die Induktion dieser Prozesse hauptsächlich durch die Gelöstsauerstoffmenge im Medium beeinflusst wird, wurde zunächst untersucht unter welchen Wuchsbedingungen (anaerob phototroph, aerob chemotroph) die natürliche Terpenoidproduktion am höchsten ist.

3.1.1 Natürliche Terpenproduktion in *Rhodobacter capsulatus*

Der natürliche Biosyntheseweg von Carotinoiden stellt den Ansatzpunkt für die heterologe Terpenproduktion in *R. capsulatus* dar. Es ist davon auszugehen, dass die Menge der zur Verfügung stehenden Vorstufen mit der der Carotinoide im Bakterium korreliert. Bedingungen, die einen höheren Carotinoidgehalt bewirken, wären folglich auch vielversprechend im Hinblick auf bessere Ausbeuten aus heterologer Terpensynthese. Es ist bekannt, dass die intrinsische Terpensynthese durch Umweltfaktoren wie Sauerstoff reguliert wird (**1.2.1**).

Um die natürliche Terpenproduktion von *R. capsulatus* in Abhängigkeit von Sauerstoff zu charakterisieren, wurde als erstes untersucht, unter welchen Anzuchtbedingungen *R. capsulatus* am meisten Carotinoide produziert. Dafür wurde der Stamm *R. capsulatus* SB1003 sowohl unter strikt anaerob photoheterotrophen Bedingungen (**2.8.1.2**) als auch unter (mikro-)aerob chemotrophen Bedingungen (**2.8.1.2**) bei 30 °C kultiviert. Nach einer zweitägigen Vorkultivierung (**2.8.1.2**), sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen (**2.8.1.2**), wurden die Hauptkulturen mit Serin-haltigem RCV-Medium (**2.8.1.2, Tab. 12**) jeweils mit den entsprechenden Vorkulturen auf eine $OD_{660\ nm}$ von 0,05 inokuliert. Für die Kultivierung unter anaeroben Bedingungen fand die Kultivierung in Hungates ($-O_2$) statt und um eine (mikro-)aerobe Kultivierung mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen zu erreichen, wurden in 100 ml Erlenmeyer-Kolben unterschiedliche Volumina an Medium gefüllt ($+O_2$, 10 - 80 ml). Hierbei gilt, dass der Sauerstoffeintrag in das Medium mit steigendem Füllvolumen sinkt. Da nach 48 h die *R. capsulatus* Kulturen die stationäre Phase erreicht hatten, wurde zu diesem Zeitpunkt die Carotinoidakkumulation der Kulturen durch Photo-Dokumentation, sowie durch photospektrometrische Analyse der mit Ethanol extrahierten

Photopigmente (**2.10.2**) aus Zellproben, die auf eine Zellmenge entsprechend einer $OD_{660\ nm}$ = 1 normiert wurden, charakterisiert (Zelldichten siehe **Anhang, 8.4.1**).

In **Abb. 12 A** sind Kulturen mit verschiedenen Füllvolumina, die unter aeroben Bedingungen angezogen wurden ($+O_2$), und eine anaerob kultivierte Kultur ($-O_2$) dargestellt. Wie erwartet, ist in den (mikro-)aeroben Kulturen (10 – 80 ml) eine zunehmende Pigmentierung mit ansteigendem Füllvolumen zu sehen. Die Pigmentierung zeigte einen Farbverlauf von weiß-gelblich (10 – 30 ml) über orange-rot (40 ml) bis hin zu dunkelrot (50 -80 ml). Im Gegensatz dazu zeigte die strikt anaerobe Kultur ($-O_2$) eine intensive orange-braune Farbe. In **Abb. 12 B** sind die Absorptionsspektren von Zellextrakten (**2.10.2**) der in **A** gezeigten Kulturen dargestellt. Der deutlichste Unterschied zwischen Kulturen, die unter strikt anaeroben oder (mikro-)aeroben Anzuchtbedingungen inkubiert wurden, sind die unterschiedlichen Absorptionsmaxima, die durch die verschiedenen Carotinoide hervorgerufen werden. Das gelb-orange-farbene Carotinoid Spheroiden, welches sich nur unter strikt anaeroben Bedingungen ($-O_2$) anreichert, verursacht einen Peak mit drei lokalen Absorptionsmaxima (430 nm, 456 nm, 487 nm). Das rosa-farbene Spheroidenon, welches in Anwesenheit von Sauerstoff enzymatisch von CrtA aus Spheroiden gebildet wird (**1.2.1**), weist einen breiten Peak mit nur einem Maximum (487 nm) auf (Britton *et al.*, 2004). Die Absorptionsmaxima bei den Wellenlängen 368 nm, 600 nm und 770 nm sind dem anderen in *R. capsulatus* vorkommenden grün-blauen Photopigment Bacteriochlorophyll a zuzuordnen. Diese Pigmentzusammensetzungen bedingen die beschriebenen Farben der Kulturen.

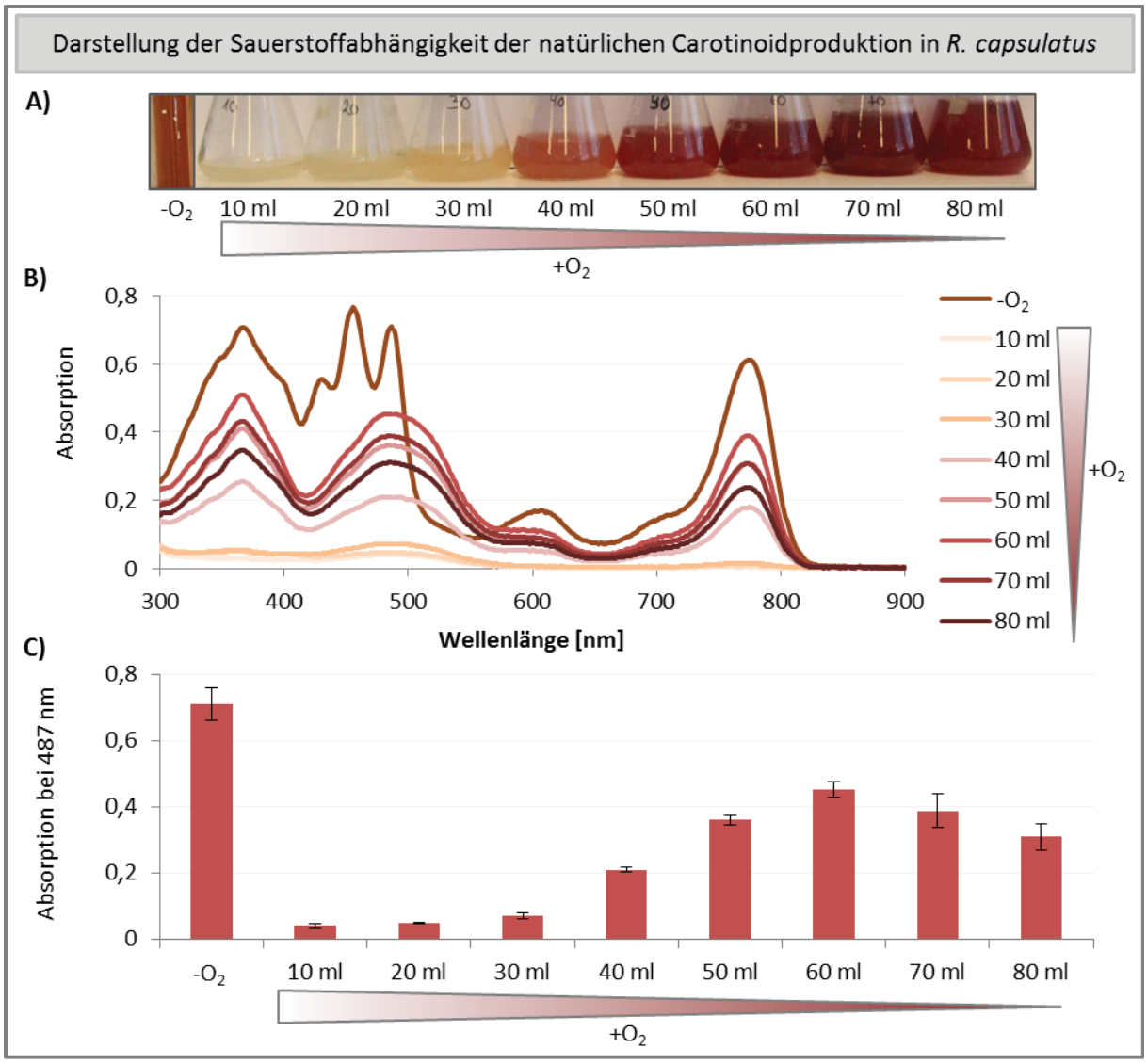

Abb. 12. Darstellung der Sauerstoffabhängigkeit der natürlichen Carotinoidproduktion in *R. capsulatus*.
Es sind beispielhaft *R. capsulatus* SB1003 Kulturen gezeigt (**A**), die unter phototrophen (-O_2, Hungate) und (mikro-)aeroben Bedingungen (+O_2, 10 - 80 ml, 100 ml-Erlenmeyer-Kolben) in RCV-Medium inkubiert wurden. Mit erhöhtem Füllvolumen sank der Sauerstoffgehalt in den Kulturen, was mit einer vermehrten Pigmentierung einhergeht. In **B** sind die Absorptionsspektren von Ethanolextrakten aus Zellproben (normiert zu $OD_{660\ nm}$ = 1) von 300 -900 nm zu den beispielhaften Kulturen und in **C** die entsprechenden Absorptionen der Carotinoidmaxima (487 nm) der jeweiligen Dreifachbestimmungen mit der zugehörigen Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt.

Die Messdaten legen nahe, dass sowohl die Carotinoid- als auch die Bacteriochlorophyll a-Absorption unter anaeroben Bedingungen am höchsten waren. Zwar sind die Extinktionskoeffizienten der unterschiedlichen Carotinoide bei der gewählten Wellenlänge in Ethanol nicht bekannt, aber da sie in anderen Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Petrolether bei den jeweiligen Maxima Extinktionskoeffizienten in derselben Größenordnung aufweisen (Goodwin *et al.*, 1956), konnte dennoch abgeschätzt werden, dass der Carotinoidgehalt unter anaeroben Bedingungen deutlich über den maximalen Mengen bei aeroben Bedingungen lag. Dieses Ergebnis deckt sich mit Resultaten aus der Literatur, in der u.a. beschrieben wurde, dass der Wechsel von aeroben Wuchsbedingungen im

Dunkeln zu anaeroben Wuchsbedingungen im Licht zu einer Steigerung der Carotinoidakkumulation führt (Golecki *et al.*, 1980; Kaufmann *et al.*, 1982). Dies liegt daran, dass unter photoheterotrophen Bedingungen die Energieversorgung über anoxygene Photosynthese gewährleistet wird, dafür werden die Gene des Photosynthesekomplexes und der Photopigmentbiosynthese durch die Abwesenheit von Sauerstoff hochreguliert, sodass der Gehalt an Carotinoiden und Bacteriochlorophyll a signifikant zunimmt (**1.2.1**).

Zur besseren Veranschaulichung, wie sich der Carotinoidgehalt in Abhängigkeit vom Sauerstoffeintrag in den (mikro-)aeroben Kulturen verhielt, wurden die Absorptionen der Carotinoidmaxima bei 487 nm der einzelnen Kulturen im Diagramm **C** in **Abb. 12** dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Pigmentgehalt mit steigender Füllhöhe bzw. abnehmendem Sauerstoffgehalt zunahm, was auch optisch beobachtet werden konnte. Bei einem Füllvolumen von 40 ml schien die Sauerstoffkonzentration unter eine Art Schwellenwert zu fallen, denn ab diesem Volumen stieg die Absorption der Carotinoide deutlich (2,9-fach) an und erreichte bei 60 ml seinen Höchstwert. Das Phänomen, dass die Carotinoidakkumulation bei Abnahme der Sauerstoffkonzentration in einer im Dunkeln wachsenden Kultur zunimmt, wurde ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben (Schumacher & Drews, 1978; Biel & Marrs, 1985). Ab einer Füllhöhe von 70 ml sank der Carotinoidgehalt wieder etwas ab. Dies könnte daran liegen, dass diese Bedingungen für die Zellen nicht mehr optimal waren. Es befand sich vermutlich zu wenig Sauerstoff in den Kulturen für eine ausreichende Energieversorgung durch aerobe oder anaerobe Atmung und es stand keine Lichtquelle zur Verfügung zur Energiegewinnung aus anoxygener Photosynthese. Diese Annahme könnte durch die gleichzeigig beobachteten abnehmenden Zelldichten unterstützt werden (**Anhang, 8.4.1**).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass unter anaerob photoheterotrophen Bedingungen die Carotinoidakkumulation am größten ist. Aus diesem Grund sollte die Vorstufensynthese unter diesen Bedingungen am höchsten sein, was für eine optimale heterologe Produktion von Terpenen ausschlaggebend ist.

Allerdings ist für Fälle, in denen Sauerstoff für die Produktion eines bestimmten Terpenoids, wie zum Beispiel Spheroidenon, benötigt wird, die mikroaerobe Kultivierung mit einem Füllvolumen von 60 ml am besten geeignet.

3.1.2 Sauerstoffabhängigkeit des *nif*-basierten Promotor-Systems

Sauerstoff ist ein wichtiger Umweltfaktor, der in *R. capsulatus* die Regulation vieler relevanter Prozesse einschließlich der Photopigmentbiosynthese und Stickstofffixierung beeinflusst. Für den Einsatz von *R. capsulatus* als Expressionswirt ist dies insofern besonders von Bedeutung, als dass der

Promotor, der natürlicherweise die Expression des *nifHDK*-Operons reguliert, zur Expression heterologer Gene eingesetzt werden kann (Malach, 2013; Özgür, 2015). Primär wird dieser Promotor unter NH_4^+-limitierenden Bedingungen dereprimiert (Hübner *et al.*, 1991). Bekannt ist aber auch, dass in Anwesenheit von Sauerstoff (Kranz & Haselkorn, 1986) die Aktivierung der Genexpression unter Kontrolle des *nifHDK*-Promotors (P_{nif}) nicht stattfinden kann (**1.2.2**). Dies kann zum Beispiel problematisch sein, wenn für spezifische Reaktionen molekularer Sauerstoff benötigt wird, wie es bei der Umsetzung von Spheroiden zu Spheroidenon der Fall ist. Aus diesem Grund wurde anschließend der Einfluss von steigenden Gelöstsauerstoffkonzentrationen auf die Genexpression unter Kontrolle des *nifHDK*-Promotors im Vergleich zu strikt anaerober Kultivierung untersucht. Um den Einfluss von molekularem Sauerstoff auf die Induktion des P_{nif} quantifizieren zu können, wurde das Gen verwendet, das für das Reporterprotein EYFP kodiert. Dessen Akkumulation kann als Maß für die Promotoraktivität leicht immunologisch und durch Fluoreszenzspektrometrie nachgewiesen werden. Dazu wurde das Gen in den Vektor pRhon5Hi-2 kloniert und anschließend unter Kontrolle des *nif*-Promotors exprimiert. Um den Einfluss bei unterschiedlicher (mikro-)aerober und anaerober Bedingungen auf die P_{nif}-basierte Zielgenexpression bewerten zu können, wurde *eyfp* ebenfalls mit dem Expressionsvektor pRhokHi-2 exprimiert, dessen Zielgenexpression unter Kontrolle des konstitutiven Promotors des Kanamycin-Resistenzgens *aphII* liegt.

Die Vektoren pRhokHi-2-e*yfp* und pRhon5Hi-2-e*yfp* wurden erzeugt, indem das Reportergen e*yfp* mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Hind*III in die *multiple cloning site* der Leervektoren pRhokHi-2 und pRhon5Hi-2 kloniert (**2.7.4 + 2.7.5**) wurde. Nach der Verifizierung der Konstrukte (**2.7.9**) wurden die Vektoren mittels Konjugation in *R. capsulatus* SB1003 eingebracht (**2.7.7**). Nach einer zweitägigen Vorkultivierung (**2.8.1.2**), sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen (**2.8.1.2**), konnten die Hauptkulturen angesetzt werden. Dafür wurde Serin-haltiges RCV-Medium (**2.8.1.2, Tab. 12**) verwendet, da die Zielgenexpression unter Kontrolle des *nifHDK*-Promotors nur unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen, also in Abwesenheit von Ammonium induziert wird. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Kulturen mit dem pRhokHi-2 Vektor ebenfalls in Serin-haltigem Medium inkubiert. Die Hauptkulturen wurden jeweils mit den entsprechenden Vorkulturen auf eine $OD_{660\,nm}$ von 0,05 inokuliert. Für die Kultivierung unter anaeroben Bedingungen fand die Kultivierung in Hungates unter kontinuierlicher Belichtung statt. Um eine Kultivierung mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen zu erreichen, wurden 100 ml Erlenmeyer-Kolben mit Medium unterschiedlicher Volumina befüllt, wie es auch schon in dem Experiment zur Sauerstoffabhängigkeit der Carotinoidproduktion in *R. capsulatus* durchgeführt wurde (**3.1.1**). Nach einer 48-stündigen Kultivierung unter anaerob photoheterotrophen und (mikro-) aerob chemotrophen Bedingungen wurden jeweils zwei Proben (Zellen einer $OD_{660\,nm} = 1$ entsprechend) entnommen (Zelldichten siehe **Anhang, 8.4.2**). Anschließend wurden die Zellen des

ersten Proben-Sets als Ganzzellextrakt, in dem alle Zellbestandteile und Proteine beinhaltet waren, zum immunologischen Nachweis (**2.9.3 + 2.9.4**) für den Einfluss von O_2 auf die EYFP-Akkumulation verwendet. Das zweite Probenset wurde aufgeschlossen und fraktioniert. Die so erhaltenen Fraktionen, die die löslichen Zellbestandteile und Proteine beinhalteten, wurden nach 2 h Inkubation für die spektroskopische Fluoreszenzmessung (**2.10.3**) eingesetzt.

In **Abb. 13** sind die EYFP-Akkumulation (**A**) und die EYFP-Fluoreszenz (**B**), die unter entsprechenden Bedingungen erhalten wurden, als Maß für die O_2-abhängige P_{nif}-Aktivität vergleichend dargestellt.

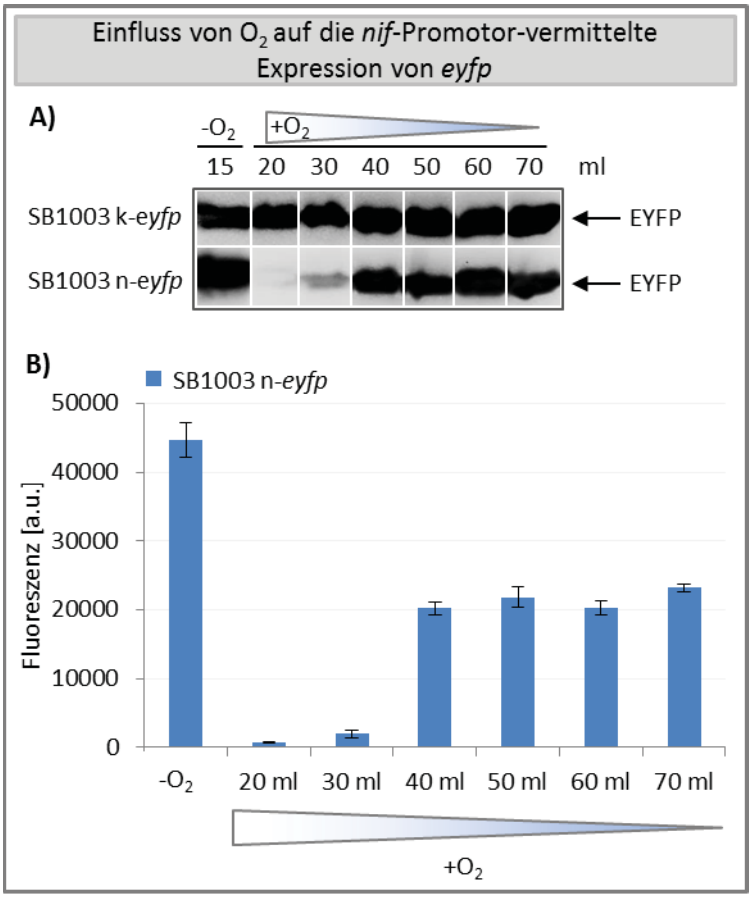

Abb. 13. Einfluss von O_2 auf die *nif*-Promotor-vermittelte Expression von *eyfp*.
Es sind sowohl die EYFP-Akkumulation (**A**) von Ganzzellextrakten (Zellen normiert auf $OD_{660\,nm} = 1$) von *R. capsulatus* Kulturen SB1003 pRhokHi-2-*eyfp* und pRhon5Hi-2-*eyfp* als auch die EYFP-Fluoreszenz (**B**) der löslichen Fraktion von Zellproben (normiert zu $OD_{660\,nm} = 1$) der *R. capsulatus* Kulturen SB1003 pRhon5Hi-2-*eyfp* unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen gezeigt. Die Bedingungen variieren von strikt anaeroben (-O_2, Licht) bis (mikro-) aeroben Bedingungen (+O_2; 20 – 70 ml, im Dunkeln), wobei die Gelöst-sauerstoffkonzentration im Medium von 20 ml zu 70 ml Füllvolumen sinkt. Die gezeigten Western Blot Ergebnisse (**A**) stellen für drei unabhängige Experimente repräsentative Ergebnisse dar. Im Fall der EYFP-Fluoreszenzwerte (**B**) (Anregung: 488 nm, Emission:527 nm) sind die Emissionsmittelwerte dieser Replikate sowie die zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt.

Die Zellen mit dem Vektor pRhokHi-2 (hellblau) wurden als Kontrolle herangezogen, um zu untersuchen inwieweit die Anzuchtbedingungen die Aktivität und Mengen des akkumulierten EYFPs beeinflussen. Die Analyse der Proteinakkumulation zeigte deutliche Signale mit gleichbleibender Stärke sowohl unter anaeroben (-O_2, Licht) als auch (mikro-)aeroben Bedingungen bei unterschiedlichen Füllvolumina (+O_2, im Dunklen) (**Abb. 13, A**), was bedeutet, dass die Kultivierungsbedingungen keinen Einfluss auf die Aktivität und Menge des akkumulierten EYFPs haben und somit eine qualitative Aussage über die Auswirkungen von O_2 auf die Aktivität des P_{nif} getroffen werden kann.

Für das *nif*-System konnte beobachtet werden, dass die EYFP-Akkumulation unter anaeroben Bedingungen am höchsten war (**Abb. 13, A**), ebenso wie auch die EYFP-Fluoreszenz (**B**). Bei Verwendung von Füllvolumina von 20 – 40 ml konnte die Proteinakkumulation durch die Abnahme der Gelöstsauerstoffkonzentration von keiner (20 ml) zu einer deutlich sichtbaren Akkumulation, gesteigert werden, die jedoch maximal der Hälfte der unter anaeroben Bedingungen erreichten Proteinakkumulation entsprach. Durch eine weitere Abnahme der Gelöstsauerstoffmenge durch Zunahme des Füllvolumens konnte keine weitere, signifikante Steigerung der EYFP-Akkumulation erreicht werden. Somit schien auch in diesem Experiment die Gelöstsauerstoffkonzentration, die bei einer Füllhöhe von 40 ml vorhanden war, eine Art Schwellenwert zu bilden, wie es auch in den Ergebnissen in Kapitel **3.1.1** für die Untersuchung der Sauerstoffabhängigkeit der Carotinoidproduktion in *R. capsulatus* festgestellt werden konnte. Unter Zuhilfenahme der Fluoreszenzdaten zeigt sich, dass die Verwendung von 40 ml Medium zu einer 10-fachen Steigerung der Induktion der EYFP-Expression führte, die tatsächlich nur der Hälfte der unter anaeroben Bedingungen erreichten entspricht. Dies bedeutet dennoch, dass die Zielgenexpression unter Kontrolle des P_{nif} unter Anwesenheit von O_2 induziert ist, was seine Verwendung für Terpenoidsynthesen, die auf die Anwesenheit von O_2 angewiesen sind, ermöglicht.

Zu Beginn dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Physiologie von *R. capsulatus* einen großen Einfluss auf die intrinsische Terpensynthese und Induktion des ***nifHDK*-Promotors** hat. Beide Prozesse sind unter phototrophen Bedingungen (-O_2, Licht) maximal induziert. Unter chemoheterotrophen Bedingungen (variable O_2-Verfügbarkeit, im Dunklen) führt die zunehmende Verknappung von Sauerstoff zu einer steigenden Akkumulation von Zielproteinen (EYFP) und Tetraterpenoiden (Carotinoide). Somit kann das *R. capsulatus*-basierte Expressionssystem mit pRhon5Hi-2 als Expressionsvektor grundsätzlich sowohl unter phototrophen (-O_2) als auch mikroaeroben Kultivierungsbedingungen für die Produktion von Terpenoiden eingesetzt werden.

3.2 Heterologe Terpensynthese in *R. capsulatus*

In den Kapiteln zuvor wurden bereits die Voraussetzungen auf Grundlage der Zellphysiologie von *R. capsulatus* für eine hohe Terpenproduktion evaluiert. Unter den definierten Kultivierungsbedingungen wurden anaerob phototrophe Bedingungen als Parameter identifiziert, die zur höchsten Akkumulation der Carotinoide und P_{nif}-Aktivität geführt haben. Nun stellt sich die Frage, ob *R. capsulatus* auch für die effiziente Produktion von heterologen Terpenoiden eingesetzt werden kann. Dies sollte am Beispiel der Patchoulolsynthase aus *P. cablin* in dieser Arbeit untersucht werden.

3.2.1 Einfluss der Promotorstärke und Wahl des Mediums auf die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus*

Im Hinblick auf die heterologe Terpenproduktion gibt es mehrere Ansatzpunkte, um diese zu verbessern. Auf der einen Seite kann es zum Beispiel durch die Wahl des Mediums zu einer gesteigerten Biomasse kommen, was zu einem Anstieg der Terpenoidproduktion führen könnte. Auf der anderen Seite sollte eine bessere Expression und Akkumulation der Terpensynthase selbst ebenfalls zu einer Verbesserung führen. Dies könnte zum Beispiel durch die richtige Wahl des Expressionsvektors erreicht werden, wie es schon durch Armagan Özgür (2015) bei der Akkumulation heterloger Membranprotein in *R. capsulatus* gezeigt werden konnte. Für *R. capsulatus* wurden bereits erfolgreich die Vektoren pRhokHi-2, pRhotHi-2 und pRhon5Hi-2 (vgl. **1.2.2, Abb. 4**) für verschiedene Anwendungen verwendet (Heck, 2008; Katzke *et al.*, 2010; Malach, 2013; Gora, 2015; Özgür, 2015; Weber, 2016). Die Expression eines Zielgens steht bei pRhokHi-2 unter Kontrolle des konstitutiven Promotors P_{aphII}, und bei pRhon5Hi-2 unter Kontrolle des Stickstoff- und Sauerstoff-regulierten Promoters P_{nif}. Im Fall von pRhotHi-2 wird der T7 RNA-Polymerase Promoter P_{T7} verwendet. Da bekannt ist, dass diese Promotoren eine unterschiedlich starke Zielgenexpression ermöglichen, sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Patchoulolsynthase aus *P. cablin* vergleichend in den verschiedenen entsprechenden Vektoren exprimiert werden, um den Einfluss der Promotorstärke auf die Patchoulolproduktion mit dieser spezifischen Synthase zu evaluieren. Da diese Vektoren auf demselben Grundvektor basieren und sich nur durch die Promotoren unterscheiden, unter deren Kontrolle sich die Expression des Zielgens befindet, besitzen sie alle die gleiche *multiple cloning site*, was in dieser Arbeit die Anwendung einer analogen Klonierungsstrategie für die zu exprimierenden Gene erlaubte.

Als erstes wurde die kodonoptimierte Gensequenz (**Anhang, 8.1.1**), die die Patchoulolsynthase (PatS) aus *P. cablin* kodiert, in die jeweiligen pRho-Vektoren eingebracht (vgl. **Abb. 16**). Dafür wurden der Synthesevektor pEX-K4-*PatS* (MWG), der die kodonoptimierte *PatS* Gensequenz beinhaltete, und pRhon5Hi-2 mittels der Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Hind*III hydrolysiert (**2.7.4**) und anschließend ligiert (**2.7.5**). Nach der Verifizierung der korrekten Gensequenz wurden die neu entstandenen Expressionsvektoren als pRhon5Hi-2-*PatS*, pRhokHi-2-*PatS* und pRhotHi-2-*PatS* bezeichnet.

In diesem ersten Experiment sollte also auf der einen Seite untersucht werden, ob *R. capsulatus* durch Expression der PatS aus *P. cablin* Patchoulol produzieren kann. Auf der anderen Seit sollte evaluiert werden, ob sich die Promotorstärke ausgewählter Expressionsvektoren und die Verwendung verschiedener Medien auf die heterloge Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* auswirkt. Dazu wurden die verschiedenen Expressionsvektoren pRhokHi-2-*PatS*, dessen

Zielgenexpression konstitutiv verläuft, pRhon5Hi-2-*PatS*, dessen Zielgenexpression durch die Abwesenheit von Ammonium induziert wird und pRhotHi-2-*PatS*, dessen Zielgenexpression in *R. capsulatus* SB1003-T7 durch die Zugabe von 8 mM Fruktose induziert wird, verwendet. Als Medien wurden sowohl das Serin-haltige Minimalmedium RCV als auch die zwei Vollmedien RCV 2/3 PY und VN getestet, um zu überprüfen, ob eine gesteigerte Biomasse zu höheren Patchoulolausbeuten führt. Die Kultivierungen fanden unter anaerob, phototrophen Bedingungen statt, da unter diesen Bedingungen in vorherigen Experimenten, die höchste Carotinoidakkumulation und höchste P_{nif}-abhängige Zielgenexpression beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in **Abb. 14** dargestellt.

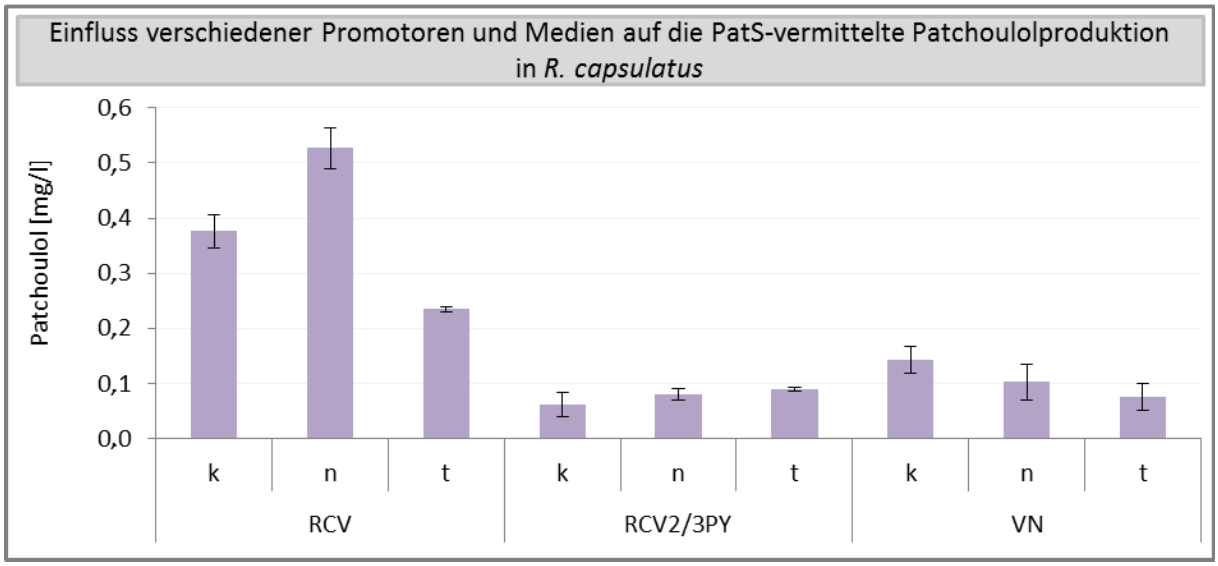

Abb. 14. Einfluss verschiedener Promotoren und Medien auf die PatS-vermittelte Patchoulolproduktion in *R. capsulatus*.
Für die Expression der Patchoulolsynthase aus *P. cablin* wurden die Expressionsvektoren pRhokHi-2-*PatS* (k), pRhon5Hi-2-*PatS* (n) und pRhotHi-2-*PatS* (t) eingesetzt. Um den Einfluss verschiedener Minimal- und Vollmedien auf die Produktion von Patchoulol in *R. capsulatus* analysieren zu können, wurde zum einen das Minimalmedium RCV sowie die Vollmedien RCV 2/3 PY und VN verwendet. Die Kultivierung verlief unter anaerob phototrophen Bedingungen. Die Bestimmung der Patchoulolausbeute erfolgte mittels GC von n-Dodecan, mit dem die Kulturen überschichtet waren. Dargestellt sind die Patchoulol-Ausbeuten (mg/l) als Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Vollmedien (RCV 2/3 PY und VN) im Vergleich zum Minimalmedium (RCV) für die Produktion von Patchoulol schlechter geeignet sind, da die Patchoulolkonzentration deutlich niedriger war, als unter Verwendung des RCV-Mediums. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Kulturen, die in den Vollmedien inkubiert wurden, deutlich schneller höhere Zelldichten erreichten (vgl. **Anhang, 8.4.3**). Vermutlich verschlechterte sich dadurch die heterologe Expression der Terpensynthase in Zellen, die sich durch ein Überangebot an Nährstoffen sehr schnell teilten.

Bemerkenswerterweise führte auch die Verwendung des *nif*-basierten Expressionssystems (n) in den Vollmedien zu einer Produktion an Patchoulol, obwohl der *nifHDK*-Promotor nur unter Stickstoffmangelbedingungen aktiviert wird. Vermutlich ist eine Patchoulolproduktion erkennbar, da die Kultivierung über fünf Tage erfolgte und sich die Kulturen nach schon etwa zwei Tagen in der stationären Phase befanden und somit die das *nif*-System reprimierende Stickstoffquelle Ammonium bereits aufgebraucht war, was zu einer Induktion der Expression der Patchoulolsynthase und folglich zu einer Produktion von Patchoulol führte. Unter Verwendung des Serin-haltigen RCV-Mediums (Stickstoffmangelbedingung) ist im Gegensatz dazu eine eindeutige Aktivierung des *nifHDK*-Promotors des pRhon5Hi-2-*PatS*-Vektors zu erkennen, denn die Patchoulolproduktion ist im Vergleich zu den Ausbeuten unter Verwendung der Vollmedien deutlich erhöht (3,8-fach).

Beim Vergleich der verschiedenen Expressionsvektoren untereinander in RCV-Medium zeigte sich, dass die PatS-Expression mit dem stärksten Promotor P_{nif} (Özgür, 2015), auch die höchste Patchoulolausbeute (0,53 mg/l) erzielte. Allerdings produzierte das konstitutive System (k) eine höhere Patchoulolmenge, nämlich 72 % (0,38 mg/l) der *nif*-System-erzeugten Menge, während das T7-System (t) nur 43 % (0,23 mg/l) des bisherigen Maximalwertes von 0,53 mg/l erreichte. Dieses Ergebnis war unerwartet, da Untersuchungen mit Hilfe des Reporterproteins EYFP in dem Stamm *R. capsulatus* B10S(-T7) in vorangegangenen Arbeiten gezeigt hatten, dass das T7-System im Vergleich zum konstitutiven System eine stärkere Proteinexpression erlaubt (Katzke *et al.*, 2010; Özgür, 2015). Allerdings kann von dem Expressionserfolg und der erreichten Akkumulation von einem speziellen Protein nicht direkt auf die eines anderen Proteins geschlossen werden. Dennoch konnte auch in diesem Fall gezeigt werden, dass sich das *nif*-System, wie bereits in einem anderen Kontext beschrieben (Özgür, 2015), als die beste Wahl für die Expression eines Proteins bzw. die Produktion von Patchoulol herausgestellt hat.

Es konnte gezeigt werden, dass *R. capsulatus* in der Lage ist das heterologe Terpenoid Patchoulol durch die Expression der **Patchoulolsynthase (PatS) aus *P. cablin*** zu produzieren. Außerdem stellte sich heraus, dass sich sowohl die Wahl des Mediums als auch die Promotorstärke des ausgewählten Expressionsvektors auf die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* auswirkt. Minimalmedium (**Serin-haltiges RCV**) war im Gegensatz zu verschiedenen Vollmedien besser geeignet. Außerdem konnte in diesem Medium mit dem Vektor **pRhon5Hi-2-*PatS***, dessen Zielgenexpression unter Kontrolle des sehr starken *nifHDK*-Promotors liegt, die höchste Patchoulolausbeute von bisher **0,53 mg/l** erreicht werden. Darum werden in allen weiteren Versuchen Serin-haltiges RCV-Medium und der Expressionsvektor pRhon5Hi-2 als Basis für die Produktion von Patchoulol verwendet.

3.2.2 Optimierung der Patchoulolproduktion durch *metabolic engineering*

Durch die einfachste Strategie, nämlich durch die heterologe Expression eines einzelnen Terpensynthase-Gens konnten in *R. capsulatus* unter Verwendung von RCV-Minimalmedium und einem P_{nif}-basierten Expressionssystems unter anaerob phototrophen Bedingungen bereits 0,53 mg/l Patchoulol erzeugt werden. Da es sich hierbei allerdings nicht um biotechnologisch relevante Mengen handelte, sollten verschiedene Optimierungsstrategien angewendet werden, um eine Steigerung der Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* zu erreichen.

Für eine effiziente Produktion wirtsfremder Terpene ist eine ausreichende Verfügbarkeit von Vorläufermolekülen wie FPP ausschlaggebend. Diese kann grundsätzlich durch eine Veränderung der Terpenbiosynthese durch *metabolic engineering*, die letztendlich zu einer vermehrten Bereitstellung der benötigten Vorläufermoleküle führen soll, geschehen. Für eine verbesserte heterologe Terpenproduktion wurde daraufhin zunächst ein allgemeines Konzept zur systematischen Optimierung entworfen, welches anschließend in *R. capsulatus* angewendet und im Bezug auf seine Auswirkungen bewertet werden sollte.

3.2.2.1 Strategien zur Optimierung der heterologen Terpenproduktion in *R. capsulatus*

Es gibt bereits verschiedene Studien mit Strategien zur Optimierung der heterologen Terpenproduktion, durch die in anderen Mikroorganismen eine Steigerung der jeweiligen Terpenproduktion erreicht werden konnte (**1.2**). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, inwieweit diese Herangehensweisen entsprechend ihrer Ansatzpunkte in der Terpenbiosynthese in ein *engineering*-Modul-Konzept eingegliedert werden können, um in dem phototrophen Bakterium die Ausbeuten zu erhöhen (**Abb. 15**).

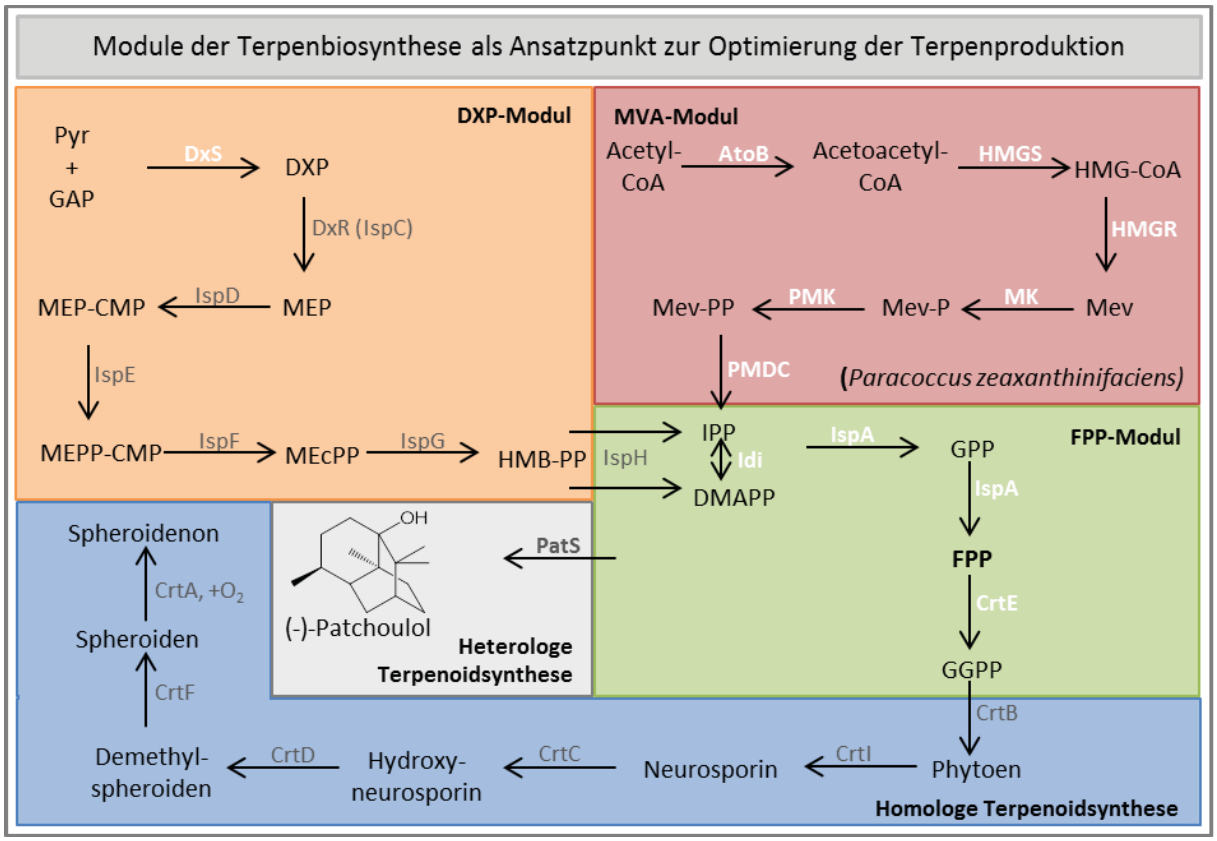

Abb. 15. Module der Terpenbiosynthese als Ansatzpunkt zur Optimierung der Terpenproduktion in *R. capsulatus*.

Die einzelnen Abschnitte der Biosynthese von homologen und heterologen Terpenen wurden in Module eingeteilt, die für die in dieser Arbeit verfolgten Optimierungsstrategien relevant sind. Die Isoprenoid-Biosynthesewege DXP (homolog) und MVA (heterolog) sind orange und rot hinterlegt. Die Reaktionen zur Umwandlung der Isoprenoide IPP und DMAPP in die direkten Vorstufen (GPP, FPP, GGPP) der einzelnen Terpenklassen wurden im FPP-Modul (grün) zusammengefasst. Die homologe Tetraterpenoidsynthese ist blau und die heterologe Terpenoidsynthese, in diesem Fall das Sesquiterpen Patchoulol, ist grau hinterlegt. Weiß hervorgehoben sind die in dieser Arbeit adressierten Biosyntheseschritte.

Pyr: Pyruvat; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; DXP: 1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphat; MEP: 2-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat; MEP-CMP: 2-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Cytidylmonophosphat; MEPP-CMP: 2-Methyl-D-Erythritol-2,4-Phosphat-Cytidylmonophosphat; MEcPP: 2-Methyl-D-Erythritol-2,4-cylo-Pyrophosphat; HMB-PP: 1-Hydroxy-2-Methyl-2-Butenylpyrophosphat; HMG-CoA: β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA; Mev: Mevalonat; Mev-P: Mevalonat-5-Phosphat; Mev-PP: Mevalonat-5-Pyrophosphat; DMAPP: Dimethylallylpyrophosphat; IPP: Isopenteylpyrophosphat; GPP: Geranylpyrophosphat; FPP: Farnesylpyrophosphat; GGPP: Geranylgeranylpyrophosphat; DxS: DXP-Synthase DxR (IspC): DXP-Reduktoisomerase; IspD: MEP-Cytidyltransferase; IspE: MEP-CMP-Kinase; IspF: MEcPP-Synthase; IspG: HMP-PP-Synthase; IspH: HMB-PP-Reduktase; AtoB: Acetoacetyl-CoA-Thiolase; HMGS: HMG-CoA-Synthase; HMGR: HMG-CoA-Reduktase; MK: Mevalonatkinase; PMK: Mev-P-Kinase; PMDC: Mev-PP-Decarboxylase; Idi: Isopentenylisomerase IspA: FPP-Synthase; CrtE: GGPP-Synthase; CrtB: Phytoensynthase; CrtI: Phytoendesaturase, CrtC: Hydroxyneurosporinsynthase, CrtD: Methoxyneurosporindehydrogenase, CrtF: Hydroxyneurosporin-O-Methyltransferase, CrtA: Spheroidenmonooxygenase

Zur heterologen Produktion eines Sesquiterpens, hier Patchoulol (grau hinterlegtes Modul), bildet Farnesylpyrophosphat (FPP) (grün hinterlegtes Modul) das direkte Vorläufermolekül. Die offensichtlichste Strategie zur Produktionssteigerung ist die direkte Erhöhung der FPP-Akkumulation, welche auf zwei Wegen erreicht werden kann: (I) Durch die Erhöhung des Flusses hin zu FPP und (II) durch die Verlangsamung bzw. Unterbrechung der FPP-verbrauchenden Pfade zu wirtseigenen

Terpenoiden. Ersteres könnte prinzipiell durch eine zusätzliche Coexpression des Gens, welches für die FPPS kodiert, erreicht werden (Frohwitter *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2015). In *R. capsulatus* kodiert das *ispA*-Gen für die FPP-Synthase, die sowohl für die Erzeugung von Geranylpyrophosphat (GPP) aus den Isoprenoiden Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) sowie für dessen Umwandlung in FPP verantwortlich ist. Aufgrund der überschaubaren Größe des wirtseigenen *ispA*-Gens (915 bp) und der günstigen Gensequenz im Hinblick auf Schnittstellen für die Klonierungsstrategie wurde die wirtseigene FPP-Synthase für die Umsetzung dieser Strategie verwendet. Die zweite Strategie könnte durch Unterbrechung der natürlichen Terpenproduktion (blau hinterlegtes Modul) umgesetzt werden (Frohwitter *et al.*, 2014; Gora, 2015), um eine bessere Bereitstellung von FPP als Substrat für die Patchoulolsynthase (PatS) zur Umwandlung zu Patchoulol zur Verfügung zu stellen. Im Fall von *R. capsulatus* würde dies bedeuten, das Gen *crtE* zu deletieren (Δ*crtE*), welches für die Geranylgeranylpyrophosphatsynthase kodiert, die FPP in Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) umwandelt.

Eine weitere Herangehensweise zur Optimierung der Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* ist die Erhöhung der Akkumulation der Isoprenoid-Bausteine IPP und DMAPP als Vorläufer zu FPP, welche durch die Optimierung der Syntheseleistung des DXP-Wegs (orange hinterlegtes Modul) erreicht werden kann. Die Enzyme Deoxy-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (DxS) und Isopentenylpyrophosphat-Isomerase (Idi) bilden dabei die limitierenden Schritte (Kajiwara *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2000). Khan *et al.* (2015) konnten durch deren zusätzliche Coexpression bereits in *R. capsulatus* eine Steigerung von verschiedenen Triterpenen beobachten. Demnach könnte diese Strategie ebenfalls zu einer Verbesserung der Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* führen. Diese Form der Optimierung wird nachfolgend zum DXP-Modul zusammengefasst. Um den DXP-Weg in *R. capsulatus* verbessern zu können, wurde nicht wie bei *ispA* auf die wirtseigenen Gene zurückgegriffen. Da eine plasmidbasierte Expressionsstrategie anvisiert wurde, sollte so eine etwaige Instabilität des Plasmids aufgrund von sehr langen zum Chromosom homologen DNA-Sequenzen vermieden werden. Daher wurden Enzyme gesucht, die den *R. capsulatus*-eigenen möglichst ähnlich waren und eine ähnliche *codon usage* aufwiesen. *Rhodobacter sphaeroides* schien dafür perfekt geeignet zu sein. Da *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* jeweils zwei Kopien des *dxs* Gens besitzen (Hahn *et al.*, 2001), wurden alle vier Gene (*R. c.*: *dxs1* und *dxs2*; *R. s.*: *dxs* und *dxsA*) mit Hilfe des *Multiple Sequence Alignment Tools* von Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) sowohl auf DNA- als auch auf Aminosäuresequenz-Ebene miteinander verglichen (siehe **Anhang, 8.1**). Dabei zeigte sich, dass sich die Gene *dxs2* aus *R. capsulatus* und *dxs* aus *R. sphaeroides* am ähnlichsten sind. Für das Gen *idi* besitzt *R. capsulatus* ebenfalls zwei Gene, *R. sphaeroides* aber nur eins. Hierbei wurden ebenfalls die Sequenzen analysiert (siehe **Anhang, 8.3**), was zeigte, dass die Gene untereinander einen ähnlichen Verwandtschaftsgrad aufweisen. Zum Schluss wurden die Gene *dxs* (1914 bp) und *idi* (586 bp) aus

R. sphaeroides in Bezug auf die *R. capsulatus codon usage* analysiert (*Graphical Codon Usage Analyzers*) (**2.11**). Da sich herausstellte, dass die *codon usage* der natürlichen Sequenzen mit *R. capsulatus* kompatibel sind und die gewünschten Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierungsstrategie ausgewählt wurden, nicht in den natürlichen Sequenzen vorkommen, konnten diese ohne weitere Anpassung aus dem Genom von *R. sphaeroides* amplifiziert und für die Klonierung in den Expressionsvektor verwendet werden.

Eine zusätzliche Möglichkeit, um die Menge von IPP und DMAPP zu steigern, ist die Expression eines für *R. capsulatus* alternativen Isopren-Biosynthesewegs, des Mevalonat-Wegs (MVA-Modul). Das entsprechende Operon (6257 bp) aus *Paracoccus zeaxanthinifaciens* konnte bereits sehr erfolgreich in dem verwandten Organismus *R. sphaeroides* zur Produktionssteigerung von Valencen eingesetzt werden (Beekwilder *et al.*, 2014). In *R. capsulatus* könnte dies ebenfalls zu einer Produktsteigerung führen, zumal sich die FPP-Synthasen aus *P. zeaxanthinifaciens* und *R. capsulatus* sehr ähnlich sind (Hümbelin *et al.*, 2002). Dies spricht sehr dafür, dass sich die Expression des MVA-Operons ohne zusätzliche Kodonoptimierung in *R. capsulatus* durchführen lassen sollte und zu ähnlich guten Erfolgen führen könnte, wie schon in *R. sphaeroides*. Außerdem befanden sich in der Sequenz keine Schnittstellen, die für die Klonierungsstrategie relevant gewesen wären.

3.2.2.2 Konstruktion von Expressionsvektoren für eine optimierte heterologe Patchoulolproduktion in *R. capsulatus*

Um die Frage beantworten zu können, ob die Module (**3.2.2.1**) einzeln oder in Kombination zu einer Steigerung der Produktion wirtsfremder Terpene in *R. capsulatus* führen, müssen die entsprechenden den einzelnen Modulen zugeordneten Gene getrennt oder gemeinsam exprimiert werden. Auf Basis des zuvor erzeugten Vektors pRhon5Hi-2-*PatS* (**3.2.1**) wurden daher Vektoren erzeugt, die das *PatS* Gen und stromabwärts davon unterschiedliche Vorstufen-Biosynthesegene trugen. Dabei bildeten *PatS* und die stromabwärts liegenden Gene synthetische Operons, die unter Kontrolle desselben Promotors (P_{nif}) standen (**Abb. 16**).

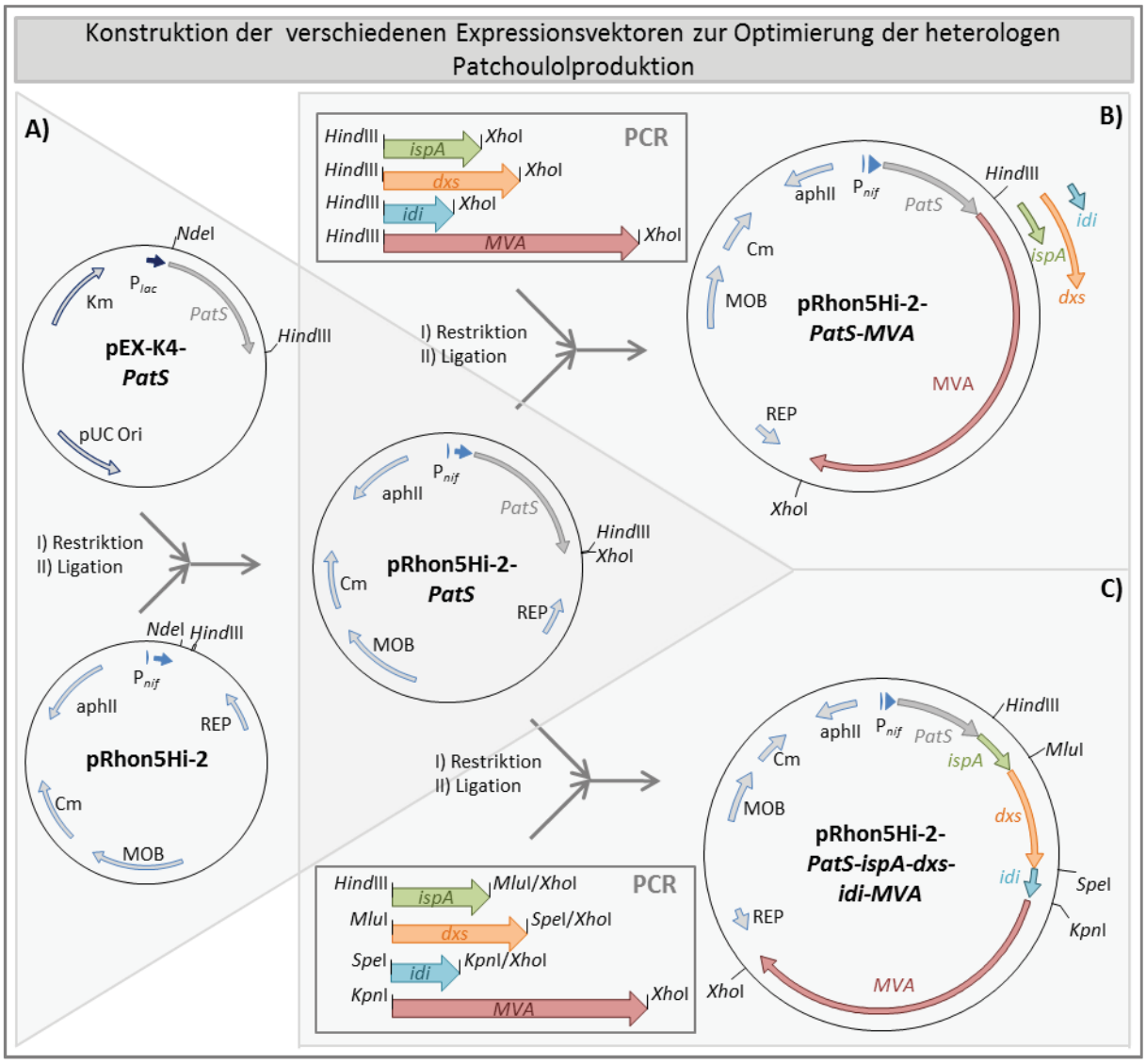

Abb. 16. Konstruktion der verschiedenen Expressionsvektoren zur Optimierung der heterologen Patchoulolproduktion.

In Abschnitt **A)** ist die Klonierung des Expressionsvektors pRhon5Hi-2-*PatS,* wie in **3.2.1** beschrieben, dargestellt durch die Hydrolyse des Ausgangsvektors mit dem synthetischen Gen (pEX-K4-*PatS*) und pRhon5Hi-2 mit *Nde*I und *Hind*III und der anschließenden Ligation der beiden Fragmente. In Abschnitt **B)** ist die Erzeugung der Vektoren pRhon5Hi-2-*PatS-ispA*, pRhon5Hi-2-*PatS-dxs*, pRhon5Hi-2-*PatS-idi* und pRhon5Hi-2-*PatS–MVA* gezeigt, indem der Expressionsvektor pRhon5Hi-2-*PatS* und die durch PCR erzeugten DNA-Fragmente *ispA*, *dxs*, *idi* und *MVA* mit *Hind*III und *Xho*I hydrolysiert und anschließend ligiert wurden. In **C)** ist die Herstellung des Vektors pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi-MVA* abgebildet. Dafür mussten zunächst pRhon5Hi-2-*PatS* und das PCR Produkt *ispA* mit *Hind*III und *Xho*I gespalten und die Fragmente anschließend ligiert werden. Im nächsten Schritt wurde der entstandene Vektor pRhon5Hi-2-*PatS-ispA* und das PCR-Produkt *dxs* mit *Mlu*I und *Xho*I hydrolysiert und danach ligiert. Im Anschluss wurde der so erzeugte Vektor pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs* und das PCR-Fragment *idi* mit *Spe*I und *Xho*I geschnitten und anschließend ligiert. Der neu entstandene Vektor pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi* und das PCR-Fragment *MVA* wurden zum Schluss mit *Kpn*I und *Xho*I hydrolysiert und die Fragmente danach ligiert. Daraus resultierte der Expressionsvektor pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi-MVA*.
Legende: Km und aphII: Kanamycin-Resistenz; Cm: Chloramphenicol-Resistenz; MOB: Mobilitätskassette; REP und pUC Ori: Replikationsursprung; *ispA*: Farnesylpyrophosphatsynthase-Gen aus *R. capsulatus*; *dxs*; 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Synthase-Gen aus *R. sphaeroides*; *idi*: Isopentenylpyrophosphat-Isomerase-Gen aus *R. sphaeroides*; *MVA*: Gene des Mevalonat-Biosynthesewegs aus *P. zeaxanthinifaciens*

Um die Expressionsvektoren pRhon5Hi-2-*PatS-ispA*, pRhon5Hi-2-*PatS-dxs*, pRhon5Hi-2-*PatS-idi* und pRhon5Hi-2-*PatS-MVA* herzustellen (**Abb. 16, B**), wurden zunächst die Gene *ispA* aus dem Genom von *R. capsulatus*, *dxs* und *idi* aus dem Genom von *R. sphaeroides* und der vollständige Biosyntheseweg *MVA* aus dem Genom von *P. zeaxanthinifaciens* mittels PCR (**2.7.1**) und entsprechenden Oligonukleotiden (**2.3, Tab. 3**) amplifiziert. Nach der PCR waren durch die Wahl der Oligonukleotid-Sequenzen die Genfragmente von spezifischen Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Xho*I flankiert. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Hilfe der entsprechenden Restriktionsendonukleasen in pRhon5Hi-2-*PatS* kloniert.

Für die Erzeugung von Expressionsvektoren, auf denen die Gene *ispA*, *dxs*, *idi* und *MVA* gemeinsam liegen, wurde folgendermaßen verfahren (**Abb. 16, C**): Zunächst wurden wieder die Gene *ispA* aus dem Genom von *R. capsulatus*, *dxs* und *idi* aus dem Genom von *R. sphaeroides* und der vollständige Biosyntheseweg *MVA* aus dem Genom von *P. zeaxanthinifaciens* mittels PCR amplifiziert. In diesem Fall wurden allerdings andere Oligonukleotide (**2.3, Tab. 3**) verwendet, sodass *ispA* am 5‘-Ende durch die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonuklease *Hind*III und am 3‘-Ende durch die Sequenzen für *Mlu*I und *Xho*I, *dxs* durch die Erkennungssequenzen für *Mlu*I und *Spe*I/*Xho*I, *idi* durch die Sequenzen für *Spe*I und *Kpn*I/*Xho*I und der *MVA* Biosyntheseweg durch die Erkennungssequenzen für *Kpn*I und *Xho*I flankiert war. Um den Grundvektor pRhon5Hi-2-*PatS-ispA+* für sukzessive Klonierung dieser Elemente zu erhalten, wurde das PCR-Fragment *ispA* und pRhon5Hi-2-*PatS* mit *Hind*III und *Xho*I hydrolysiert und wie bei den Vektoren zuvor zusammengefügt. Nach Verifizierung der richtigen DNA Sequenz wurde für die Erzeugung des folgenden Expressionsvektors pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs* das PCR-Produkt *dxs* und der neu entstandene Vektor pRhon5Hi-2-*PatS-ispA+* mit den Restriktionsendonukleasen *Mlu*I und *Xho*I hydrolysiert und wie schon oben beschrieben ligiert. Um pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi* herzustellen, wurde pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs* und das zuvor amplifizierte PCR-Produkt *idi* mittels der Nukleasen *Spe*I und *Xho*I gespalten und die Fragmente anschließend zum gewünschten Vektor zusammengefügt. Zum Schluss wurde der Expressionsvektor pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi-MVA* hergestellt, in dem das *MVA*-PCR-Fragment und pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi* mit Hilfe der Endonukleasen *Kpn*I und *Xho*I hydrolysiert und im Anschluss die Fragmente ligiert wurden.

Die DNA-Sequenzen aller Expressionsvektoren wurden durch Sequenzierung (MWG) vor der weiteren Verwendung verifiziert.

3.2.2.3 Einfluss auf die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* durch *engineering* des FPP-Moduls

Nachdem sich die Verwendung des Expressionsvektors pRhon5Hi-2 mit dem *nif*-Promotor in RCV-Medium unter anaerob, phototrophen Anzuchtbedingung als die beste Kombination für die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* herausgestellt hat, sollte nun überprüft werden, ob die Ausbeute wirtsfremder Terpenoide durch *engineering* des FPP-Moduls gesteigert werden kann (**Abb. 17**). Im Einzelnen bedeutet dies, dass zum einen das Gen *ispA* aus *R. capsulatus*, das für die Farnesylpyrophosphatsynthase kodiert, plasmidbasiert (**3.2.2.2**) coexprimiert werden sollte (**Abb. 17, A**). IspA katalysiert die Kondensation von IPP mit DMAPP zu FPP über GPP. Die Frage war, ob die PatS-katalysierte Umsetzung von FPP zu Patchoulol durch diese Maßnahme gesteigert werden kann. Hierzu wurde der Expressionsvektor pRhon5Hi-2-*PatS-ispA* in *R. capsulatus* SB1003 eingebracht, eine anaerob phototrophe Kultivierung durchgeführt und anschließend die Patchoulol-Produktion durch GC-Analyse des n-Dodecan-Extrakts bestimmt, wie in **2.8.1.3** beschrieben.

Die Coexpression von *ispA* hatte tatsächlich einen positiven Effekt (**Abb. 17, B**). Die Patchoulolproduktion in dem *R. capsulatus* Stamm SB1003 pRhon5Hi-2-*PatS-ispA* war um das 9-fache höher (4,7 mg/l) als die durch die alleinige Expression der Synthase. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das natürliche FPP-Angebot in *R. capsulatus* ohne Optimierung nicht ausreichte, um die Syntheseleistung der Patchoulolsynthase voll auszunutzen. Um die FPP-Bereitstellung weiter zu verbessern, sollte überprüft werden, ob durch die zusätzliche Deletion des Geranylgeranylpyrophosphatsynthasegens (*crtE*) im *R. capsulatus* Genom zu einer weiteren Steigerung der Patchoulolausbeute führt. CrtE verstoffwechselt FPP zu Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), welches im Anschluss in mehreren Schritten zu den für die Photosynthese benötigten Pigmenten Spheroiden (unter strikt anaeroben Bedingungen) und Spheroidenon (in Anwesenheit von Sauerstoff) umgesetzt wird (**Abb. 17, A**). Die Frage war, ob die Deletion des *crtE* Gens ausreicht, um den FPP-Verbrauch zu unterbinden. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Interposonmutagenese eine *R. capsulatus* SB1003 Δ*crtE*-Mutante erzeugt (**2.8.3**). Durch die *crtE*-Deletion wurde die natürliche Carotinoidproduktion unterbunden, sodass *R. capsulatus* nicht mehr in der Lage war unter phototrophen Bedingungen zu wachsen. Aus diesem Grund mussten die Effekte der *crtE*-Deletion auf die Patchoulolproduktion unter mikroaeroben Bedingungen (**2.8.1.3**) untersucht werden. Dabei zeigten die Kulturen mit der *R. capsulatus* Δ*crtE*-Mutante eine tief grüne Farbe im Gegensatz zu der dunkelroten Kultur mit dem Wildtypstamm SB1003 (**Abb. 17, C, oben**). In beiden Stämmen wurde das Plasmid pRhon5Hi-2-*PatS-ispA* eingebracht, welches gegenüber der alleinigen *PatS*-Expression eine Verbesserung erbracht hatte und die Patchoulolsynthese vergleichend analysiert (**Abb. 17, C, unten**).

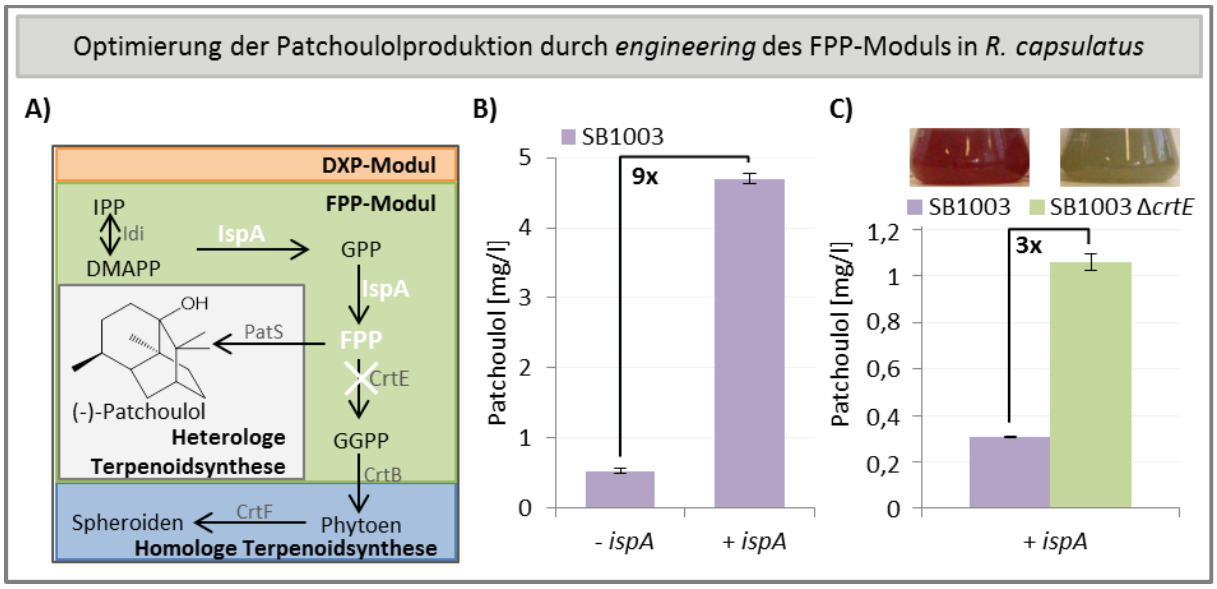

Abb. 17. Einfluss auf die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* durch *engineering* des FPP-Moduls.
Die heterologe Expression der Patchoulolsynthase (PatS) aus *P. cablin* erfolgte mit Hilfe des Expressionsvektors pRhon5Hi-2 in *R. capsulatus*. Es wurde der Effekt der Coexpression der Farnesylpyrophosphatsynthase (IspA), die in *R. capsulatus* sowohl für die Umwandlung von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) zu Geranylpyrophosphat (GPP) und im Weiteren für die Bildung von Farnesylpyrophosphat (FPP) verantwortlich ist (**A**) bei anaerober Kultivierung in RCV-Medium des Wildtyps *R. capsulatus* SB1003 untersucht (**B**). Zudem wurde bei Coexpression von *ispA* der Effekt der Deletion des Geranylgeranylpyrophosphatsynthase Gens (*crtE*), welches aus FPP Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) bildet (**A**), auf die Patchoulolproduktion unter mikroaeroben Bedingungen in RCV-Medium untersucht (**C**). Die Bestimmung der Patchoulolausbeute erfolgte mittels GC der n-Dodecan-Extrakte der Kulturen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und die zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken und der Faktor der erreichten Verbesserung.
Idi: Isopentenylisomerase, CrtB: Phytoensynthase; CrtF: Hydroxyneurosporin-O-Methyltransferase)

Es konnte gezeigt werden, dass die Unterbindung des natürlicherweise FPP-verbrauchenden Carotinoidbiosynthesewegs zu einer Steigerung der Patchoulolproduktion führte. Die Deletion von *crtE* führte bei Coexpression von *ispA* zu einem mehr als 3-fachen Anstieg von 0,3 mg/l auf 1 mg/l. Die Ausbeuten des *ispA*-coexprimierten *R. capsulatus* Wildtypstammes unter mikroaeroben Bedingungen (0,3 mg/l) waren allerdings deutlich schlechter (16-fache) als unter anaeroben Bedingungen (4,7 mg/l), sodass die durch *crtE*-Deletion vermittelte Steigerung (auf 1 mg/l) keine absolute Verbesserung darstellte, sondern noch rund 5-fach unter der anaerob erreichten Ausbeute lag. Dieses Ergebnis war nicht unerwartet, denn wie schon bei der Untersuchung zur Sauerstoffabhängigkeit des *nif*-basierten Expressionssystems (**3.1.2**) gezeigt wurde, war die Expressionsleistung unter mikroaeroben Bedingungen um etwas mehr als die Hälfte geringer als unter anaeroben. Außerdem kommt noch hinzu, dass unter mikroaeroben Bedingungen die Carotinoidproduktion (**3.1.1**) um ebenfalls etwa die Hälfte geringer war, sodass hier vermutlich deutlich weniger Vorstufen für die Produktion von FPP und somit auch weniger FPP-Moleküle der PatS für die Umwandlung zu Patchoulol zur Verfügung standen. Nichtsdestotrotz konnte durch die

Unterbrechung der natürlichen Carotinoidbiosynthese mittels *crtE*-Deletion in *R. capsulatus* eine deutliche Erhöhung der Patchoulolproduktion erzielt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass durch *engineering* des FPP-Moduls eine Steigerung der Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* möglich ist. Durch die P_{nif}-abhängige **Coexpression von *ispA*** konnte unter anaerob phototrophen Bedingungen in RCV-Medium eine **9-fache Steigerung** der Patchoulolausbeute auf **4,7 mg/l** und durch die **Deletion des *crtE* Gens** unter mikroaeroben Bedingungen eine **3-fache Erhöhung** erreicht werden.

Da die *R. capsulatus* Δ*crtE*-Mutante unter anaeroben Bedingungen nicht einsetzbar ist und die Patchoulolproduktion in SB1003 unter anaerob phototrophen Bedingungen um das 5-fache höher ist als in der Δ*crtE*-Mutante unter mikroaeroben Bedingungen, wurde sie für die Produkion von Patchoulol nicht weiter verwendet. Aber für Terpensynthesewege, die Sauerstoff benötigen, ist sie eine gute Möglichkeit, die Terpenproduktion zu steigern.

3.2.2.4 Auswirkungen auf die Patchoulolprodukion in *R. capsulatus* durch *engineering* des DXP- und MVA-Moduls

Wie eingangs erwähnt gibt es mehrere Ansatzpunkte, um die Terpenproduktion mittels *metabolic engineering* in *R. capsulatus* zu steigern (**3.2.2.1**). Im Kapitel zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass eine verbesserte FPP-Bereitstellung durch *engineering* des FPP-Moduls zu einer Steigerung der Patchoulolproduktion führte.

Mit den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die erhöhte Bereitstellung der Vorläufermoleküle IPP und DMAPP durch die Coexpression der Enzyme DxS und Idi (DXP-Modul), die für die entscheidenden Schritte im DXP-Biosyntheseweg (**1.1.1.2**) verantwortlich sind (Kajiwara *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 2000), zu einem Anstieg der Patchoulolkonzentration führt (**Abb. 18, A**). Eine weitere Herangehensweise, um die Bereitstellung von IPP und DMAPP zu steigern, ist das Einbringen des alternativen Mevalonat-Biosynthesewegs (**1.1.1.2**) (MVA-Modul), was schon bei Experimenten mit *R. sphaeroides* zu einer deutlichen Steigerung der heterologen Terpenproduktion geführt hat (Beekwilder *et al.*, 2014). Diese *metabolic engineering* Strategien wurden durch die Expression der Gene *dxs* und *idi* aus *R. sphaeroides* und des Mevalonat-Operons (*MVA*) (*atoB – idi*) aus *P. zeaxanthinifaciens* neben der Expression des *PatS* Gens, das für die Patchoulolsynthase aus *P. cablin* kodiert, mit den Expressionsvektoren pRhon5Hi-2-*PatS-dxs*, pRhon5Hi-2-*PatS-idi* und pRhon5Hi-2-*PatS-MVA* (**3.2.2.2**) in *R. capsulatus* SB1003 realisiert. Der *R. capsulatus* Stamm SB1003 pRhon5Hi-2-*PatS-ispA* wurde ebenfalls als interne Kontrolle kultiviert. Hierzu wurden die genannten

Vektoren in *R. capsulatus* SB1003 eingebracht und anaerobe Kultivierungen durchgeführt, woraufhin die Patchoulolproduktion, wie beschrieben (**2.8.1.3**), mittels GC analysiert wurde (**Abb. 18, B**).

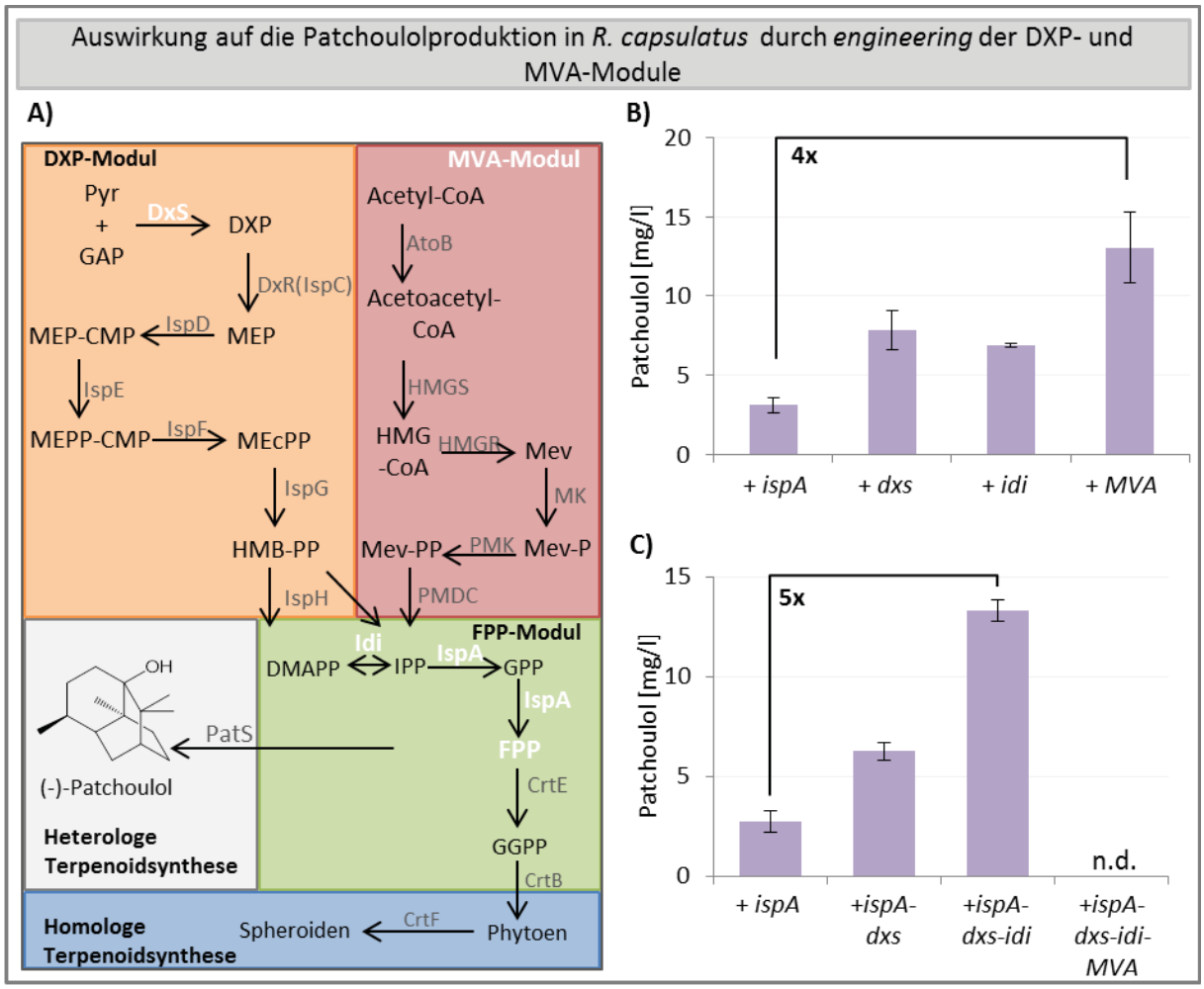

Abb. 18. Auswirkungen auf die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* SB1003 durch *engineering* der DXP- und MVA-Module.

Beim *engineering* im DXP-Modul (**A**) wurde neben der Expression der Patchoulolsynthase aus *P. cablin* die 1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase (DxS) und die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase (Idi) aus *R. sphaeroides* jeweils einzeln (**B,** *+dxs*; *+idi*), sowie auch in Kombination mit dem *ispA*-Gen aus *R. capsulatus* (*+ispA-dxs*; *+ispA-dxs-idi*) (**C**) im Vergleich zur einzelnen Coexpression von *ispA* (*+ispA*) plasmidbasiert exprimiert. Außerdem wurde das MVA-Operon aus *P. zeaxanthinifaciens* ebenfalls einzeln (**B**, *+MVA*), sowie auch in Kombination mit den Elementen des FPP- und DXP-Moduls (**C**, *+ispA-dxs-idi-MVA)* plasmidbasiert exprimiert. Alle Expressionsvektoren basieren auf pRhon5Hi-*PatS*. Die Bestimmung der Patchoulolausbeute erfolgte mittels GC von n-Dodecan-Extrakten. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und die zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken und der Faktor der erreichten Verbesserung.

Pyr: Pyruvat; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; DXP: 1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphat; MEP: 2-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat; MEP-CMP: 2-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Cytidylmonophosphat; MEPP-CMP: 2-Methyl-D-Erythritol-2,4-Phosphat-Cytidylmonophosphat; MEcPP: 2-Methyl-D-Erythritol-2,4-cylo-Pyrophosphat; HMB-PP: 1-Hydroxy-2-Methyl-2-Butenylpyrophosphat; HMG-CoA: β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA; Mev: Mevalonat; Mev-P: Mevalonat-5-Phosphat; Mev-PP: Mevalonat-5-Pyrophosphat; DMAPP: Dimethylallylpyrophosphat; IPP: Isopenteylpyrophosphat; GPP: Geranylpyrophosphat; FPP: Farnesylpyrophosphat; GGPP: Geranylgeranylpyrophosphat; DxR (IspC): DXP-Reduktoisomerase; IspD: MEP-Cytidyltransferase; IspE: MEP-CMP-Kinase; IspF: MEcPP-Synthase; IspG: HMP-PP-Synthase; IspH: HMB-PP-Reduktase; AtoB: Acetoacetyl-CoA-Thiolase; HMGS: HMG-CoA-Synthase; HMGR: HMG-CoA-Reduktase; MK: Mevalonatkinase; PMK: Mev-P-Kinase; PMDC: Mev-PP-Decarboxylase; IspA: FPP-Synthase; CrtE: GGPP-Synthase; CrtB: Phytoensynthase; CrtF: Spheroidensynthase

Zunächst sollte der Effekt der einzelnen Coexpression von DxS (+*dxs*) und Idi (+*idi*) im Vergleich zur Coexpression von IspA (+*ispA*) (**Abb. 18, B**) untersucht werden, um herauszufinden, wie groß der jeweilige Einfluss der Enzyme bei der Patchoulolproduktion ist. Dabei ist zu erkennen, dass DxS und Idi beide zu einer ähnlich starken Erhöhung der Patchoulolproduktion führten, wobei DxS einen etwas größeren Effekt hatte. Im Bezug zu IspA bedeutet dies, dass die Patchoulolproduktion von 3,1 mg/l (+ispA) durch DxS um das 2,5-fache auf 7,9 mg/l und durch Idi um das 2,2-fache auf 6,9 mg/l gesteigert werden konnte. Dies unterstützt die These von Kajiwara *et al*. (1997), dass neben DxS auch Idi einen bedeutenden Einfluss auf die Isoprenoidproduktion hat. Gleichzeitig wurde die Auswirkung der Expression des alternativen Mevalonat-Biosynthesewegs als zusätzliche Variante zum *Rhodobacter*-eigenen DXP-Biosyntheseweg getestet. Dies führte zu einer 4-fachen Steigerung, sodass eine Patchoulolkonzentration von 13,0 mg/l erreicht wurde.

Im nächsten Experiment sollte untersucht werden, ob durch das kombinierte *engineering* der einzelnen Module weitere Steigerungen der Patchoulolausbeute möglich sind (**Abb. 18, C**). Hierzu wurden die Vektoren pRhon5Hi-2-*ispA* (+*ispA*), pRhon5Hi-2-*ispA-dxs* (+*ispA-dxs*), pRhon5Hi-2-*ispA-dxs-idi* (+*ispA-dxs-idi*) und pRhon5Hi-2-*ispA-dxs-idi-MVA* (+*ispA-dxs-idi-MVA*) in *R. capsulatus* SB1003 eingebracht. Die Kombination des modifizierten FPP-Moduls mit der Coexpression von DxS (+*ispA-dxs*) führte in *R. capsualtus* tatsächlich zu einer Erhöhung der Patchoulolsynthese von 2,7 mg/l (+*ispA*) auf 6,3 mg/l. Dadurch, dass IspA anscheinend mehr IPP- und DMAPP-Moleküle zur Verfügung stand, konnte vermutlich mehr FPP produziert werden, das dann wiederum PatS vermehrt zur Verfügung stand, sodass mehr Patchoulol produziert werden konnte. Diese Variante ist noch nicht vergleichbar mit der Steigerung, die durch die Unterbrechung der natürlichen Carotinoidproduktion erreicht wurde (3-fache; siehe **Abb. 17, C**). Erst durch die Kombination der Elemente des DXP-Moduls (Coexpression von DxS und Idi) mit dem des FPP-Moduls (Coexpression von IspA) konnte eine größere Steigerung erzielt werden. Die Patchoulolproduktion konnte somit gegenüber alleiniger Coexpression von IspA um das 5-fache auf einen Wert von 13,3 mg/l erhöht werden. Dadurch wird deutlich, dass die verbesserte FPP-Bereitstellung offenbar immer noch nicht ausgereicht hat, um eine volle Auslastung der Patchoulolsynthase zu erhalten. In Bezug auf das Resultat, das durch die Expression von IspA und DxS (6,3 mg/l) erreicht wurde, führte die zusätzliche Expression von Idi (+*ispA-dxs-idi*) zu einer Verdopplung von Patchoulol. Wahrscheinlich ist der Effekt so groß, da IspH 1-Hydroxy-2-Methyl-2-Butenylpyrophosphat (HMBPP) zu IPP und DMAPP in einem ungleichen Verhältnis umsetzt. Da für ein FPP je ein DMAPP- und je zwei IPP-Moleküle benötigt werden (**1.1.1.2**), sorgte die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase (Idi) vermutlich zu einem günstigeren Stoffmengenverhältnis, sodass durch IspA mehr FPP und somit durch PatS mehr Patchoulol umgesetzt werden konnte.

Da die Kombination der modifizierten FPP- und DXP-Module und das alleinige Einbringen des MVA-Wegs die bisher besten Ergebnisse erreichten, sollte mit den Elementen der FPP- und DXP-Module auch noch das MVA-Modul kombiniert werden (+*ispa-dxs-idi-MVA*). Allerdings führte diese Variante zu keinen detektierbaren Mengen an Patchoulol. Dies könnte eventuell an einer zu effizienten Bereitstellung von IPP und DMAPP oder auch von FPP liegen, die zu einer Inhibierung der Patchoulolsynthase oder zu einer Art irreversiblen *feedback*-Inhibierung, die auf verschiedenen Ebenen ausgelöst werden kann (siehe Diskussion), geführt hat.

Durch die plasmidbasierte Coexpression von Elementen des DXP-Moduls und den Einsatz des MVA-Moduls konnte eine verbesserte Bereitstellung der Vorläufermoleküle IPP und DMAPP eine deutlich gesteigerte Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* erzielen. Das kombinierte *engineering* des **FPP- und DXP-Moduls** (+*ispA-dxs-idi*) und das Einführen eines alternativen **MVA-Wegs** führte in beiden Fällen zu einer **25-fachen Steigerung** der Patchoulolproduktion auf einen Wert von **13,3 mg/l** bzw. **13,0 mg/l** bezogen auf den Wildtypstamm mit reiner *PatS*-Expression und somit zu den bisher besten Patchoulol-Ausbeuten.

Darüber hinaus zeichnet sich ab, dass eine zu starke Verbesserung der Vorstufen-Bereitstellung (FPP-, DXP-Elemente und MVA-Modul kombiniert) zu einer extremen Verschlechterung führt.

3.2.2.5 Einfluss auf die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* durch *engineering* des MVA-Moduls durch genombasierte Genexpression

Die zusätzliche Expression des alternativen MVA-Biosynthesewegs (MVA-Modul) neben den in *R. capsulatus* natürlicherweise vorkommenden DXP-Biosynthesewegs hat zu einer deutlichen Steigerung der heterologen Patchoulolproduktion geführt (**3.2.2.4**). Darum sollte untersucht werden, ob die Genomintegration des 6,4 kb großen MVA-Operons aus *P. zeaxanthinifaciens* in *R. capsulatus* in Kombination mit den *metabolic engineering*-Strategien zu einer weiteren Steigerung führte. Die Herstellung des *R. capsulatus* Stammes SB1003+MVA wurde von Tim Moritz Weber im Rahmen seiner Bachelorarbeit (2015) durchgeführt. Dabei wurde das MVA-Operon unter Kontrolle des *nif*-Promotors gestellt, welcher auch in den hier eingesetzten pRhon5Hi-2-basierten Vektoren verwendet wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, inwieweit eine Steigerung der Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* möglich ist, wenn der SB1003+MVA-Stamm mit den voher erzeugten, verschiedenen Expressionsvektoren kombiniert wird (**Abb. 19**). Hierzu wurden die Vektoren pRhon5Hi-2-*ispA* (+*ispA*), pRhon5Hi-2-*dxs* (+*dxs*), pRhon5Hi-2-*idi* (+*idi*), pRhon5Hi-2-*MVA* (+*MVA*), pRhon5Hi-2-*ispA-dxs* (+*ispA-dxs*), pRhon5Hi-2-*ispA-dxs-idi* (+*ispA-dxs-idi*) und pRhon5Hi-2-

ispA-dxs-idi-MVA (+*ispA-dxs-idi-MVA*) in den *R. capsulatus* SB1003+MVA-Stamm eingebracht und die Stämme, wie beschrieben (**2.8.1.3**), anaerob phototroph kultiviert und der Patchoulolgehalt aller Kulturen mittels GC analysiert. Da der Stamm nur als *single-crossover* Variante, bei der der Mutagenesevektor komplett im Genom integriert vorliegt, erzeugt wurde, wurde den Medien Gentamicin (**2.6**) zugesetzt, um die Stabilität dieses Stammes während der Kultivierung zu gewährleisten.

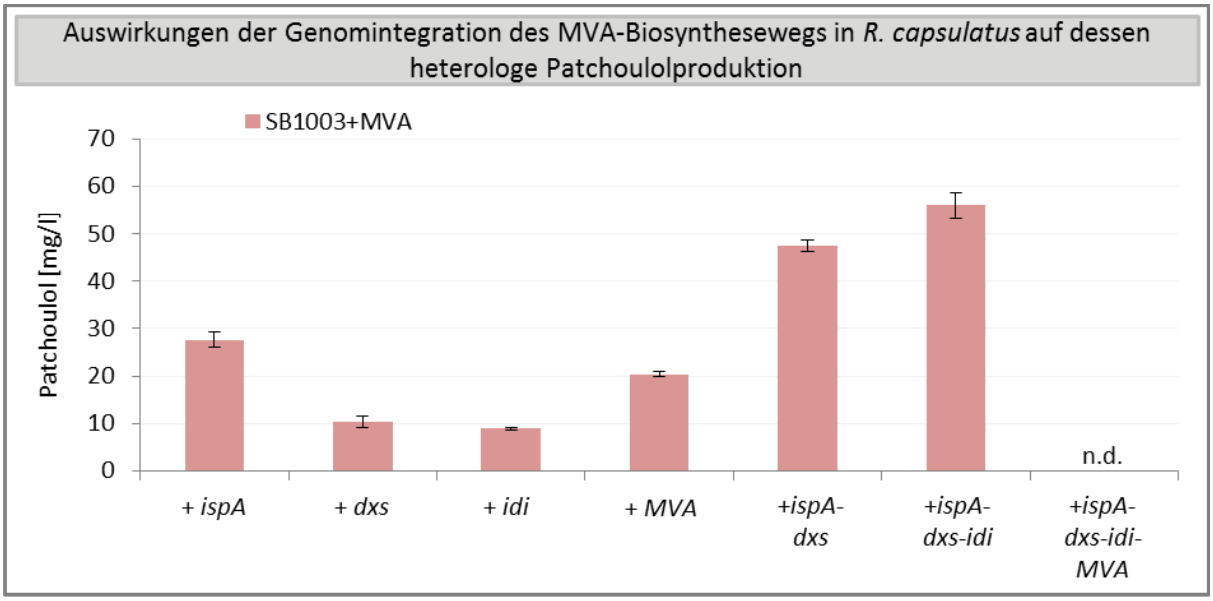

Abb. 19. Auswirkungen der Genomintegration des MVA-Biosynthesewegs in *R. capsulatus* auf dessen heterologe Patchoulolproduktion.
Es ist die Patchoulproduktion der plasmidbasierten Expression von IspA (+*ispA*), DxS (+*dxs*), Idi (+*idi*) und dem MVA-Operon (+*MVA*) in dem Stamm SB1003+MVA (rot), in dessen Chromosom das MVA-Operon aus *P. zeaxanthinifaciens* integriert wurde. Außerdem wurden in *R. capsulatus* SB1003+MVA die Kombinationen IspA und DxS (+*ispA-dxs*), sowie Idi (+*ispA-dxs-idi*) des FPP-Moduls bzw. des DXP-Moduls und noch zusätzlich das MVA-Modul (+*ispA-dxs-idi-MVA*) plasmidbasiert unter anaerob phototrophen Kultivierungsbedingungen in RCV-Medium exprimiert. Alle Expressionsvektoren basierten auf dem pRhon5Hi-2-*PatS.* Die Bestimmung der Patchoulolausbeute erfolgte mittels GC von n-Dodecan-Extrakten. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und die zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken und der Faktor der erreichten Verbesserung.

Die Patchoulolkonzentration stieg deutlich an, als der *R. capsulatus* Stamm SB1003+MVA mit dem modifizierten FPP-Modul (+*ispA*) kombiniert wurde und zwar um fast das 10-fache auf einen Wert von 27,7 mg/l im Vergleich zu dem Wert (2,7 mg/l), der mit dem Wildtypstamm SB1003 (**Abb. 18**), in dem ebenfalls IspA coexprimiert (+*ispA*) wurde, erreicht wurde. Interessant ist, dass die einzelne Coexpression der Enzyme DxS (+*dxs*) (10,3 mg/l) und Idi (+*idi*) (9,0 mg/l) in *R. capsulatus* SB1003+MVA nicht zu einer ähnlich guten Verbesserung führte, wie sie im Kapitel zuvor beschrieben werden konnte (**3.2.2.4, Abb. 18 B**), sondern eine um etwa 2/3 schlechtere Ausbeute in Bezug auf die Coexpression von IspA im MVA-Stamm (+*ispA*) zeigte. Der Versuch, die Produktion von Patchoulol in dem Stamm *R. capsulatus* SB1003+MVA durch die zusätzliche plasmidbasierte Expression des MVA-Operons (20,4 mg/l) weiter zu verbessern, konnte ebenfalls zu keiner weiteren Ausbeutensteigerung

als die Coexpression von IspA führen. Erst durch die gleichzeitige Coexpression von IspA und DxS (+*ispA-dxs*) in *R. capsulatus* SB1003+MVA konnte eine um etwa das Doppelte gesteigerte Patchoulolkonzentration im Vergleich zur einfachen Coexpression von IspA (+*ispA*) in derselben Mutante erzielt werden. Dadurch wurde eine Patchoulolkonzentration von 47,5 mg/l erreicht. Hier bestätigt sich, dass die zusätzliche Coexpression von DxS einen weiteren positiven Einfluss auf die Patchoulolproduktion hat, der sich auch schon im Stamm SB1003 bemerkbar machte (vgl. **3.2.2.4, Abb. 18, C**). Durch Expression des genomintegrierten MVA-Operons war die Ausbeute allerdings deutlich höher (6,25 mg/l zu 47,5 mg/l). Interessant ist, dass der Faktor, um den sich die Patchoulolkonzentration bei einzelner IspA-Coexpression im Vergleich zur kombinierten Coexpression von IspA und DxS in den *R. capsulatus* Stämmen SB1003 bzw. SB1003+MVA verbessert hat, sehr ähnlich war. Die plasmidbasierte Coexpression aller Elemente des FPP- und DXP-Moduls (+*ispA-dxs-idi*) in *R. capsulatus* SB1003+MVA führte, wie auch schon im Wildtypstamm zu einer weiteren Steigerung, sodass eine bisher maximale Patchoulolkonzentration von 56 mg/l erreicht werden konnte. Diese Steigerung war in *R. capsulatus* SB1003+MVA deutlich kleiner (1,2-fache) als im Wildtypstamm SB1003 (**3.2.2.4, Abb. 18**), in dem es zu einer Verbesserung um etwas mehr als das Doppelte führte. Die plasmidbasierte Kombination der Elemente des FPP- und DXP-Moduls mit dem des MVA-Moduls in dem Stamm *R. capsulatus* SB1003+MVA führte, wie es auch bei dem Wildtypstamm SB1003 der Fall war, zu keinen detektierbaren Mengen an Patchoulol.

Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass durch die Integration des MVA-Operons in das Genom von *R. capsulatus* SB1003 bei Anwendung der *metabolic engineering*-Strategien in allen Fällen eine Verbesserung der Patchoulolausbeuten erreicht werden konnte. Allerdings konnte durch Coexpression von DxS (+*dxs*), Idi (+*idi*) und des MVA-Operons (+*MVA*) keine Steigerung gegenüber der Coexpression von IspA (+*ispA*) erreicht werden, wie es bei dem Stamm SB1003 der Fall war.

Die **Genomintegration des MVA-Operons in *R. capsulatus* SB1003** konnte zu einer deutlichen Steigerung der Patchoulolproduktion führen. Die Kombination der Expression des genomintegrierten MVA-Operons in *R. capsulatus* SB1003 mit der plasmidbasierten Expression von Elementen des FPP- und DXP-Moduls (**SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi***) führte zu einer **21-fachen Steigerung** der Patchoulolkonzentration im Vergleich zu der einfachen Coexpression von IspA im Wildtypstamm SB1003. Es wurde ein maximaler Wert von **56 mg/l** erreicht.

3.2.2.6 Bestimmung der maximalen Patchoulol-Produktionsrate in *R. capsulatus* SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi*

Bislang konnte mittels *metabolic engineering* die Synthese des wirtsfremden Sesquiterpens Patchoulol in *R. capsulatus* erheblich gesteigert werden. Die anfängliche Terpenausbeute von 0,53 mg/l, die durch die plasmidbasierte, heterologe Expression der Patchoulolsynthase aus *P. cablin* mit Hilfe eines auf pRhon5Hi-2 basierenden Expressionsvektors (**3.2.2.2**) erzielt wurde, konnte um das 112-fache auf 56 mg/l gesteigert werden, indem das MVA-Operon aus *P. zeaxanthinifaciens* unter Kontrolle des *nif*-Promotors in das Genom des Stammes *R. capsulatus* SB1003 integriert und die Gene *ispA* aus *R. capsulatus*, sowie *dxs* und *idi* aus *R. sphaeroides* zusätzlich in diesem Stamm plasmidbasiert (pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi*) exprimiert wurden.

Im Folgenden sollte bestimmt werden, wie hoch die maximale Produktionsrate in *R. capsulatus* für die Produktion von Patchoulol ist. Dafür wurde der ermittelte beste *R. capsulatus* Produktionsstamm für Patchoulol SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi* für fünf Tage (120 h) unter den üblichen phototrophen Bedingungen (**2.8.1.3**) kultiviert und nach 24 h und jeweils einem weiteren Tag die Kultivierung von drei Kulturen beendet und die Patchoulolkonzentrationen in mg/l Kultur bestimmt (**Abb. 20**).

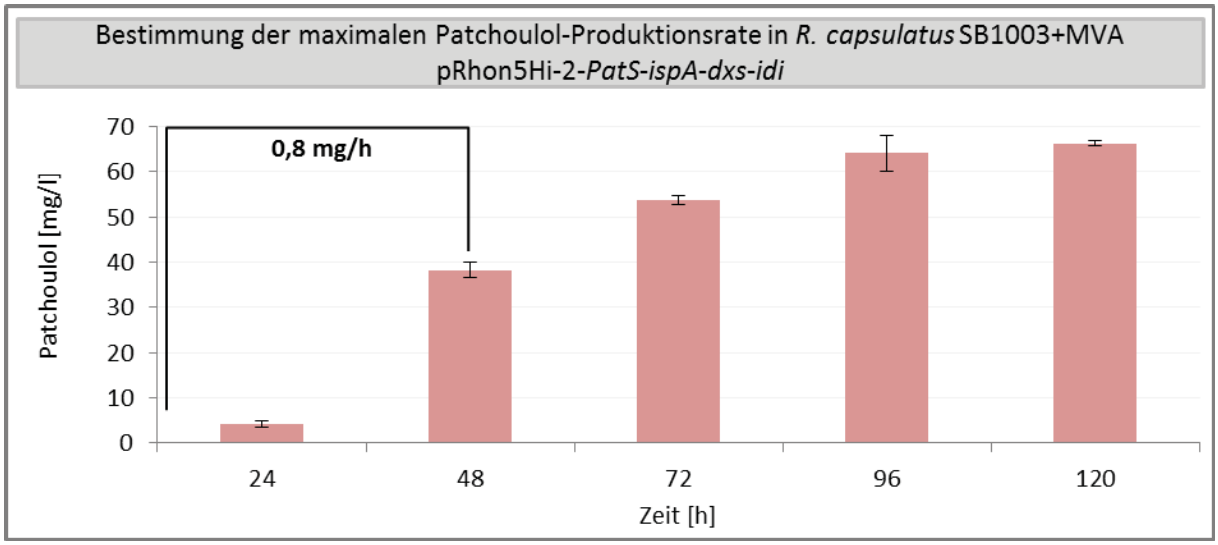

Abb. 20. Bestimmung der maximalen Patchoulol-Produktionrate in *R. capsulatus* SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi*.
Es wurde die Patchoulolkonzentration in n-Dodecan-Proben mittels GC bestimmt, die aus der Phase über Kulturen des Stammes SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi* stammten, die für 24, 48, 72, 96 und 120 h unter anaeroben Bedingungen kultiviert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Experimenten und deren Standardabweichung als Fehlerbalken und die maximale Produktionsrate von Patchoulol nach einer Kultivierungsdauer von 48 h.

Es ist zu erkennen, dass die Patchoulolproduktion in *R. capsulatus* im Verlauf von 120 h kontinuierlich anstieg. Es wird zudem deutlich, dass die Produktion nach 24 h deutlich anstieg. Dies lag vermutlich

daran, dass *R. capsulatus* erst nach 24 h seine lag-Phase überwunden hatte und in die exponentielle Wuchsphase überging (vgl. **Tab. 13**; signifikante Zunahme des Trockengewichts der Zellen erst nach 24 h). Nach 48 h stieg die Patchoulolkonzentration immer langsamer an, was auch an den geringeren Produktionsraten (**Tab. 13**) zu erkennen war. In dem getesteten *R. capsulatus* Stamm SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi* konnte so eine maximale Produktionsrate von 0,8 mg Patchoulol/h nach einer Kultivierungsdauer von 48 h bestimmt werden. Dennoch stieg die Patchoulolkonzentration immer weiter. Nach etwa 96 h ist die maximale Patchoulolmenge von 66,3 mg/l so gut wie erreicht. Die Patchoulausbeute stieg ab diesem Zeitpunkt nur noch um wenige mg/l an.

Da neben dem Produkttiter in der Kultur die Produktionsrate, sowie die Produktivität der Zellen von Bedeutung sind, wurden entsprechende Kennzahlen berechnet. Hierzu wurden die Produkttiter (mg/l) in Bezug zur jeweils gesamten Produktionszeit (h) gesetzt, die Zelltrockenmassen der Kulturen (gDCW, Gramm *dry cell weight*) auf 1 l Kultur extrapoliert und die Produktmenge mit der Zelltrockenmasse in Bezug gesetzt (**Tab. 13**).

Tab. 13. Übersicht verschiedener Kennzahlen zur Patchoulolproduktion
Zu den Kulturen, deren Kultivierung zu verschiedenen Zeitpunkten (24-120 h) beendet wurde, sind sowohl die Konzentration an Patchoulol in mg pro l Kultur und die daraus resultierende Patchoulol-Produktionsrate in mg/h von *R. capsulatus* SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi* angegeben. Außerdem ist das Trockengewicht der Zellen der Expressionskulturen, das auf 1 l Kultur extrapoliert wurde, in g und die daraus resultierende Patchoulolmenge in mg pro g Trockengewicht aufgelistet.

Kultivierung [h]	**Patchoulol [mg/l]**	**Produktionsrate [mg/h]**	**Trockengewicht [gDCW/l]**	**Patchoulol [mg/gDCW]**
24	4,19	0,2	0,41	10,2
48	38,33	**0,8**	1,47	**26,1**
72	53,81	0,7	1,54	35,0
96	64,14	0,7	1,69	**37,9**
120	66,29	0,6	1,78	37,3

Durch das Verhältnis des Trockengewichts (gDCW/l) der Zellen in den Expressionskulturen und der bestimmten Patchoulolmenge (mg/l) konnten nach einer Kultivierungsdauer von 48 h somit 26,1 mg/gDCW und nach 96 h maximal 37,9 mg/gDCW erreicht werden.

Mit dem besten *R. capsulatus* Stamm für die wirtsfremde Patchoulolproduktion **SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*PatS-ispA-dxs-idi*** konnte nach einer Kultivierungsdauer von **48 h** eine maximale **Produktionsrate** von **0,8 mg/h** und eine Ausbeute von 26,1 mg/gDCW erreicht werden. Nach **5 Tagen** konnte eine **maximale Patchoulolproduktion** von **66,3 mg/l** bzw. **37,3 mg/gDCW** erlangt werden. Somit konnte durch das *metabolic engineering* eine **Steigerung** um das **112-fache** erreicht werden, wenn die anfängliche Ausbeute von 0,53 mg/l durch die einfache Expression der Patchoulolsynthase aus *P. cablin* in *R. capsulatus* SB1003 als Ausgangswert betrachtet wird.

3.2.3 Einfluss von *metabolic engineering* auf die wirtsfremde Produktion von Valencene in *R. capsulatus*

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass das Bakterium *R. capsulatus* das wirtsfremde Sesquiterpen Patchoulol, eines der wichtigsten Duftstoffe bei der Herstellung von Parfüms (Frister & Beutel, 2015) durch den Einsatz von *metabolic engineering* in hohen Mengen produziert. Im folgenden Teil der Arbeit sollte überprüft werden, ob die für die Patchoulolproduktion entwickelten Optimierungsstrategien in *R. capsulatus* für die Produktion von weiteren Sesquiterpenen angewendet werden können.

Als Beispiel sollte Valencen, ein Terpen mit großer Bedeutung für die Lebensmittelindustrie (vgl. **1.1.3**), dienen. Es wurden zwei verschiedene Valencensynthasen verwendet, von denen bekannt ist, dass sie sich nicht nur in ihrer Proteinsequenz unterscheiden, sondern auch in ihrer katalytischen Effizienz (Beekwilder *et al.*, 2014). Dadurch sollte getestet werden, ob die Terpensynthase-Aktivität einen Einfluss auf die Modul-basierten Optimierung der Sesquiterpenproduktion hat. Bei den zwei Synthasen handelte es sich um die Valencensynthase aus der Orange *Citrus sinensis* (CitrusVS oder CnTPS1 bzw. in dieser Arbeit als ValS bezeichnet) und die aus der Nootka-Scheinzypresse *Callitropsis nootkatensis* (CnVS), wobei CnVS als die produktivere Valencensynthase gilt (Beekwilder *et al.*, 2014; Frohwitter *et al.*, 2014).

Die beiden Synthasegene wurden, wie auch schon das Patchoulolsynthasegen zuvor für die Expression in *R. capsulatus* kodonoptimiert (**Anhang, 8.1.2 + 8.1.3**) und mit Erkennungssequenzen, die von den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Hind*III erkannt werden, flankiert und anschließend von MWG synthetisiert. Für die Valencenproduktion sollten die Module, die auf die Patchoulolproduktion, sowohl im negativen (+*ispA-dxs-idi-MVA*) wie auch im positiven Sinne (+*ispA*, +*MVA* und +*ispA-dxs-idi*) in den Stämmen SB1003 und SB1003+MVA, den größten Einfluss hatten, angewendet werden.

Zur Erzeugung der Expressionsvektoren (**2.2**) für die Valencenproduktion wurde das Gen der Patchoulolsynthase aus den Expressionsvektoren, die für die Patchoulolproduktion verwendet wurden (**3.2.2.2**), durch die Gene der Valencensynthasen (*ValS* und *CnVS*) ausgetauscht, in dem die Patchoulolsynthase-Expressionsvektoren- und die Synthesevektoren (MWG) mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Hind*III hydrolysiert (**2.7.4**) und nach erfolgter Fragmentisolierung (**2.7.2 + 2.7.3**) die entsprechenden Bestandteile ligiert (**2.7.5**) wurden. Die so entstandenen Expressionsvektoren wurden, nach erfolgter Überprüfung durch Sequenzierung (MWG), anschließend in Kultivierung und Versuchsaufbau analog, wie zuvor für die Patchoulolproduktion angewendet (**2.8.1.3**). Die erhaltenen n-Dodecan-Phasen wurden mittels GC analysiert und mit Hilfe der erstellten Eichkurven und Formeln konnte die gebildete Valencenmenge bestimmt werden (**2.10.4.1**).

3.2.3.1 Einfluss von *metabolic engineering* auf die durch die Expression der *Citrus sinensis*-Valencensynthase vermittelte Valencenproduktion in *R. capsulatus*

Als erstes wurde die als weniger produktiv geltende Valencensynthase aus *C. sinensis* in *R. capsulatus* getestet (**Abb. 21**). Die Valencenproduktion wurde durch die verschiedenen Expressionsvektoren pRhon5Hi-2-*ValS* (-), pRhon5Hi-2-*ValS*-*ispA* (+*ispA*), pRhon5Hi-2-*ValS*-*MVA* (+*MVA*), pRhon5Hi-2-*ValS*-*ispA*-*dxs*-*idi* (+*ispA*-*dxs*-*idi*) und pRhon5Hi-2-*ValS*-*ispA*-*dxs*-*idi*-*MVA* (+*ispA*-*dxs*-*idi*-*MVA*) sowohl im *R. capsulatus* Wildtypstamm SB1003 (lila) als auch in der Mutante SB1003+MVA (rot), bei der das MVA-Operon ins Genom integriert wurde, vermittelt.

Zunächst wurden die Valencenausbeuten, die in *R. capsulatus* SB1003 (lila) erreicht wurden, untereinander verglichen. Durch die plasmidbasierte heterologe Expression der ValS ohne weiteres *metabolic engineering* (-) konnten 1,3 mg/l Valencen produziert werden. Durch die Coexpression von IspA konnte die Produktion um das etwa 1,2-fache gesteigert werden, auf einen Wert von 1,6 mg/l. Die plasmidbasierte Coexpression des MVA-Operons, die in vorherigen Versuchen zu einer deutlichen Steigerung der Patchoulolproduktion geführt hatte (vgl. **3.2.2.4, Abb. 18, B**), zeigte für ValS im Gegensatz zu PatS ebenfalls nur einen geringen Anstieg der Valencenausbeute. Es wurden hier nur 1,5 mg/l Valencen produziert. Es soll angemerkt sein, dass die Ausbeuten so gering waren, dass die Signale nahe der Nachweisgrenze und die Fehler der Messungen recht hoch waren. Die Expression von Genen des FPP- zusammen mit denen des DXP-Moduls (+*ispA*-*dxs*-*idi*) führte allerdings, wie auch schon für Patchoulol, zu einer deutlichen Steigerung der Valencenproduktion. Es konnten nun Valencenkonzentrationen von 6,4 mg/l erreicht werden, was einer 5-fachen Steigerung entsprach.

Wie bei der Patchoulolproduktion zeigte sich, dass die Kombination aller *metabolic engineering* Strategien (+*ispA-dxs-idi-MVA*) zu keinen detektierbaren Valencenmengen führte.

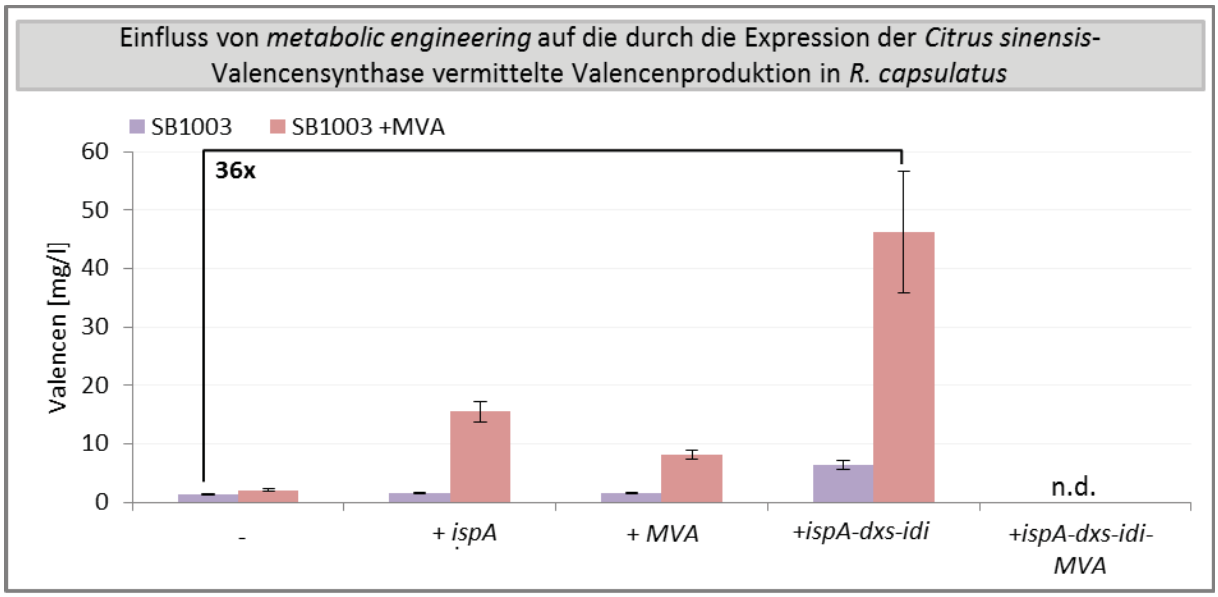

Abb. 21. Einfluss von *metabolic engineering* auf die durch die Expression der *Citrus sinensis*-Valencensynthase vermittelte Valencenproduktion in *R. capsulatus*.
Es ist die Valencenproduktion der plasmidbasierten alleinigen heterologen Expression des kodonoptimierten Valencensynthase-Gens *ValS* aus *C. sinensis* mit der zusätzlichen Coexpression von IspA (+*ispA*) und des MVA-Operons (+*MVA*) und den plasmidbasierten Kombinationen der optimierten FPP- und DXP-Module (+*ispA-dxs-idi*) und der zusätzlichen Kombination mit dem MVA-Operon (+*ispA-dxs-idi-MVA*) in dem *R. capsulatus* Wildtyp Stamm SB1003 (lila) und der Mutante SB1003+MVA (rot), bei der das MVA-Operon aus *P. zeaxanthinifaciens* in SB1003 integriert wurde, dargestellt. Alle Expressionsvektoren basierten auf dem Vektor pRhon5Hi-2. Die Bestimmung der Valencenausbeute erfolgte mittels GC von n-Dodecan-Extrakten. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und die zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken und der Faktor der erreichten Verbesserung.

Bei dem Vergleich von *R. capsulatus* SB1003+MVA (rot) mit dem Stamm SB1003 (lila) fällt auf, dass die Verwendung des *R. capsulatus* SB1003+MVA Stammes zu ähnlichen Ergebnissen, wie schon die plasmidbasierte Coexpression des MVA-Operons im Wildtyp führte. Es konnte für den Stamm *R. capsulatus* SB1003+MVA ohne zusätzliche Optimierungen ein Wert von 2,1 mg/l bestimmt werden. Die zusätzliche plasmidbasierte Coexpression von IspA führte hingegen in diesem Fall zu einem 7-fachen Anstieg auf eine Valencenkonzentration von 15,5 mg/l. Die zusätzliche plasmidbasierte Expression des MVA-Operons zur genombasierten Expression des MVA-Operons, führte zwar zu einer 4-fachen Steigerung (8,1 mg/l) in Bezug zur rein genombasierten Expression, allerdings ist diese geringer als die 7-fache Steigerung, die durch die Coexpression des IspA in *R. capsulatus* SB1003+MVA erzielt wurde. Die plasmidbasierte Modifikation der Module FPP und DXP mit der Genomintegrierung des MVA-Operons in *R. capsulatus* SB1003 (rot, +*ispA-dxs-idi*) führte zu einer noch sehr viel höheren Anreicherung an Valencen. Die Valencenausbeute stieg um das 36-fache im Vergleich mit der Expression von ValS ohne jede Optimierung auf einen Wert von 46,2 mg/l. Die

plasmidbasierte Kombination der Elemente aller Module zusammen mit dem SB1003+MVA (rot, +*ispA-dxs-idi-MVA*) konnte wieder zu keinen detektierbaren Mengen an Valencen führen.

Diese Daten zeigen, dass in *R. capsulatus* durch *metabolic engineering* und Expression von ValS die Valencenproduktion ebenso gesteigert werden konnte, wie es für die durch die Expression von PatS vermittelte Patchoulolproduktion der Fall war.

Es konnte gezeigt werden, dass *R. capsulatus* Valencen heterolog produzieren kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Strategie des *metabolic engineering* auch auf die Valencenproduktion durch die Expression der **Valencensynthase aus *C. sinensis*** erfolgreich angewendet werden kann. Durch die Optimierung des FPP- und DXP-Moduls in dem Stamm *R. capsulatus* **SB1003+MVA** mit Hilfe des Expressionsvektors **pRhon5Hi-2-*ValS-ispA-dxs-idi*** konnte die Valencenausbeute um das **36-fache** von einem Wert von 1,3 mg/l (ohne Optimierung im Wildtypstamm) auf einen Wert von **46,2 mg/l** gesteigert werden.

3.2.3.2 Einfluss von *metabolic engineering* auf die durch die Expression der *Callitropsis nootkatensis*-Valencensynthase vermittelte Valencenproduktion in *R. capsulatus*

Die Strategie der Stammoptimierung in Bezug auf die Verbesserung der Terpenbiosynthese (**3.2.2.1**) hat nicht nur im Fall der Patchoulolsynthase aus *P. cablin*, sondern auch im Fall der Valencenesynthase aus *C. sinensis* zu einer deutlichen Steigerung der jeweiligen Terpenproduktion in *R. capsulatus* geführt (vgl. **3.2.2.5 + 3.2.3.1**). In diesem Experiment wurde untersucht, inwieweit sich der Einsatz einer produktiveren Terpensynthase auf die Terpenproduktion auswirkt und ob die Optimierungen der Module bei CnVS-Expression in *R. capsulatus* zu den gleichen Effekten wie bei der ValS-Expression führen und dadurch eine Steigerung der Valencenproduktion in *R. capsulatus* erreicht werden kann. Dazu wurde die Valencensynthase aus *C. nootkatensis* in *R. capsulatus* SB1003 (lila) und SB1003+MVA (rot) mit den verschiedenen Expressionsvektoren pRhon5Hi-2-*CnVS* (-), pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA* (+*ispA*), pRhon5Hi-2-*CnVS-MVA* (+*MVA*), pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA-dxs-idi* (+*ispA-dxs-idi*) und pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA-dxs-idi-MVA* (+*ispA-dxs-idi-MVA*) unter anaerob phototrophen Bedingungen exprimiert (**2.8.1.3**) und die Valencenausbeuten untereinander (**Abb. 22**) und anschließend mit denen der Valencensynthase aus *C. sinensis* verglichen.

Als erstes fällt auf, dass im Wildtyp *R. capsulatus* SB1003 durch die Expression der CnVS ohne Optimierung (lila, -) Valencenausbeuten von 20,9 mg/l erreicht wurden. Dies bedeutet, dass CnVS unter diesen Bedingungen um mehr als das 16-fache aktiver ist als ValS. Dieses Ergebnis entspricht den bisherigen Erkenntnissen, dass CnVS produktiver als ValS ist (Beekwilder *et al.*, 2014; Frohwitter

et al., 2014). Die Coexpression von IspA in *R. capsulatus* SB1003 (lila, +ispA) sorgte für eine erste Steigerung um etwa das 4-fache auf einen Wert von 78,3 mg/l. Durch die plasmidbasierte Coexpression des MVA-Operons stieg die Valencenproduktion um mehr als das Doppelte an und erreichte einen Wert von 186,7 mg/l. Es ist sehr überraschend, dass die Modifikationen des FPP- und DXP-Moduls in *R. capsulatus* SB1003 (lila, *+ispA-dxs-idi*), welche zuvor bei der Expression der beiden anderen Terpensynthasen (**Abb. 18 + Abb. 21**) zu einer Steigerung im Vergleich zur einfachen Coexpression von IspA (*+ispA*) geführt hat, bei der Expression von CnVS zu einer Verschlechterung führte. Es wurden somit nur 47,8 mg/l Valencen produziert. Wie schon bei den Terpensynthasen zuvor führte die zusätzliche plasmidbasierte Expression des MVA-Operons in *R. capsulatus* SB1003 (lila, *+ispA-dxs-idi-MVA*) zu einer deutlichen Verschlechterung der Terpenoidausbeute. In diesem Fall wurden allerdings detektierbare Mengen (13,5 mg/l) erreichte, deren Konzentration sich unter der, die durch die alleinige Expression der CnVS erreicht wurde, befand.

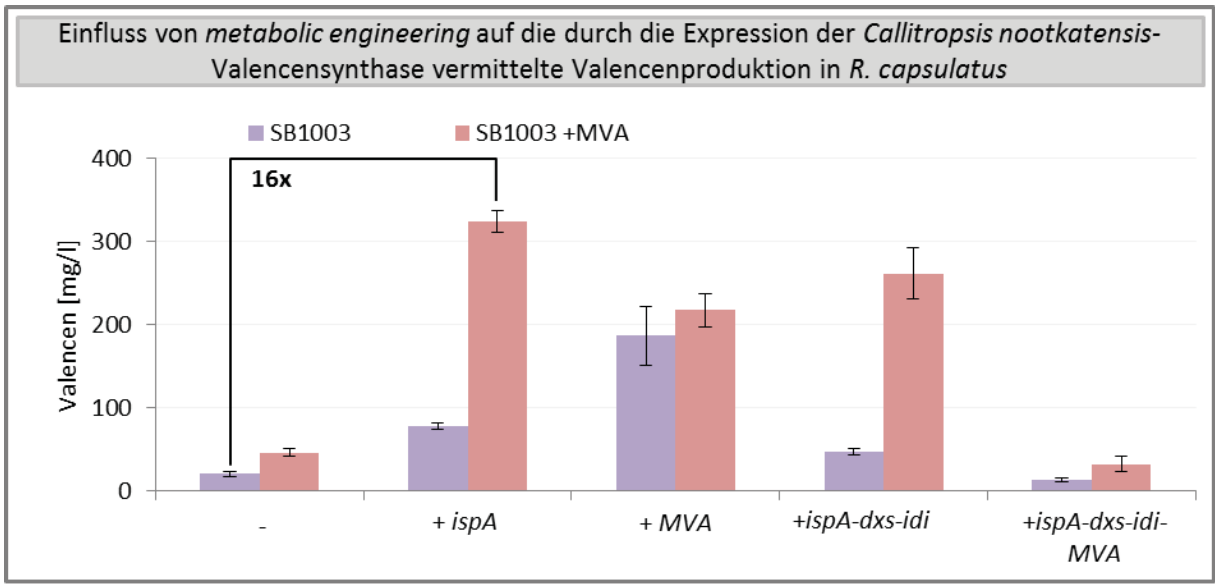

Abb. 22. Einfluss von *metabolic engineering* auf die durch die Expression der *Callitropsis nootkatensis*-Valencensynthase vermittelte Valencenproduktion in *R. capsulatus*.
Es ist die Valencenproduktion der plasmidbasierten alleinigen heterologen Expression des kodonoptimierten Valencensynthase-Gens *CnVS* aus *C. nootkatensis* mit der zusätzlichen Coexpression von IspA (*+ispA*) und des MVA-Operons (*+MVA*) und den plasmidbasierten Kombinationen der optimierten FPP- und DXP-Module (*+ispA-dxs-idi*) und der zusätzlichen Kombination mit dem MVA-Operon (*+ispA-dxs-idi-MVA*) in dem *R. capsulatus* Wildtyp Stamm SB1003 (lila) und der Mutante SB1003+MVA (rot), bei der das MVA-Operon aus *P. zeaxanthinifaciens* in SB1003 integriert wurde, dargestellt. Alle Expressionsvektoren basierten auf dem Vektor pRhon5Hi-2. Die Bestimmung der Valencenausbeute erfolgte mittels GC von n-Dodecan-Extrakten. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und die zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken und der Faktor der erreichten Verbesserung.

Die genomintegrierte Anwendung des MVA-Moduls durch den *R. capsulatus* Stamm SB1003+MVA (rot, -) führte, wie auch schon bei ValS, zu einer Steigerung, die sich in einer Verdopplung der Valencenausbeute mit einem Wert von 46,7 mg/l widerspiegelte. Die Steigerung war dabei deutlich geringer als die durch die plasmidbasierte Anwendung des MVA-Moduls im Wildtyp *R. capsulatus*

SB1003 (lila, +MVA). Durch die Coexpression von IspA in *R. capsulatus* SB1003+MVA (rot, +ispA) konnte die Valencenproduktion soweit gesteigert werden, dass eine Ausbeute von 324,3 mg/l Valencen erreicht wurde. Durch die gleichzeitige plasmid- und genomvermittelte Expression des MVA-Operons (rot, +MVA) konnte nur eine Valencenkonzentration von 217,9 mg/l erzielt werden. Die Ausbeute ist um etwa 30 mg/l höher als in dem *R. capsulatus* Wildtypstamm SB1003 (lila, +MVA).

Es ist sehr interessant, dass die Optimierung der FPP- und DXP-Module in der Mutante SB1003+MVA (rot, +*ispA-dxs-idi*) zu einer weiteren Verbesserung (261,7 mg/l) der Valencenausbeute führte, wie es auch bei den anderen Synthasen der Fall war, wohingegen es zu entsprechenden Experimenten bei Verwendung des *R. capsulatus* Wildtyps SB1003 (lila, +*ispA-dxs-idi*) zu einer unerwarteten deutlichen Verschlechterung geführt hatte. Insgesamt ist die Ausbeute durch die plasmidbasierte zusätzliche Coexpression von Elementen des DXP-Moduls (rot, +*ispA-dxs-idi*) in *R. capsulatus* SB1003+MVA schlechter als ohne (rot, +*ispA*). Die kombinierte plasmidbasierte Modifizierung des FPP-, DXP- und MVA-Moduls in dem *R. capsulatus* Stamm SB1003+MVA (rot, +*ispA-dxs-idi-MVA*) führte wie zuvor bei den anderen Terpensynthasen zu einer deutlichen Verschlechterung der Valencenausbeute (32,9 mg/l). In diesem Fall war die Ausbeute etwas höher als der zuvor ohne *metabolic engineering* erreichte Wert in dem *R. capsulatus* Wildtypstamm SB1003 (20,9 mg/l). Er war aber niedriger als die Konzentration, die in dem Stamm *R. capsulatus* SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*CnVS* erreicht wurde.

Diese Daten zeigen, dass bei der Expression von CnVS durch *metabolic engineering* ebenfalls die Terpenoidproduktion gesteigert werden konnte. Allerdings haben die verschiedenen *engineering*-Strategien teilweise andere Effekte auf die Valencenproduktion. Im Fall der CnVS-Expression konnte im Gegensatz zu den Terpensynthasen PatS und ValS die größte Steigerung durch den *R. capsulatus* Stamm SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA* erzielt werden.

Es konnten durch die Expression der als produktiver geltenden Valencensynthase (CnVS) aus *C. nootkatensis* höhere Ausbeuten als mit der Synthase aus *C. sinensis* (ValS) erreicht werden: Der **Austausch** der Synthase **ValS durch CnVS** führte ohne weitere Optimierungen zu einer **16-fachen Steigerung** der Valencenausbeute in *R. capsulatus*. Durch die Modifikationen der verschiedenen Optimierungsmodule konnte die Valencenproduktion mit CnVS von 20,9 mg/l (ohne Optimierung des Wildtypstammes *R. capsulatus* SB1003) auf **324 mg/l** erhöht werden. Im Gegensatz zur Expression von PatS und ValS führte im Fall von CnVS die Modifizierung des FPP-Moduls (+*ispA*) durch den Expressionsvektor **pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA*** in dem Stamm **SB1003+MVA** zur größten Ausbeute.

3.2.3.3 Bestimmung der maximalen Valencen-Produktionsrate in *R. capsulatus* SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA*

Die Optimierung der Terpenbiosynthese mit Hilfe von *metabolic engineering* (**3.2.2.1**) hat nicht nur zur Verbesserung der Patchoulol-, sondern auch zur Verbesserung der Valencenproduktion in *R. capsulatus* beigetragen. Außerdem konnte durch die Wahl einer produktiveren Valencensynthase (CnVS) die Valencenausbeute noch weiter verbessert werden. Mit der Valencensynthase aus *C. sinensis* konnten Konzentrationen von bis zu 46,2 mg/l und mit der aus *C. nootkatensis* sogar Werte von bis zu 324,3 mg/l erreicht werden.

In diesem Versuch sollte, ebenso wie es auch für die Produktion von Patchoulol durchgeführt wurde, die maximale Valencenproduktionsrate in *R. capsulatus* bestimmt werden. Dazu wurde der beste *R. capsulatus* Produktionsstamm SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA* für fünf Tage (120 h) unter den üblichen phototrophen Bedingungen (**2.8.1.3**) kultiviert und nach jeweils einem Tag (24, 48, 72, 96 und 120 h) drei Hungates aus dem Photostudio entfernt und die Valencenkonzentrationen in mg/l Kultur bestimmt (**Abb. 23**). Zudem wurde im Fall der Evaluierung der Valencenproduktion neben dem Titer in der Kultur die Produktionsrate über den jeweils gesamten Kultivierungszeitraum, sowie die Produktivität der Zellen bestimmt (**Tab. 14**).

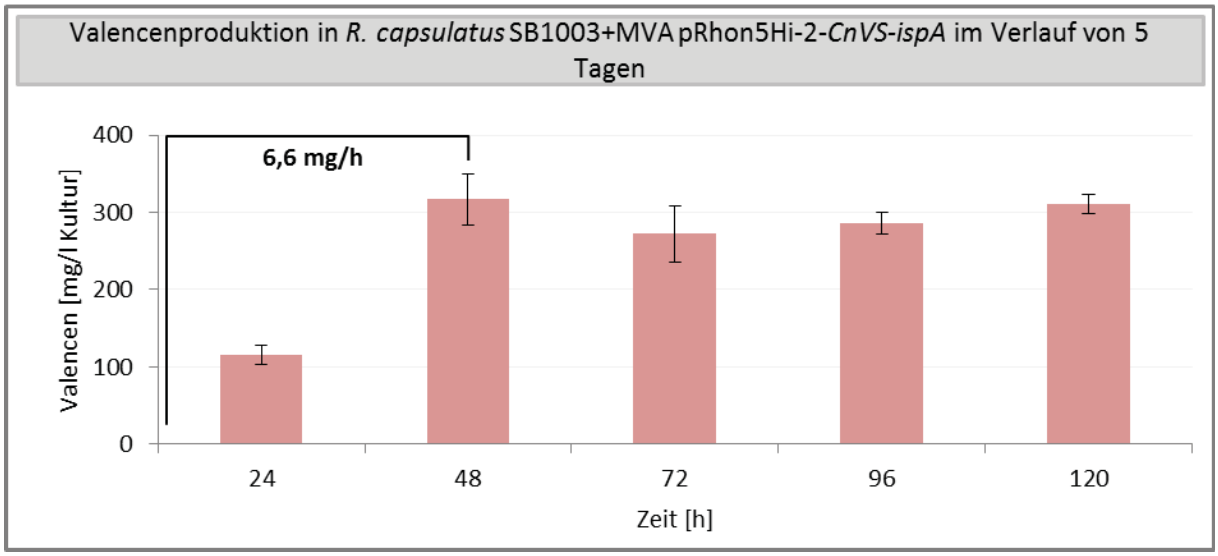

Abb. 23. Bestimmung der maximalen Valencen-Produktionsrate in *R. capsulatus* SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA*.
Es wurde die Valencenkonzentration in n-Dodecan-Proben bestimmt, die aus der Phase über Kulturen des Stammes SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA* stammten, die für 24, 48, 72, 96 und 120 h unter anaeroben Bedingungen kultiviert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Experimenten und ihre zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken und die maximale Produktionsrate von Valencen nach einer Kultivierungsdauer von 48 h.

Nach einer Kultivierungsdauer von 24 h war in dem *R. capsulatus* Stamm SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA* eine Valencenausbeute von 115,2 mg/l nachweisbar, die nach einem weiteren Tag (48 h)

fast verdreifacht wurde, sodass ein Wert von 316,6 mg/l ermittelt werden konnte. Bei der Produktion von Patchoulol konnte ebenfalls zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Steigerung beobachtet werden. Im Gegensatz zu den dort erzielten Ergebnissen konnte durch eine längere Kultivierungsdauer die Valencenausbeute nicht weiter gesteigert werden.

Tab. 14. Übersicht verschiedener Kennzahlen der Valencenproduktion
Zu den Kulturen, deren Kultivierung zu verschiedenen Zeitpunkten (24-120 h) beendet wurden, wurden sowohl die Konzentration an Valencen in mg pro l Kultur und die daraus resultierende Produktionsrate von Valencen in mg/h angegeben. Außerdem ist das Trockengewicht der Zellen der Expressionskulturen, das auf 1 l Kultur extrapoliert wurde, in g und die daraus resultierende Valencenmenge in mg pro g Trockengewicht aufgelistet.

Kultivierung [h]	**Valencen [mg/l]**	**Produktionsrate [mg/h]**	**Trockengewicht [g aus 1 l Kultur]**	**Valencen [mg/gDCW]**
24	115,2	4,8	0,68	169,1
48	316,6	**6,6**	1,51	**210,1**
72	272,1	3,8	1,87	145,4
96	286,4	3,0	2,08	137,6
120	310,5	2,7	1,77	175,5

Nach 48 h konnte, ähnlich wie bei der Patchoulolproduktion, die höchste Produktionsrate ermittelt werden. Im Fall von CnVS betrug sie 6,6 mg/h. Die Produktionsrate nahm nach 48 h ab, da mit zunehmender Kultivierungsdauer die Valencenkonzentration nicht weiter anstieg.

Aus dem Verhältnis des gewogenen Trockengewichts der Zellen in den Expressionskulturen und der Valencenmenge, die aus den 14 ml Expressionskulturvolumen erhalten wurden, konnte die Valencenausbeute in mg pro g Trockengewicht berechnet werden, die nach 48 h einen Wert von 210,1 mg/gDCW erreichte.

Mit dem besten *R. capsulatus* Valencenproduktionsstamm **SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*CnVS-ispA*** konnte nach einer Kultivierungsdauer von **48 h** eine maximale **Produktionsrate** von **6,6 mg/h** und eine **maximale Valencenproduktion** von **316,1 mg/l** bzw. **210,1 mg/gDCW** berechnet werden. Somit konnte durch die Anwendung von *metabolic engineering* und den Einsatz der produktiveren Valencensynthase aus *C. nootkatensis* eine **Steigerung** um das **255-fache** erreicht werden, wenn dabei die anfängliche Ausbeute von 1,3 mg/l als Ausgangswert betrachtet wird, die durch die einfache Expression der Valencensynthase aus *C. sinensis* in *R. capsulatus* SB1003 erhalten wurde.

4 DISKUSSION

Die biotechnologische Terpenoidproduktion hat in den letzten Jahren in der Industrie stark an Bedeutung zugenommen. Dies liegt vor allem an den verschiedensten Einsatzmöglichkeiten von Terpenoiden. Sowohl in der Lebensmittel- als auch in der Kosmetikindustrie werden gerne Sesquiterpenoide wie Valencene oder Nootkaton eingesetzt, da sie den typischen Geruch und Geschmack von Citrusfrüchten hervorrufen. Aber auch andere flüchtige Terpenoide finden industrielle Anwendung, gerne als Duftstoffe in der Parfümindustrie, wie zum Beispiel das Patchouliöl, dessen Duftnote maßgelblich durch Patchoulol bestimmt wird. Dieser Stoff wird bereits, wie auch andere relevante Terpenoide, in industriellem Maßstab biotechnologisch in Mikroorganismen hergestellt. Dies unterstreicht, wie wichtig die Forschung in diesem Gebiet ist. In der Produktion geht es vor allem darum, so viel Endprodukt wie möglich herzustellen. Dabei ist es wichtig einen gut handhabbaren Organismus als Produktionswirt zu verwenden, der in der Lage ist, wirtsfremde Terpenoide zu produzieren und dessen Produktionsleistung hin zu substantiellen Ausbeuten optimierbar ist. *Rhodobacter capsulatus* bietet dafür gute Voraussetzungen aufgrund seines auf die Überproduktion von Carotinoiden angepassten Metabolismus und im Hinblick auf die Ausbildung eines zusätzlichen Membransystems, der ICM, die als Speicherort für hydrophobe Stoffe, wie es Terpenoide sind, dienen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob *R. capsulatus* tatsächlich für die Produktion wirtsfremder Sesquiterpenoide angewendet werden kann und ob durch systematische Implementierung von *metabolic engineering* eine Steigerung zu biotechnologisch relevanten Mengen führen kann. Als Beispiel für die heterologe Terpenoidproduktion in *R. capsulatus* wurde die Produktion des Sesquiterpenoids Patchoulol, welches durch die Patchoulolsynthase PatS aus *Pogostemon cablin* aus FPP zyklisiert wird, optimiert. Dabei stellten sich verschiedene Strategien als besonders effizient, andere wiederum als eher kontraproduktiv dar. Diese Beobachtungen sollen nachfolgend erläutert und mögliche *feedback*-Inhibierungseffekte im Isoprenoidbiosynthesenetzwerk diskutiert werden. Am Beispiel der unterschiedlich effizienten Valencensynthasen CnVS aus *Callitropsis nootkatensis* und ValS aus *Citrus sinensis* wird erklärt, inwieweit ein optimaler Metabolitfluss für die heterologe Terpenoidproduktion von der jeweiligen katalytischen Effizienz der eingesetzten Synthase abhängig ist. Darüber hinaus werden die Produktmengen an Patchoulol und Valencen, die mit *R. capsulatus* erzeugt wurden, mit Werten aus der Literatur verglichen und diskutiert, ob sich *R. capsulatus* als ein alternativer Wirt für die Produktion von industriell relevanten Mengen an Terpenoiden eignet. Des Weiteren werden einige andere Strategien angesprochen, wie die Produktionsleistung von *R. capsulatus* für Terpenoide optimiert werden kann, die sich nicht auf

metabolic engineering stützen. Abschließend wird die zukünftige bioökonomische Anwendung von *R. capsulatus* kritisch beleuchtet.

4.1 M*etabolic engineering* zur gesteigerten Terpenoidproduktion in *R. capsulatus*

Der Begriff *metabolic engineering* fasst in der Biotechnologie weithin eingesetzte Methoden zusammen, die durch genetische Manipulation Einfluss auf zelluläre Prozesse nehmen, und so die Produktion bestimmter Zielsubstanzen steigern. Typisch sind hier die Verbesserung des Metabolit-Zuflusses zu entsprechenden Vorstufen, indem Schritte zu deren Bereitstellung unterstützt werden und das Verringern des Metabolit-Abflusses, indem Konkurrenz-Synthesewege ausgeschaltet oder herabreguliert werden. Im Fall der Terpenoidproduktion ist dies ein äußerst bewährter Ansatz zur Produktionssteigerung (**1.2**). Es ist weiterhin bereits gezeigt worden, dass es bei der Optimierung der Terpenoidproduktion durch *metabolic engineering* darauf ankommt, den Metabolitfluss der einzelnen Biosyntheseschritte optimal abzustimmen, sodass keine Zwischenstufen akkumulieren, da es sonst zu inhibitorischen Effekten kommen kann (Shimada *et al.*, 1998; Cordoba *et al.*, 2009; Leivar *et al.*, 2011; Banerjee *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015), die Einbußen in der Terpenoidakkumulation zur Folge haben. *feedback*-Inhibierung von Intermediaten und Endprodukten ist ein grundlegendes, effektives Regulationsprinzip von Biosynthesewegen, das sicherstellt, dass im Fall einer ausreichenden Bildung eines Produkts dessen Biosynthese inhibiert wird, um einen weiteren Anstieg dieses Produkts zu verhindern. So kann etwa einem nicht nötigen Energieverbrauch in aufwendigen anabolen Prozessen entgegengewirkt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die zusätzliche Expression von Vorstufenbiosynthesegenen mit dem Ziel der Steigerung des Isoprenoidpools nicht in jedem Fall zu einer gesteigerten Terpenoidausbeute führte, sondern diese auch verringern konnte. Im Folgenden werden daher mögliche Regulationen der Terpenoidbiosynthese durch *feedback*-Inhibierung und im Bezug darauf die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse diskutiert.

4.1.1 Regulation der Terpenoidbiosynthese durch *feedback*- und *feedforward*-Inhibierung

Um beurteilen zu können, ob in den hier beschriebenen Fällen Effekte einer *feedback*-Inhibierung ursächlich für die gemachten Beobachtungen sein könnten, sollen im Folgenden zunächst mögliche *feedback*-Inhibierungen, die durch die Akkumulation von Metaboliten des Terpenoidstoffwechsels in *R. capsultus* hervorgerufen werden könnten, erläutert werden (**Abb. 24**).

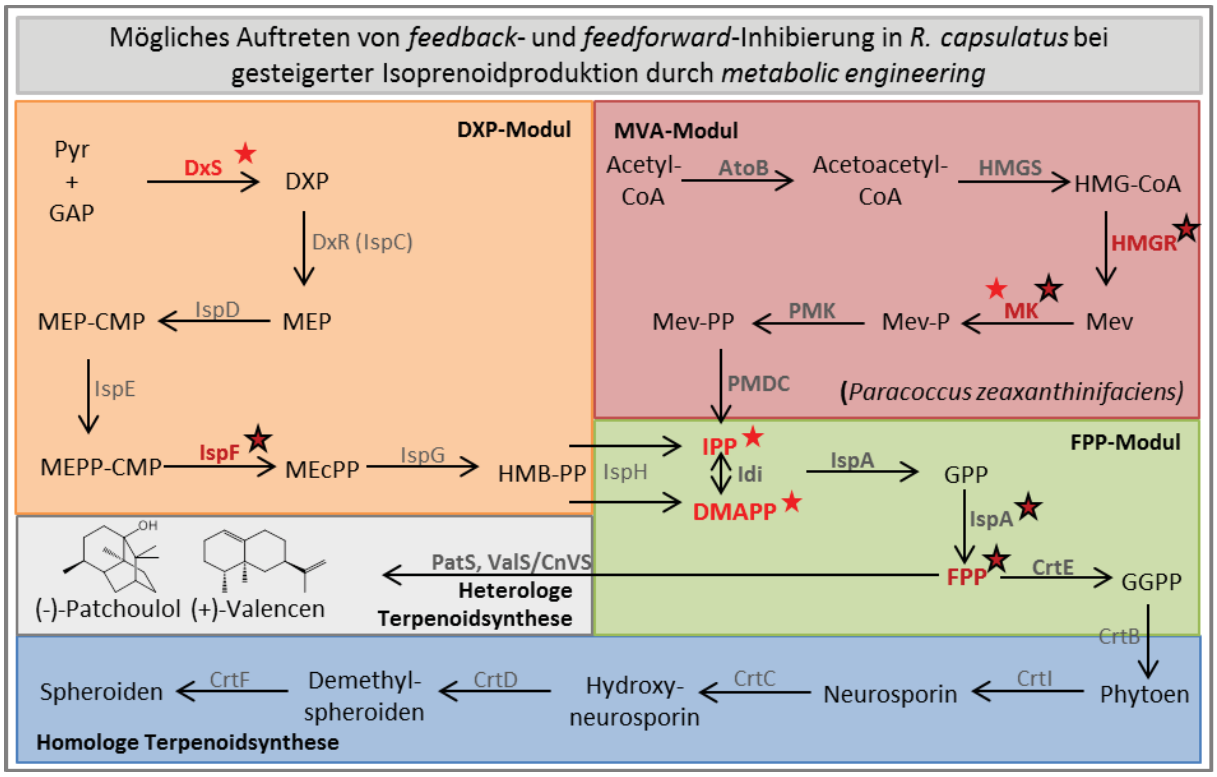

Abb. 24. Mögliches Auftreten von *feedback*- und *feedforward*-Inhibierung in *R. capsulatus* bei gesteigerter Isoprenoidproduktion durch *metabolic engineering*.
Die Isoprenderivate Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) können die 1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Synthase (DxS) aus dem DXP-Modul (orange hinterlegt) inhibieren. Das Prenylpyrophosphat Farnesylpyrophosphat (FPP) kann sowohl die β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMGR) als auch die Mevalonatkinase (MK) aus dem MVA-Modul (rot hinterlegt) inhibieren, ebenso wie die Farnesylpyrophosphatsynthase (IspA) aus dem FPP-Modul (grün hinterlegt) und die MEcPP-Synthase (ispF) aus dem DXP-Modul (orange hinterlegt). Diese Formen der Inhibierungen haben bereits in anderen Organismen Auswirkungen auf die heterologe (grau hinterlegt) und homologe Terpenoidsynthese (blau hinterlegt) gehabt. Hellrote Sterne markieren IPP und DMAPP assoziierte Inhibitionsziele, dunkelrote FPP-assoziierte.
Pyr: Pyruvat; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; DXP: 1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphat; MEP: 2-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat; MEP-CMP: 2-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Cytidylmonophosphat; MEPP-CMP: 2-Methyl-D-Erythritol-2,4-Phosphat-Cytidylmonophosphat; MEcPP: 2-Methyl-D-Erythritol-2,4-cylo-Pyrophosphat; HMB-PP: 1-Hydroxy-2-Methyl-2-Butenylpyrophosphat; HMG-CoA: β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA; Mev: Mevalonat; Mev-P: Mevalonat-5-Phosphat; Mev-PP: Mevalonat-5-Pyrophosphat; GPP: Geranylpyrophosphat; GGPP: Geranylgeranylpyrophosphat; DxR (IspC): DXP-Reduktoisomerase; IspD: MEP-Cytidyltransferase; IspE: MEP-CMP-Kinase; IspG: HMP-PP-Synthase; IspH: HMB-PP-Reduktase; AtoB: Acetoacetyl-CoA-Thiolase; HMGS: HMG-CoA-Synthase; PMK: Mev-P-Kinase; PMDC: Mev-PP-Decarboxylase; Idi: Isopentenylpyrophosphat-Isomerase; CrtE: GGPP-Synthase; CrtB: Phytoensynthase; CrtI: Phytoendesaturase, CrtC: Hydroxyneurosporinsynthase, CrtD: Methoxyneurosporindehydrogenase, CrtF: Spheroidensynthase

Es ist bekannt, dass FPP eine Schlüsselrolle für die Regulation der Isoprenoidbiosynthese in Mikroorganismen einnimmt. Aber auch für andere Pyrophosphate sind regulatorische Einflüsse auf einzelne Biosyntheseschritte beschrieben.

Besonders hervorzuheben ist das Enzym DxS, welches den ersten Schritt im DXP-Biosyntheseweg (orange hinterlegt) katalysiert. In einigen Studien zur DXP-Wegregulation in Pflanzen wurde bereits gezeigt, dass DxS durch die Endprodukte seines Synthesewegs, IPP und DMAPP, inhibiert wird (Banerjee *et al.*, 2013; Banerjee *et al.*, 2016; Ghirardo *et al.*, 2014). Die Isoprenderivate scheinen

dabei mit dem Cofaktor Thiaminpyrophosphat um die Bindung am aktiven Zentrum zu konkurrieren (Banerjee *et al.*, 2013).

Ein weiteres Enzym des DXP-Biosynthesewegs (IspF) scheint über eine *feedback*-Inhibierung reguliert zu sein. Im Jahr 2005 wurde anhand der Struktur von IspF aus *E. coli* eine Allyl-Pyrophosphat Bindetasche vorhergesagt und vermutet, dass diese möglicherweise zur *feedback*-Regulation dienen könne (Kemp *et al.*, 2005). Im Jahr 2012 konnte schließlich in *E. coli* nachgewiesen werden, dass der IspF-MEP Komplex durch FPP inhibiert wird (Bitok & Meyers, 2012).

Ebenfalls durch FPP wird anscheinend die FPP-Synthase aus *S. cerevisiae* (grün hinterlegt; ispA) inhibiert, ebenso wie die HMGR aus dem Mevalonat-Biosyntheseweg (rot hinterlegt). Dies konnte durch den Abbruch der Ergosterolsynthese durch den *knockout* der Squalensynthase (SQS) beobachtet werden, der dazu führte, dass die Aktivitäten von FPPS um 78 % und die von HMGR um 83 % reprimiert wurden. Es wurde vermutet, dass die wirtseigene FPP-abhängige Dolicholsynthese das Übermaß an FPP nicht abfangen konnte, sodass es zu dieser Inhibierung kam (Szkopińska *et al.*, 2000). Dieses Jahr konnte gezeigt werden, dass die humane FPPS durch FPP inhibiert wird und es konnte anhand der Proteinstruktur eine allosterische Bindestelle nahe des aktiven Zentrums nachgewiesen werden, an die FPP binden kann (Park *et al.*, 2017). Andere Untersuchungen in *S. cerevisiae* konnten ebenfalls zeigen, dass die HMGR eine große Rolle in der Regulation des MVA-Biosynthesewegs aufweist und durch FPP inhibiert wird (Dimster-Denk *et al.*, 1994; Donald *et al.*, 1997; Ro *et al.*, 2006; Verwaal *et al.*, 2007; Paradise *et al.*, 2008). Neben der HMGR wird auch die Mevalonatkinase (MK), die den darauf folgenden Schritt im MVA-Biosyntheseweg katalysiert, in verschiedenen Organsimen inhibiert (Whited *et al.*, 2010; Beatty *et al.*, 2013; Beck *et al.*, 2013; Calabria *et al.*, 2013). Schon vor vielen Jahren konnte die kompetitive Inhibierung der humanen MK durch IPP und DMAPP (Hindson *et al.*, 1997), sowie durch FPP und GPP (Dorsey & Porter, 1968; Schafer *et al.*, 1992) nachgewiesen werden. Zudem wurde beschrieben, dass FPPS wie IspA durch *feedforward*-Inhibierung durch IPP und DMAPP in ihrer Aktivität gehemmt werden können, wie für die humane FPPS gezeigt (Kavanagh *et al.*, 2006).

Außerdem gibt es *feedback*-Inhibierungen, die nicht auf Ebene der Enzymaktivität stattfinden, sondern zum Beispiel auf transkriptioneller (Hemmerlin *et al.*, 2012; Patra *et al.*, 2013) und post-transkriptioneller Ebene, wie es im Fall von DxS aus *Arabidopsis thaliana* der Fall ist (Kobayashi *et al.*, 2007).

Die genannten Ansatzpunkte für eine Inhibierung durch Terpenvorstufen sind zwar nicht für *R. capsulatus* nachgewiesen worden, doch aufgrund der weiten Verbreitung des MVA und DXP-Biosynthesewegs in allen Bereichen der Natur, könnte davon ausgegangen werden, dass nicht nur die

Isoprenoid-Biosynthese, sondern auch deren Regulation stark konserviert ist, zumal immer wieder dieselben Enzyme als entscheidend bei der Regulation bezeichnet werden.

4.1.2 Einfluss verschiedener *metabolic engineering* Strategien auf die Produktion wirtsfremder Sesquiterpenoide in *R. capsulatus*

Die Auswirkungen der Modifikation einzelner Biosynthese-Module in Bezug auf die Verbesserung oder Verschlechterung der Terpenproduktion in *R. capsulatus* werden hier unter Hinzunahme der Ergebnisse, die mit den einzelnen Terpensynthasen PatS, ValS und CnVS erhalten wurden, zusammengefasst (**Tab. 15**) und im Hinblick auf mögliche *feedback*-Inhibierung (**4.1.1**) erläutert.

Bei Expression der in dieser Arbeit verwendeten Terpensynthasegene hat die Coexpression von IspA in dem *R. capsulatus* Wildtypstamm SB1003 jedes Mal zu einer Verbesserung der Terpenproduktion geführt. Die Begründung ist vermutlich, dass durch die vermehrte Expression von IspA durch die Coexpression die Umsatzrate dieses Biosyntheseschritts stieg und somit wahrscheinlich mehr FPP für die Umsetzung durch die verschiedenen Terpensynthasen zu den entsprechenden Terpenoidprodukten zur Verfügung stand. Dies bedeutete gleichzeitig, dass die maximal durch die Terpensynthasen umsetzbaren FPP-Mengen ohne die Coexpression von IspA noch nicht erreicht sein konnten.

Durch die Coexpression des MVA-Operons konnte sogar im Falle von PatS und CnVS eine weitere deutliche Steigerung erreicht werden. Dies könnte dadurch begründet sein, dass durch den zusätzlichen Syntheseweg wahrscheinlich mehr IPP und DMAPP zur Verfügung stand und somit die Umsetzung zu FPP durch IspA weiter ansteigen konnte. Anscheinend war dieser indirekte Effekt auf die FPP-Substratmenge somit stärker, als der vorher durch IspA-Coexpression erreichte, sodass noch mehr FPP gebildet wurde und die Umsetzung dieses Substrats durch die Terpensynthasen somit weiter ansteigen konnte. Das bedeutet, dass die durch Coexpression von IspA erreichte FPP-Konzentration noch nicht die maximal durch die Synthasen umsetzbaren Mengen erreicht hatte. Im Fall von ValS ist es schwierig, eine Aussage zu treffen, da wie schon erwähnt die Produktmengen so gering waren, dass sie nahe am Detektionslimit lagen und eine valide Quantifizierung erschwert war.

Durch die Kombination der modifizierten FPP- und DXP- Module (+*ispA-dxs-idi*) konnte bei der heterologen Expression von PatS und ValS eine ähnliche oder im Falle von ValS eine größere Steigerung erreicht werden, als durch die Coexpression des MVA-Operons. Durch die Modifizierung des DXP-Wegs wurde vermutlich mehr IPP und DMAPP produziert, was zu einer gesteigerten Auslastung von IspA geführt haben könnte. Durch die gleichzeitige Coexpression von IspA könnte sich hier außerdem die Enzymmenge erhöht haben, sodass möglicherweise die Umsatzrate dieses Schrittes noch weiter anstieg und mehr FPP gebildet werden konnte, was dann zu einer stärkeren

Terpenoidproduktausbeute führte als die, die durch die reine Coexpression des MVA-Operons erreicht werden konnte. Im Falle der CnVS führte diese Kombination allerdings zu einer geringeren Verbesserung als durch die Coexpression der MVA-Gene. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass hier inhibitorische Effekte einen Einfluss haben könnten. Die Tatsache, dass bei den anderen Synthasen dieser Effekt nicht beobachtet werden konnte, könnte darauf hindeuten, dass dies an der Aktivität der Terpensynthase liegen könnte. Möglicherweise wurde die maximal durch die CnVS umsetzbare Substratmenge unter diesen Bedingungen erreicht. Das bedeutet, dass sich FPP angereichert haben könnte, was dazu geführt haben könnte, dass die Triebkraft der IspA-vermittelten Reaktion in Richtung FPP nachließ oder es möglicherweise zu inhibitorischen Auswirkungen auf IspA und/oder den MVA-Weg oder DXP-Weg geführt haben könnte. Außerdem würde eine schlechtere Umsetzung durch IspA auch zu einem Anstieg der Isoprenderivate IPP und DMAPP führen, die wiederum, sowohl auf den DXP-Weg als auch MVA-Weg negativ regulierend wirken können (s.o. **Abb. 24**). Wo genau der limitierende Schritt liegt, kann mit der momentanen Datenlage nicht näher bestimmt werden. Dazu sind weitere Analysen zur Bestimmung der Mengen der Intermediate nötig.

Die Optimierung aller Module in *R. capsulatus* durch die Verwendung des Vektors pRhon5Hi-2-*TS-ispA-dxs-idi-MVA* in dem Stamm SB1003 führte bei jeder Expression der jeweiligen Terpensynthasen (TS) zu einer extremen Verschlechterung der Terpenausbeute, bei PatS und ValS sogar soweit, dass die Terpenmengen nicht mehr detektierbar waren, was ebenfalls auf inhibitorische Effekte hindeutet. Eventuell hat die zusätzliche Expression des MVA-Moduls zu den anderen optimierten Modulen dazu geführt, dass so viel IPP und DMAPP gebildet werden konnte, dass die maximal umsetzbaren Mengen der vorliegenden IspA-Konzentration erreicht wurden und sich die Vorläufermoleküle angereichert haben könnten, und sich somit negativ auf den DXP- und MVA-Weg ausgewirkt haben könnten. Es könnte aber auch zu einer weiteren Steigerung der FPP-Mengen durch IspA-Katalyse geführt haben. Dies würde bedeuten, dass die Kapazität der Terpensynthasen zur Umsetzung von FPP möglicherweise erreicht wurde und sich somit FPP angereichert haben müsste, was wieder zu einer negativen Regulierung der zwei Isoprenoid-Biosynthesewege geführt hätte. Am wahrscheinlichsten ist aber, dass die Anreicherung von IPP und DMAPP zu einer *feedforward*-Inhibierung von IspA führte. Dies würde auch erklären, warum kaum detektierbare Mengen an Terpenoiden erhalten werden konnten. Wenn die anderen Theorien zutreffen würden, hätte sich zumindest ein moderates Level an Terpenoiden bilden müssen, denn die Inhibierungen wären im Gegensatz zur *feedforward*-Inhibierung nicht von Dauer gewesen. Sobald die Vorstufen, die durch ihre Anreicherung inhibitorische Effekte ausübten, verstoffwechselt würden, würde die Inhibierung aufgehoben werden, bis sie erneut inhibitorische Mengen durch Akkumulation erreicht hätten.

Welcher Fall nun tatsächlich eingetreten war, kann wie auch schon zuvor nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, da die aktuelle Datenlage diese Schlüsse nicht zulässt. Auch hier wäre eine Analyse der Akkumulation der Vorläufermoleküle als sinnvoll anzusehen.

Tab. 15. Übersicht über die Effekte der modifizierten Module auf die Terpenproduktion.
Die Terpenausbeuten an Patchoulol (Expression von PatS) bzw. Valencen (Expression von ValS bzw. CnVS), die in den *R. capsulatus* Stämmen SB1003 und SB1003+MVA (-) im Vergleich zur zusätzlichen plasmidbasierten Coexpression der modifizierten Module FPP (*ispA*) und DXP (*dxs+idi*) und des MVA-Operons erreicht wurden, sind symbolisch durch + und - gekennzeichnet. (+ = Steigerung, - = Abnahme im Vergleich zur heterologen Expression der Terpensynthasen in *R. capsulatus* SB1003, dessen Terpentiter symbolisch mit ± bezeichnet ist).

Stamm	Plasmidbasierte Coexpression	PatS	ValS	CnVS
SB1003	-	±	±	±
	+*ispA*	+	+	+
	+*MVA*	+ +	+	+ +
	+*ispA-dxs-idi*	+ +	+ +	+
	+*ispA-dxs-idi-MVA*	-	-	-
SB1003+MVA	-	+	+	+
	+*ispA*	+ + +	+ + +	**+ + + +**
	+*MVA*	+ + / + + +	+ +	+ +
	+*ispA-dxs-idi*	**+ + + +**	**+ + + +**	+ + +
	+*ispA-dxs-idi-MVA*	-	-	±

Die Integration des MVA-Operons von *P. zeaxanthinifaciens* ins Genom von *R. capsulatus* SB1003 führte zu einer allgemeinen Steigerung der Terpenmengen, die in Kombination mit der plasmidbasierten Coexpression von IspA zu einem großen Anstieg führte. Dieser war so groß, dass die Terpenausbeuten deutlich höher waren, als die, die mit jeder Optimierungsstrategie im Wildtyp erreicht wurden. Dies liegt mit großer Wahrscheinlichkeit daran, dass die Bildung von FPP, die schon durch die gesteigerten Mengen an IPP und DMAPP erhöht wurde, durch die zusätzliche Erhöhung der IspA Konzentration durch deren Coexpression weiter verbesserte, was zu einer gleichzeitigen Steigerung der Terpenoidendprodukte geführt haben könnte.

Die zusätzliche plasmidbasierte Coexpression des MVA-Operons zu der genombasierten Kopie führte in jedem Fall zu einer Steigerung der Terpenproduktion im Vergleich zur reinen genombasierten Coexpression des MVA-Operons. Dies lag vermutlich an einer so erreichten höheren Akkumulation der MVA-Enzyme, die zu einer Konzentrationssteigerung von IPP und DMAPP führte, sodass von IspA schneller FPP produziert wurde und somit mehr FPP für die Terpensynthasen vorlag, die diese zyklisierten. Im Vergleich führte es aber zu einer geringeren Verbesserung als durch die plasmidbasierte Coexpression von IspA in der Mutante *R. capsulatus* SB1003+MVA, was vermutlich daran lag, dass die maximal umsetzbare Substratkonzentration der vorhandenen IspA-Enyzme erreicht wurde und somit IspA hier der limitierende Faktor gewesen sein könnte.

Die Kombination der optimierten FPP und DXP-Module (+*ispA-dxs-idi*) mit der Mutante *R. capsulatus* SB1003+MVA sorgten in allen Fällen wieder zu einer Steigerung der Terpentiter im Vergleich zur genom- und plasmidbasierten Coexpression des MVA-Operons. In den Fällen von PatS und ValS, waren die erreichten Titer nochmal deutlich höher als die, die durch die Coexpression von IspA in *R. capsulatus* SB1003+MVA erreicht werden konnten. Anscheinend waren in diesen Fällen die maximal von IspA, PatS und ValS umsetzbaren Substratkonzentrationen noch nicht erreicht, sodass die gesteigerte Produktion von IPP und DMAPP an diesen Schritten zu einer weiter erhöhten Produktbildung führen konnte. Im Falle von CnVS war der erreichte Titer allerdings geringer als der durch die Coexpression von IspA in der Mutante SB1003+MVA erhaltene. Der Grund ist vermutlich hierbei, dass die Umsatzrate von CnVS ihr Maximum erreicht hatte, sodass es zu einer langsamen Anreicherung an FPP kam, was schlussendlich zu der etwas schlechteren Ausbeute an Valencen geführt hatte. Dieser Unterschied verdeutlicht, dass die Anpassung des Metabolitflusses durch *metabolic engineering* von der jeweiligen Terpensynthase, wahrscheinlich durch ihre entsprechende Aktivität, abhängt.

Wie schon im *R. capsulatus* Wildtyp SB1003 zuvor beschrieben, führte bei Verwendung der gewählten Terpensynthasen die zusätzliche Coexpression aller als geschwindigkeitsbestimmend geltenden Gene der verschiedenen Module zur Genomintegration des MVA-Operons zu einer extremen Verschlechterung der Terpenausbeuten im Vergleich zur reinen Synthase-Expression ohne Optimierung (s.o). Es könnte sogar sein, dass in diesen Fällen gar nicht die Terpensynthasen an ihre Leistungsgrenze geraten, sondern IspA hier der limitierende Schritt ist. Es könnte sich um eine Form der *feedforward*-Inhibierung, wie sie schon für die humane FPPS beschrieben werden konnte (Kavanagh *et al.*, 2006), handeln. Das lässt sich allerdings mit der vorliegenden Datenlage nicht bestimmen, sondern nur mit weiteren Metabolitanalysen.

Neben einer möglichen *feedback*- und *feedforward*-Inhibierung können bei der heterologen Terpenproduktion und Anwendung von *metabolic engineering* weitere Aspekte relevant werden, die sich auf die final erhaltene Menge des Zielproduktes auswirken könnten: Durch den gesteigerten Metabolifluss des DXP-Biosynthesewegs und durch die zusätzliche Implementierung des heterologen MVA-Biosynthesewegs, könnte es zu einem massiven Abzug der zentralen C-Körper Malat, Pyruvat und Acetyl-CoA, die die Ausgangsstoffe für die einzelnen Isoprenoidbiosynthesewege bilden, aus dem Primärstoffwechsel führen. Dies könnte im extremen Fall eventuell zu Wachstumsdefekten und möglicherweise zu stressbedingt erhöhter Plasmidinstabilität führen. Der Eintritt dieser Fälle hätte negative Auswirkungen auf die Produktion. Um dies zu umgehen, könnte im Fall von P_{nif}-basierter Genexpression die Verwendung von Autoinduktionsmedium von Vorteil sein. Dabei werden dem RCV-Medium neben Serin als alternative Stickstoffquelle geringe Mengen an Ammonium zugesetzt,

so können die Zellen zunächst ohne Stress, der durch die heterologe Genexpression ausgelöst werden könnte, wachsen. Die Induktion der P_{nif}-kontrollierten Gene tritt erst zu dem Zeitpunkt ein, an dem alles Ammonium aufgebraucht ist. Eine Kultivierung auf anderen Kohlenstoffquellen als Malat könnte eventuell auch als mögliche Alternative evaluiert werden.

Ein weiterer Aspekt, der entscheidend für eine erfolgreiche Produktion ist, stellt die Produktverträglichkeit mit den Produzentenzellen dar, gerade im Hinblick auf die häufig antibakteriellen Eigenschaften von Terpenoiden. Bei einer durch *metabolic engineering* gestützten Produktion substantieller Mengen in zu kurzer Zeit könnte es somit zum Beispiel zu negativen Effekten auf den Zellmetabolismus kommen, der sich wiederum in unsteten Ausbeuten äußern kann. Diese Effekte könnten eventuell durch den Einsatz von *R. capsulatus* Kapselmutanten verhindert werden, da durch eine geringere Kapselschicht eine bessere Zellgängigkeit von hydrophoben Stoffen erreicht werden könnte.

4.1.3 Einfluss der katalytischen Effizienz von Terpensynthasen auf die Produktion wirtsfremder Sesquiterpenoide in *R. capsulatus*

Wie sich im Kapitel zuvor schon andeutete, scheint sich die Wahl der Terpensynthase darauf auszuwirken, welche *engineering*-Strategien zur jeweils besten Terpenoidausbeute führen. Gerade im Fall der zwei Valencensynthasen ValS aus der Orange *C. sinensis* und CnVS aus der Nootka-Scheinzypresse *C. nootkatensis* wird dies deutlich. Da die alleinige Expression von CnVS zu einer deutlich besseren Ausbeute als die von ValS geführt hatte, war zunächst davon auszugehen, dass für die Valencenproduktion mit CnVS eine höhere Vorstufenbereitstellung als mit ValS zur besten Produktausbeute führen würde. Dies war allerdings nicht der Fall, denn für ValS konnte die größte Menge an Valencen mit dem *R. capsulatus* Stamm SB1003+MVA pRhon5Hi-2-*ispA-dxs-idi* (46,2 mg/l), bei dem alle entscheidenden Enzyme der verschiedenen Module zu einer Steigerung der Vorstufensynthese coexpremiert wurden, produziert werden. Für CnVS mit demselben Stamm, konnte aber in Kombination mit dem Vektor pRhon5Hi-2-*ispA*, bei dem keine zusätzliche Optimierung des DXP-Wegs stattfand, am meisten Valencen (324 mg/l) erzeugt werden. Im Fall der CnVS führte, wie schon erwähnt, die weitere Optimierung durch die zusätzliche Coexpression aller entscheidenden Enzyme des DXP- und FPP-Moduls, was zu einer weiteren Steigerung der Vorstufen IPP und DMAPP führen sollte, zu einer Verschlechterung der Valencenausbeute gegenüber der einfachen Coexpression von IspA. Da diese Kombination an Coexpressionen aber im Fall von ValS zu einer weiteren Steigerung führte, kann nicht IspA der limitierende Schritt gewesen sein. Es liegt nahe, dass es an der Synthase lag. In der katalytischen Effizienz der beiden Synthasen, die sich aus dem Verhältnis der Wechselzahl (k_{cat}) und der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) der jeweiligen Terpensynthasen ergibt (**Tab. 16**), liegt die Ursache wahrscheinlich begründet.

Tab. 16. Kinetische Konstanten der Terpensynthasen ValS, CnVS und PatS.
Die Wechselzahl k_{cat} und die Michaelis-Menten-Konstante K_M, ebenso wie die Spezifitätskonstante, die sich aus dem Verhältnis der erstgenannten bildet, sind dargestellt mit Angabe der entsprechenden Referenzen.

Enzym	K_M [µM]	k_{cat} [1/s]	k_{cat}/K_M [l/(mol s)]	Referenz
ValS	0,52 ± 0,1	0,0025 ± 0,0008	$5{,}0x10^3 \pm 2{,}7x10^3$	(Beekwilder *et al.*, 2014)
CnVS	1,04 ± 0,36	0,0032 ± 0,0012	$3{,}4x10^3 \pm 1{,}0x10^3$	
PatS	4,45 ± 0,56	0,00043	$0{,}1x10^3$	(Deguerry *et al.*, 2006)
	6,8 ± 0,5	0,03	$4{,}4x10^3$	(Munck & Croteau, 1990)

Die Geschwindigkeitskonstante, oder auch Wechselzahl (k_{cat}) genannt, gibt an wieviele Substratmoleküle von einem einzigen Enzymmolekül in Produkt umgewandelt werden, wenn das Enzym mit Substrat gesättigt ist. Und die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) gibt an, bei welcher Substratkonzentration die halbmaximale Geschwindigkeit der Reaktion erreicht ist. Beide katalytischen Parameter können bei der Charakterisierung und dem Vergleich von Enzymen für sich nützlich sein. Allerdings können die Parameter alleine keine Aussage über die katalytische Effizienz eines Enzyms zulassen. Durch ihr Verhältnis ergibt sich aber für jedes Enzym eine Spezifitätskonstante, die die katalytische Effizienz widerspiegelt und das beste Maß für den Vergleich verschiedener Enzyme ist (Nelson & Cox, 2009).

Beim Vergleich der kinetischen Parameter von ValS und CnVS zeigt sich, dass diese Enzyme sich in Bezug auf k_{cat} kaum unterscheiden, sodass die deutlichen Ergebnisunterschiede nicht auf Abweichungen in diesem Parameter zurückzuführen sind. Allerdings hat ValS einen um die Hälfte kleineren K_M-Wert als CnVS. Dieser Unterschied mag Anlass zu Spekulationen geben. Da der K_M-Wert unter der Voraussetzung, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion die Substratbindung an das Enzym ist, als Maß für die Affinität eines Enzyms gegenüber seinem Substrat betrachtet werden kann, könnte somit angenommen werden, dass die Wahrscheinlichkeit, bei gleichen Enzymmengen gleiche Mengen an FPP zu binden, bei CnVS geringer ist, als es bei ValS der Fall ist. Somit könnten bei Expression der CnVS mehr Substratmoleküle ungebunden vorliegen und so an verschiedenen Stellen inhibitorisch wirken. Dadurch könnten die bei der Expression der CnVS auftretenden Produktionseinbußen bei maximaler Stammoptimierung zur FPP-Steigerung erklärt werden. Bei Expression von ValS würden möglicherweise niedrigere Konzentrationen an freiem FPP vorliegen, die so zu keiner negativen Regulierung führen, sodass hier bis zur maximalen Stammoptimierung eine Produktionssteigerung erreicht werden konnte. Allerdings treten die Voraussetzungen, dass die Substratbindung an das Enzym den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, nur bei den wenigsten Enzymen ein, sodass der K_M-Wert in den seltensten Fällen als Maß für die Substrataffinität dienen kann (Nelson & Cox, 2009). Die beschriebene Theorie widerspricht zudem den Ergebnissen, die mit PatS erhalten wurden, denn der K_M-Wert ist hier

deutlich höher, als der von CnVS. Dies könnte der oben angeführten Hypothese folgend eine geringere Substrataffinität anzeigen, und würde demnach aufgrund von grundsätzlich höheren Leveln an freiem FPP eine extrem hohe Anfälligkeit gegenüber *feedback*-Inhibierung bei Stammoptimierung zur verstärkten FPP-Bildung bedeuten. Aber es konnten mit denselben Optimierungen wie für ValS die besten Ausbeuten erzielt werden. Die beschriebenen Annahmen fußen zudem auf der Annahme, dass gleiche Enzymkonzentrationen durch die heterologe Expression in *R. capsulatus* produziert werden, und so eine vergleichbare Anzahl Bindestellen für FPP vorliegt. Da dies nicht bekannt ist, können also diesbezüglich keine Vergleiche angestellt werden.

Entscheidend scheint tatsächlich die Spezifitätskonstante (k_{cat}/K_M) zu sein. ValS weist mit einem Wert von etwa $5{,}0x10^3$ l/(mol s) eine höhere katalytische Effizienz als CnVS mit einem Wert von etwa $3{,}4x10^3$ l/(mol s) auf. Im Fall von PatS ist es etwas problematisch, die Spezifitätskonstante zu bestimmen, da in zwei verschiedenen Veröffentlichungen zwei sich um das 100-fache unterscheidende k_{cat}-Werte angegeben wurden. Da Deguerry *et al.* (2006) in Bezug auf k_{cat} selber anmerkten, dass der bestimmte k_{cat}-Wert um das 100-fache von normalerweise erhaltenen k_{cat}-Werten von Terpensynthasen abweicht, ist es vermutlich besser mit den Werten von Munck & Croteau (1990) zu arbeiten. Ausgehend von diesen Werten konnte für PatS eine Spezifitätskonstante von $4{,}4x10^3$ l/(mol s) berechnet werden, die genau zwischen den Werten von ValS und CnVS liegt. Dies kann erklären, dass bei Expression von PatS ebenfalls wie bei Expression von ValS eine sehr effiziente Bereitstellung von FPP durch die Verwendung des *R. capsulatus* Stammes pRhon5Hi-2-*TS-ispA-dxs-idi* zur besten Produktausbeute führte. Somit wäre zwischen der katalytischen Effizienz der CnVS ($3{,}4x10^3$ l/(mol s)) und der von PatS von ($4{,}4x10^3$ l/(mol s)) eine Grenze erreicht, bei der die Vorstufe FPP nicht mehr so schnell umgesetzt wird, wie sie gebildet wird. Dies hätte zur Folge, dass sich FPP mit der Zeit anreichert und schlussendlich zu bestimmten inhibitorischen Effekten führt, die wiederum bedingen, dass sich der Stoffwechsel der Isoprenoidproduktion verlangsamt, sodass sich auch die Terpenoidproduktausbeute im Vergleich verschlechtert.

Interessant ist weiterhin, dass mit der Valencensynthase mit der vermeintlich schlechteren katalytischen Effizienz (CnVS) dennoch die größeren Ausbeuten (7-fach mehr als mit ValS in dem optimalsten Stamm) erreicht werden konnten. Dieses Phänomen konnte von Beekwilder *et al.* (2014) ebenfalls beobachtet werden. Ihre Begründung lautete, dass die Terpensynthase CnVS sowohl eine höhere Proteinakkumlation *in vivo* in *R. sphaeroides* zeigte als auch *in vitro* deutlich robuster in Bezug auf nicht optimale Temperatur und pH-Werte reagierte und in diesen Fällen mehr Valencen produzierte als ValS aus der Orange, die unter diesen Umständen dazu neigte, mehr Germacren A als Nebenprodukt zu produzieren (Beekwilder *et al.*, 2014).

Zusammenfassend bedeutet dies, wie es sich schon durch andere Studien angedeutet hatte (Ajikumar *et al.*, 2010; Keasling *et al.*, 2010; Westfall *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015), dass es entscheidend ist, den Metabolitfluss so einzustellen, dass er an die Umsatzrate aller an der Biosynthese des wirtsfremden Trepenoids beteiligten Enzyme perfekt angepasst ist, sodass die maximal erreichbare Menge an Terpenendprodukt hergestellt werden kann. Das heißt, dass es nicht nur den einen perfekten *R. capsulatus* Produktionsstamm für wirtsfremde Terpenoide gibt. In dieser Arbeit konnte für *R. capsulatus* ein ganzes Set an Expressionsvektoren, durch die verschiedene *engineering*-Strategien verfolgt werden können, erzeugt werden. Somit kann in zukünftigen Studien für jede Terpensynthase das passende *metabolic engineering* Konzept bestimmt werden, mit dem eine gute Ausbeute erlangt werden kann. Für besonders aktive Terpensynthasen wäre demnach der Stamm *R. capsulatus* SB1003+MVA mit dem Vektor pRhon5Hi-2-*TS-ispA-dxs-idi* am vielversprechendsten, für etwas weniger effiziente Enzyme würde sich wiederrum der Stamm SB1003+MVA, der den Vektor pRhon5Hi-2-*TS-ispA* trägt, eignen. Für deutlich weniger effiziente Synthasen müsste ein Konzept gewählt werden, in dem die Vorstufenbereitstellung noch langsamer vonstattengeht. Das kann so weit gehen, dass der Metabolitfluss so gut wie gar nicht angepasst werden darf, wie es im Falle der Squalensynthase aus *A. thaliana* der Fall war (Weber, 2016), die ebenfalls in *R. capsulatus* exprimiert wurde. Hier führte jede Coexpression von Vorstufenbiosynthesegenen zu Produkteinbußen. Nur die Unterbrechung der natürlichen Carotinoidproduktion durch den *knockout* des GPPS-Gens *crtE* konnte unter mikroaeroben Bedingungen zu einer 4-fachen Steigerung des Produkttiters führen (Gora, 2015).

Da die Charakteristika einer Terpensynthaseaktivität *in vivo* nie ohne Messung der Kinetik vorausgesagt werden können, wird bei der Expression von nicht näher charakterisierten Enzymen immer empirisch ermittelt werden müssen, welches *metabolic engineering* Konzept optimal geeignet ist. Durch Testen der oben genannten drei Stämme mit den entsprechenden Vektoren, die viel, intermediär und wenig FPP zur Verfügung stellen sollen, kann eine initiale Charakterisierung der Produktionskapazität einer neuen Synthase ermöglicht werden, woraufhin eine detaillierte Optimierung im vielversprechenden Bereich folgen kann. Außerdem ist dieses Vorgehen gerade im Hinblick auf mögliche Produkttoxizitäten vorteilhaft, so wird wohl für besonders toxische Produkte ein Konzept mit einer geringeren Vorstufenbereitstellung zu besseren Ergebnissen führen, als ein Konzept, welches die Vorstufenbiosynthese besonders unterstützt.

Es konnte eindeutig festgestellt werden, dass *metabolic engineering* auch bei der Verwendung von *R. capsulatus* als heterologen Produktionsstamm für Terpenoide eine wirkungsvolle Strategie darstellt. Allerdings scheint der Grad der Stammoptimierung spezifisch für jede Terpensynthase zu sein, vermutlich abhängig von der katalytischen Effizienz des jeweiligen Enzyms.

4.2 Stellt *Rhodobacter capsulatus* einen alternativen Plattformorgansimus für die heterologe Terpenproduktion dar?

In vielen Fällen ist bisher der natürliche Produzent die einzige Quelle für bestimmte Terpenoide. Die chemische Synthese ist zwar manchmal möglich, aber im großen Maßstab aufgrund von schwierigen Synthesen und der sehr geringen Produktausbeuten nicht ökonomisch. Aus diesem Grund ist eine biotechnologische Produktion für diese Stoffklasse von großer Bedeutung. Dies kann insbesondere in Organismen, deren entsprechende Biosynthesewege optimiert wurden, erreicht werden (Chandran *et al.*, 2011). Ein Wirtsorganismus, der sich für die flexible Herstellung der verschiedensten Terpenoide eignet, ist bisher jedoch noch nicht gefunden worden. Optimale Voraussetzung bringt das phototrophe Purpurbakterium *R. capsulatus* mit, denn neben seiner Eigenschaft Carotinoide unter phototrophen Bedingungen überzuproduzieren, hat das Bakterium die physiologische Besonderheit, unter diesen Bedinungen ein zusätzliches Membransystem auszubilden, was zu einer Membranvergrößerung um das 3 - 9-fache führen kann (Drews & Golecki, 1995). Dies stellt einen Vorteil gegenüber anderen Organsimen dar, denn die Membran kann als Speicherort für membranassoziierte Enzyme und hydrophobe Substanzen dienen.

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit galt der Beurteilung, ob sich *R. capsulatus* als ein alternativer Plattformorganismus für die heterologe Terpenoidproduktion in hohen Mengen eignet. Dafür werden zunächst die in dieser Arbeit maximal erreichten Mengen an Patchoulol und Valencen mit den Ergebnissen anderer Studien verglichen.

Für die mikrobiologische Valencenproduktion gibt es bereits einige Beispiele: Erst im letzten Jahr konnte in *C. glutamicum* durch die Expression der CnVS, deren DNA-Sequenz kodonoptimiert und identisch mit der in dieser Arbeit verwendeten CnVS-DNA-Sequenz war, eine Valencenausbeute von 41,0 mg/l und einer Produktionsrate von 1,46 mg/h durch Stammoptimierung (Coexpression von *ispA* aus *E. coli* und der Stamm-eigenen Gene *dxs* und *idi*) in Kombination mit einer Licht-gesteuerten Expression erreicht werden (Binder *et al.*, 2016). Auch in einem nicht optimierten *S. cerevisiae*-Stamm (1,36 mg/l; 18 µg/h) (Beekwilder *et al.*, 2014) und in einem *Schizophyllum commune*-Stamm (16,6 mg/l; 115 µg/h) (Scholtmeijer *et al.*, 2014) konnte bereits Valencen produziert werden. Die höchste bisher bekannte Ausbeute wurde allerdings in einem optimierten *R. sphaeroides*-Stamm erhalten. Durch die plasmidbasierte Coexpression des MVA-Operons aus *P. zeaxanthinifaciens* konnte eine maximale Valencenproduktion von 352 mg/l und eine Produktionsrate von 4,89 mg/h erreicht werden (Beekwilder *et al.*, 2014). Beim Vergleich mit diesen Daten wird deutlich, dass die in der vorliegenden Arbeit in *R. capsulatus* maximal erreichten Ausbeuten von 324 mg/l (210,1 mg/gDCW) sich in derselben Größenordnung befinden und somit laut Beekwilder *et al.* (2014)

industriell relevante Mengen produziert wurden. Die hier bei Verwendung von *R. capsulatus* erreichte Produktivität liegt mit 6,6 mg/h sogar über der zuvor gezeigten (4,89 mg/h), die durch die Kultivierung von *R. sphaeroides* erhalten wurde. Bei der Kultivierung von *R. sphaeroides* wurde der Valencentiter nach 72 h gemessen, wohingegen bei dem *R. capsulatus*-Ansatz dieser Arbeit schon nach 48 h der Maximaltiter an Valencen erreicht wurde.

Auch für die mikrobielle Patchoulolproduktion gibt es einige Beispiele vor allem unter Anwendung von *S. cerevisiae*: Es konnte durch eine verminderte Expression des Gens, das für die SQS aus der Hefe (Erg9) kodiert und mit PatS um FPP konkurriert, eine Patchoulolausbeute von 16,9 mg/l erreicht werden (Asadollahi *et al.*, 2008). Durch die gleichzeitige Coexpression der verkürzten HMGR (tHmg1) mit PatS und durch eine Erhöhung der Plasmidkopienzahl konnten in *S. cerevisiae* 30 mg/l Patchoulol produziert werden (Chen *et al.*, 2012). Durch eine andere Herangehensweise konnten bei Kultivierung in einem 1,1 l Bioreaktor sogar 40,9 mg/l Patchoulol erzeugt werden (Albertsen *et al.*, 2011). Dabei wurden PatS und die Organismus-eigene FPPS als Fusionsprotein coexprimiert, um so die Bildung der Vorstufe FPP in der direkten Umgebung von PatS und deren direkte Umsetzung durch die Synthase zu begünstigen. Die bisher größte Ausbeute (41,6 mg/l) konnte durch die kombinierte Coexpression von tHmg1 und dem Fusionsprotein bestehend aus PatS und FPPS, sowie durch eine spezielle Wahl der C-Quelle bei der Kultivierung in Erlenmeyer-Kolben erreicht werden (Gruchattka & Kayser, 2015). Durch modulares *metabolic engineering* konnten in dieser Arbeit in *R. capsulatus* sogar 66,3 mg/l Patchoulol bei einer Produktionsrate von 0,8 mg/h erreicht werden. Diese Menge ist die bisher höchste Ausbeute an Patchoulol, die biotechnologisch hergestellt wurde.

Was die Produktion an Sesquiterpenen angeht, ist *R. capsulatus* offensichtlich eine sehr gute Alternative zu den etablierten Expressionswirten wie *C. glutamicum*, *E. coli* und *S. cerevisiae.* Wenn *R. capsulatus* aber als Plattformorganismus für die allgemeine heterologe Terpenoidproduktion gelten soll, muss dieser auch für alle anderen Terpenklassen anwendbar sein.

Bis heute konnte *R. capsulatus* erfolgreich für die Produktion von Carotinoiden (Tetraterpenoide), wie zum Beispiel β-Carotin (Linke, unveröffentlicht; Loeschcke *et al.*, 2013) und unter (mikro-) aeroben Bedingungen für Triterpenoide, wie Squalen (Gora, 2015; Khan *et al.*, 2015; Weber, 2016, Loeschcke & Drepper, unveröffentlicht), Botryococcen (Khan *et al.*, 2015), Cycloartenol und Lupeol (Loeschcke & Drepper, unveröffentlicht) eingesetzt werden. Karl Linke konnte zudem während seiner Masterarbeit, die im Rahmen dieser Disseration betreut wurde, u.a. erfolgreich das Diterpen Casben produzieren. In Bezug auf Monoterpene liegen bisher keine Beispiele vor.

Somit scheint *R. capsulatus* eine sehr gute Wahl für die heterologe Terpenproduktion in Mikroorganismen zu sein und könnte sich, zusammen mit den erzeugten Expressionsvektoren, durch

die modulares *metabolic engineering* angewendet werden kann, somit als Terpenproduktionsplattform eignen.

4.3 Weitere Optimierungmöglichkeiten der heterologen Terpenoidproduktion in *R. capsulatus*

Gerade in Bezug auf die Anwendungen in der Industrie ist es von großer Bedeutung, große Mengen an Terpenoiden zu produzieren. Deswegen ist es wichtig, alle Möglichkeiten zur Verbesserung der Terpenoidausbeuten heranzuziehen und zu evaluieren, um die bestmögliche Terpenoidproduktion zu erreichen. Einige weitere Optimierungsmöglichkeiten neben der Strategie des *metabolic engineering,* die zur Verbesserung der Vorläufermolekülbereitstellung führen sollte, werden im Folgenden benannt und diskutiert.

4.3.1 Erhöhte Produktbildung durch Steigerung des Proteinlevels der Terpensynthase

Im Fall der Valencensynthase CnVS weisen die Ergebnisse darauf hin, dass mit den produzierten Enzymmengen die maximal mögliche FPP-Umsetzung erreicht war, da die kombinierte Coexpression der entscheidenden Gene aus den Modulen FPP (*ispA*) und DXP (*dxs, idi*) im *R. capsulatus* Stamm SB1003+MVA zu einer Verschlechterung der Valencenausbeute im Gegensatz zur einfachen Coexpression von IspA in dem MVA-Stamm geführt hatte (**4.1.2**). Durch eine Erhöhung der Menge der Synthasen selbst könnte die FPP-Umsetzung jedoch theoretisch weiter gesteigert werden, sodass eventuell die inhibitorischen Effekte, die vermutlich durch eine Substratakkumulation eintraten, umgangen werden könnten. Dadurch könnte der Metabolitfluss ohne Einschränkungen ablaufen. Dies würde dazu führen, dass mehr FPP zu dem entsprechenden Terpenoid umgesetzt werden könnte. Generell sollte demnach eine Erhöhung der Proteinmenge der Terpensynthase zu einer gesteigerten Produktausbeute führen.

Eine Erhöhung der Synthasekonzentration könnte zum Beispiel dadurch erreicht werden, dass mehrere Genkopien des entsprechenden Enzyms auf dem Expressionsvektor vorliegen. So konnte bereits in *Chlamydomonas reinhardtii*, einer Mikroalge, die heterologe Patchoulolproduktion um mehr als das 3-fache (922 µg/gDCW nach 6 Tagen) gesteigert werden (Lauersen *et al.*, 2016).

Eine andere Möglichkeit wäre, die Effektivität der plasmidbasierten Genexpression zu steigern. Die P_{nif}-basierte Zielgenexpression in pRhon5Hi-2 ist, wie bereits erwähnt, sowohl Sauerstoff- (**3.1.2**) als auch Ammonium-abhängig (**1.2.2**). Allerdings hat sich gezeigt, dass die Genexpression unter Kontrolle des *nifHDK*-Promotors auch Licht-abhängig ist. Die Zielgenexpression in pRhon5Hi-2 wird unter Blaulicht-Bestrahlung vollständig reprimiert (Malach, 2013). Dadurch, dass das Licht von Glühbirnen, welches für die phototrophe Anzucht von *R. capsulatus* in dieser Arbeit eingesetzt

wurde, auch einen Blaulicht-Anteil beinhaltet, könnte sich dies negativ auf die Promotoraktivität auswirken (Özgür, 2015). Armagan Özgür konnte im Verlauf seiner Doktorarbeit bei Gebrauch des P_{nif} durch die Verwendung von Infrarotlicht-LED *panels* gegenüber der Verwendung von Glühbirnen eine Steigerung der Proteinakkumulation von diversen Membranproteinen beobachten. Diese kam entweder dadurch zustande, dass kein Blaulicht bei der Belichtung durch die Infrarotlicht-LED *panels* emittiert wurde, oder weil deren Lichtintensität der speziellen Wellenlänge im Infrarot-Bereich deutlich höher war und sich dies günstig ausgewirkt haben mag (Özgür, 2015). In beiden Fällen könnte die Proteinakkumulation der Terpensynthase gesteigert werden. Das könnte zur Folge haben, dass mehr Terpenoide gebildet werden.

Bei einer Steigerung der Promotoraktivität muss im Fall der Verwendung der in dieser Arbeit erzeugten Vektoren berücksichtigt werden, dass auf den Expressionsvektoren nicht nur das Terpensynthase-Gen lokalisiert ist, sondern ebenfalls die den Metabolitfluss maßgeblich beeinflussenden Gene der Module. Es könnte sein, dass bei verstärkter Expression die Synthasekonzentrationen, aber auch die der gebildeten Intermediate im selben Verhältnis zunehmen, sodass es zu inhibitorischen Effekten kommen könnte, die einer Terpenoidsteigerung entgegenwirken würden. Eine Möglichkeit könnte hier die Entkopplung der Transkription der Gene der Terpensynthase und der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme aus den einzelnen Modulen zum Beispiel durch Nutzung unterschiedlicher Promotoren sein. Somit könnte eine Optimierung der Synthaseexpression untersucht werden, ohne die Expression der Modulgene zu beeinflussen. Andererseits könnte auch in den bestehenden Konstrukten durch Verwendung eines stärkeren Promotors im Vergleich zu den anderen Enyzmen mehr von der Terpensynthase produziert werden, da das Terpensynthase-Gen im Plasmid direkt hinter dem Promotor lokalisiert ist (**3.2.2.2, Abb. 16**). In *E. coli* konnte mit verschiedenen Operonmodellen gezeigt werden, dass mit zunehmender Entfernung zum Operonende die Genexpression linear ansteigt (Lim *et al.*, 2011). Die Autoren schließen, dass dieser Anstieg der Expression mit der Operonlänge und der Entfernung des geweiligen Gens von 3‘-Ende des Transkripts durch die verlängerte Zeit für cotranskriptionelle Translation bedingt ist. Das würde bedeuten, dass gerade bei langen Transkriptionseinheiten die Translation der promotornahen Gene gesteigert wird. Das hätte demnach bei einer Steigerung der Promotoraktivität und somit einer Steigerung der Operontranskriptmenge der großen Konstrukte zur Folge, dass sich die Enzymlevel der Gene, die am weitesten vom Ende des Operons entfernt liegen, mehr ansteigen, als die, die näher am Operonende lokalisiert sind. Somit müsste auch mehr von der jeweiligen Terpensynthase gebildet werden können, ohne dass die Expression aller Gene aus den DXP-, MVA- und FPP-Modulen in gleichem Maße zunimmt.

4.3.2 Verbesserung der Produktsekretion durch Verwendung eines EPS-defizienten *R. capsulatus* Stammes 37b4

R. capsulatus bildet eine Exopolysaccharidschicht (EPS) aus (Bräutigam *et al.*, 1988), eine Art Schleimkapsel, die das Bakterium umhüllt. Diese besteht aus Lipiden mit verschiedenen Zuckereinheiten (Weckesser *et al.*, 1972). Die somit teilweise hydrophile EPS kann eine Barriere für hydrophobe Stoffe werden, was die Extraktionseffizienz der Terpenoide stark einschränken könnte. Neben dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm SB1003 gibt es viele weitere natürlich vorkommende Stämme, wie zum Beispiel *R. capsulatus* 37b4. Er zeichnet sich dadurch aus, dass er im Gegensatz zu dem Stamm SB1003 fast keine Schleimkapsel ausbildet (Omar *et al.*, 1983; Brimacombe *et al.*, 2013). Somit könnte bei Verwendung von *R. capsulatus* 37b4 als Produktionswirt eine verstärkte Sekretion von Terpenoiden möglich sein, und das Produkt im hier eingesetzten 2-Phasen-System in größeren Mengen in der organischen Phase nachgewiesen werden.

In ersten Experimenten konnte bei einer vergleichenden Expression der Patchoulolsynthase in den *R. capsulatus* Stämmen SB1003 und 37b4 die Vermutung, dass eine geringere EPS-Synthese zu einer besseren Terpenoidausbeute führt, tatsächlich bestätigt werden (**Anhang, Abb. 29**). Durch die geringere EPS-Schicht konnte vermutlich mehr Patchoulol ins Medium und schließlich in die hydrophobe n-Dodecan-Phase, die während der Kultivierung (**2.8.1.3**) über die Kulturen geschichtet war, extrahiert werden, was zu der 1,3-fach gesteigerten Patchoulolausbeute führte. Eine abschließende Beurteilung, ob diese Steigerung das alleinige Resultat einer gesteigerten Extraktion war oder somit gleichzeitig eine gesteigerte Produktion erzielt werden konnte, konnte noch nicht vorgenommen werden. Es ist durchaus denkbar, dass eine verbesserte Produktsekretion das Gleichgewicht der Reaktionen der Biosyntheseschritte hin zur Produktbildung verschiebt, da die Verwendung des EPS-defizienten Stammes in Kombination mit der hier angewendeten 2-Phasen-*in situ* Extraktion zu einem verstärkten Abtransport des Produkts aus dem Wirt führen sollte. Besonders im Fall von für die Zellen toxischen Produkten kann eine verbesserte Sekretion ein entscheidender Ansatzpunkt zu einer robusten Produktion substantieller Terpenoidmengen sein. Zusätzliche Analysen hinsichtlich der gesamten Produktmenge in der n-Dodecan-Phase sowie in den Zellen könnten die Frage beantworten, ob es sich bei der Verwendung mit *R. capsulatus* 37b4 nur um eine bessere Produktsekretion oder um eine weitere Produktsteigerung handelt.

Ein Nachteil des spezifischen Stammes *R. capsulatus* 37b4 ist allerdings seine geringe Toleranz gegenüber Temperaturen über 30 °C, was ihn für die Industrie möglicherweise weniger attraktiv macht. Allerdings könnte ein *knockout* des *gtaI* Gens in dem Stamm SB1003, der Temperaturen bis hin zu 37 °C toleriert, zu einem sehr ähnlichen Phänotyp mit einer geringen EPS führen (Brimacombe *et al.*, 2013), da GtaI Teil des Quorum sensing-Systems (QS) GtaR/I in *R. capsulatus* ist, welches u.a.

die Produktion der extazellulären Polysaccharide (EPS) und die Biofilmbildung reguliert (Davies *et al.*, 1998; González & Keshavan, 2006; Nadell *et al.*, 2008).

4.3.3 Steigerung der Terpenoidproduktion unter aeroben Bedingungen

Unter anaerob phototrophen Bedingungen ist *R. capsulatus* ein effektiver Produzent von Tetraterpenoiden, da diese physiologisch für die anoxygene Photosynthese gebraucht werden. Die Expression der Gene, die für die natürliche Tetraterpenoidproduktion in *R. capsulatus* benötigt werden, werden ebenso wie der in dieser Arbeit verwendete *nif*-Promotor, der in *R. capsulatus* natürlicherweise die Expression des *nifHDK*-Operons kontrolliert, wie bereits beschrieben u.a. durch Sauerstoff reprimiert (**3.1**). Dies schränkt die Effektivität der Anwendung sowohl des Vektors pRhon5Hi-2, der unter anaerob phototrophen Bedingungen äußerst effektiv zur Expression von heterologen Gene eingesetzt werden kann (Malach, 2013; Özgür, 2015), als auch des *R.capsulatus* Stammes SB1003+MVA, in dem das ins Genom integrierte MVA-Operon von *P. zeaxanthinifaciens* ebenfalls der Kontrolle des P_{nif} unterliegt, unter aeroben oder mikroaeroben Bedingungen ein. Die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff kann allerdings u.a. bei der Synthese von Triterpenen und auch bei der Dekoration von Terpenoiden durch Monooxygenasen eine Rolle spielen. Außerdem könnte es für industrielle Zwecke gegebenenfalls von Vorteil sein, wenn für die Produktion von Terpenoiden *R. capsulatus* nicht phototroph angezogen werden müsste. Demnach sollten Möglichkeiten gefunden werden, die Regulation der Zielgenexpression unter Kontrolle des P_{nif} und die der Terpenoidbiosynthese in *R. capsulatus* von Sauerstoff zu entkoppeln.

4.3.3.1 Deletion des Repressorgens *crtJ*

Eine Strategie, die aerobe natürliche Carotinoidproduktion in *R. capsulatus* zu steigern, ist, wie auch schon in Kapitel **1.2.1** erwähnt, der *knockout* des Repressorgens *crtJ* (Ponnampalam *et al.*, 1995). Das CrtJ Protein bindet unter hohen Sauerstoffkonzentrationen an spezifische DNA-Bindestellen, zum Beispiel zwischen den Operons *crtA* und *crtIB*, und hindert dadurch RegA daran, in diesem Bereich zu binden und im phosphorylierten Zustand die Expression der Gene, die für die Enzyme des Carotinoidbiosynthesewegs kodieren, zu induzieren (Elsen *et al.*, 1998, 2005). In ersten Untersuchungen konnte nun bei einer vergleichenden Analyse der *R. capsulatus* Stämme SB1003 und Δ*crtJ* gezeigt werden, dass die Carotinoidproduktion unter aeroben Bedingungen durch einen *knockout* des *crtJ*-Gens (diese Arbeit; identisch erzeugt wie Δ*crtE*-Mutante; **2.8.3**) tatsächlich gesteigert werden konnte (siehe **Anhang, Abb. 30, A**), allerdings nur unter aeroben Bedingungen (bei 40 ml und besonders bei 20 ml Füllvolumen im Schüttelkolben). Dies liegt vermutlich daran, dass CrtJ ein starker Repressor bei hohen Sauerstoffkonzentrationen ist, wie sie sich bei geringen Füllvolumina in Schüttelkolben einstellen. Unter geringeren Sauerstoffkonzentrationen löst er sich allerdings von

der DNA (Gregor & Klug, 2002) und kann damit keinen weitreichenden Einfluss mehr auf die Expression der *crt*-Gene haben, sodass die Regulation der *crt*-Gene nur noch durch die Aktivierung durch RegA abhängt. Überraschenderweise konnte allerdings festgestellt werden, dass bei einem besonders geringen Sauerstoffeintrag in die Kultur (60 ml) die Carotinoidbildung im Vergleich mit dem Wildtyp in der Deletionsmutante deutlich sank. Offenbar unterliegt die Carotinoidbildung weiteren Faktoren, die durch die Deletion des *crtJ*-Gens beeinträchtigt wurden.

Um zu überprüfen, ob die Deletion einen Einfluss auf die heterologe Terpenoidproduktion hat, wurde *R. capsulatus* SB1003 und die Δ*crtJ*-Mutante mit pRhon5Hi-2-*PatS-ispA* unter aeroben (40 ml) Bedingungen kultiviert und die Patchoulolproduktion untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Patchoulolkonzentration bei der Mutante nur minimal erhöht war (**Anhang, Abb. 30, B**). Die Strategie der Deletion des Repressorgens *crtJ* zur Verbesserung der heterologen Terpenoidproduktion hat sich somit nicht als sehr vielversprechend herausgestellt. In zukünftigen Studien könnte sich möglicherweise die zusätzliche Beeinflussung der Aktivatoren der *crt*-Gene als eine bessere Strategie herausstellen. Es gibt bereits RegA-Varianten, die die Transkription auch ohne Phosphorilierung durch RegB ermöglichen (Du, Bird & Bauer, 1998).

4.3.3.2 Implementierung Sauerstoff-insensitiver Transkriptionsaktivatoren der *nif*-Gene

Wie in Kapitel **1.2.2** beschrieben, wird in *R. capsulatus* die *nif*-Genexpression durch die Transkriptionsaktivatoren NifA1 und NifA2 aktiviert. Diese gehören beide aufgrund einer Cystein-reichen, O_2-sensitiven Linkerdomäne zwischen dem zentralen und C-terminalen Bereich der Proteine zu den O_2-sensitiven NifA-Typen (Fischer, 1994; Dixon, 1998). Somit ist die Aktivierung der Transkription der *nif*-Gene Sauerstoff-abhängig. Um diese Sauerstoffabhängigkeit zu umgehen, könnten NifA-Varianten eingesetzt werden, die O_2-tolerant sind. *Klebsiella pneumoniae* und *Azotobacter vinelandii* besitzen solche NifA-Proteine. Diese Proteine haben gemeinsam, dass ihnen die Cystein-reiche, O_2-sensitive Linkerdomäne fehlt und sie stattdessen natürlicherweise über ein zweites Protein, genannt NifL, kontrolliert werden (Masepohl & Kranz, 2009). NifL inhibiert durch Protein-Protein-Interaktionen mit NifA dessen Aktivität (Martínez-Argudo *et al.*, 2001). Dies ist von der Sauerstoffkonzentration und von der Menge an gebundenem Stickstoff in der Zelle abhängig (Austin *et al.*, 1994; Narberhaus *et al.*, 1995; Dixon, 1998). Die Regulierung der beiden Systeme unterscheidet sich insofern, als dass GlnK in *K. pneumoniae* unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen als ein weiteres Protein an der Trennung des NifL-NifA-Proteinkomplexes beteiligt ist und GlnK in *A. vinelandii* dagegen unter Anwesenheit von Ammonium die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen NifA und NifL unterstützt (Masepohl & Kranz, 2009). Da es in *R. capsulatus* das NifA-inhibierende Protein NifL nicht gibt (Drepper *et al.*, 2003), könnten die NifA-Proteine aus *K. pneumoniae* und *A. vinelandii* in *R. capsulatus* die *nif*-Genexpression in Anwesenheit von

Sauerstoff induzieren. Es konnte bereits erfolgreich gezeigt werden, dass NifA aus *K. pneumoniae* in NifA-defizienten *R. capsulatus* Stämmen unter anaeroben Bedingungen funktionell ist (Paschen, 1997). Da NifA aus *A. vinelandii* das für die DNA-Bindung entscheidende Helix-Turn-Helix-Motiv (QAKAAR-X-L-X_4-RQ-X_2-Y) in der C-terminalen Domäne aufweist (Morett & Buck, 1988) und das für die Aktivierung der Transkription entscheidende Walker-Motiv (GE(S/T)GTGKE) in der N-terimalen Domäne enthält (Walker *et al.*, 1982), sollte auch dieses NifA-Protein dazu in der Lage sein, in *R. capsulatus* die *nif*-Genexpression zu induzieren. Das kann in einem Experiment überprüft werden, indem für *R. capsulatus* kodonoptimierte Gene (**2.11 + 3.2.1**), die für NifA aus *K. pneumoniae* (NifA KP) und *A. vinelandii* (NifA AV) kodieren, in P_{nif}-abhängiger Coexpression zusammen mit EYFP als Expressionsreporter verwendet werden (im Vektor pRhon5Hi-2-*eyfp* (**3.1.2**), jeweils *downstream* des *eyfp*-Gens). Dadurch, dass P_{nif} unter aeroben Bedingungen eine geringe Aktivität aufweist, wie es in **3.1.2** nachgewiesen werden konnte, sollten unter diesen Bedingungen geringe Mengen von NifA produziert werden, was anschließend in einer Art positiver Rückkopplung zu einer vollständigen Aktivierung der *nif*-Genexpression führen könnte. Erste Daten aus einem solchen Experiment ergaben in vergleichender Analyse von Kulturen unter anaerob photoheterotrophen (-O_2) und (mikro-)aerob chemotrophen (+O_2; 20-60 ml Füllvolumen im Schüttelkolben) Bedingungen bei *nifA KP* Expression gegenüber der alleinigen *eyfp* Expression keine gesteigerte aerobe Aktivität der P_{nif}-abhängigen Expression, wohl aber bei der *nifA AV* Coexpression (**Anhang, Abb. 31**). Dieser Effekt bei Coexpression von *nifA AV* trat bei guter Sauerstoffversorgung ein (+O_2; 20, 30 ml), der allerdings ab 40 ml Füllvolumen nicht mehr zu beobachten war. Möglicherweise stören die von *R. capsulatus* natürlicherweise produzierten NifA-Varianten die volle Aktivierung der *nif*-Genexpression durch die O_2-toleranten NifA-Varianten. Der durch das Einbringen von *nifA AV* positive Effekt auf die aerobe Aktivität der P_{nif}-abhängigen Expression, ist in jeder Hinsicht vielversprechend. In folgenden Studien sollte daher ein NifA1/NifA2-defizienter *R. capsulatus* Stamm eingesetzt werden, um Wechselwirkungen mit den wirtseigenen NifA-Varianten ausschließen zu können. Eventuell könnte dadurch eine volle Induktion der *nif*-Genexpression trotz Sauerstoffanwesenheit erreicht werden, die wiederum positive Auswirkungen etwa auf die heterologe Terpenoidproduktion in dem *R. capsulatus* Stamm SB1003+MVA unter Verwendung des pRhon5Hi-2 Vektors hätte. Dies hätte zur Folge, dass diese Kombination auch unter aeroben Bedingungen erfolgreich zum Einsatz kommen könnte und ebenso hohe Terpenoidausbeuten, wie sie unter anaerob phototrophen Bedingungen erreicht wurden, erhalten werden könnten.

4.4 Ausblick: *R. capsulatus* für zukünftige bioökonomische Anwendungen

R. capsulatus stellt aus verschiedenen Gründen ein bioökonomisch äußerst interessantes Bakterium dar. Er ist u.a. in der Lage, unter Nutzung der Energie des Sonnenlichts Photosynthese zu betreiben. Im Hinblick auf die Terpenoidproduktion sowie Herstellung anderer Wirk- oder Wertstoffe könnten auf dieser Grundlage nachhaltige Prozesse entwickelt werden.

Neben der Terpenoidproduktion sind weitere Anwendungen auf Basis der natürlichen Eigenschaften des Bakteriums denkbar. Durch seine Fähigkeit Polyhydroxyalkanoate (PHA) unter bestimmten Wuchsbedingungen in hohem Maße herzustellen (Kranz *et al.*, 1997), zu denen auch Poly-3-Hydroxybutyrat (PHB) gehört, ist *R. capsulatus* interessant für die Polymerindustrie. Der Vorteil gegenüber synthetisch hergestellten Polymeren ist, dass Kunststoff aus PHB aus erneuerbaren Ressourcen stammt und natürlich abbaubar ist (Song *et al.*, 2009; Somleva *et al.*, 2013).

Neben der Produktion von Vorstufen für Bioplastik ist *R. capsulatus* in der Lage, molekularen Wasserstoff unter Stickstoff-limitierenden photoheterotrophen Bedingungen zu produzieren (Jahn *et al.*, 1994). Aufgrund der großen Nachfrage für Wasserstoff, die bisher hauptsächlich auf Grundlage von fossilen Rohstoffen gedeckt wird, kann die Verwendung von Wasserstoff-produzierenden Organsimen wie *R. capsulatus* eine gute Alternative zur Produktion von Biobrennstoffen sein, da sie eine Kosten-effiziente und bioökonomische Lösung darstellen (Mirza *et al.*, 2013).

Außerdem ist *R. capsulatus* gut geeignet, schwer exprimierbare Membranproteine zu synthetisieren und in die Membran einzulagern (Özgür, 2015), da erstens seine Proteinsynthesemaschinerie für die Herstellung der großen Photosynthesekomplexe ausgelegt ist. Zweitens bildet er unter photoheterotrophen Bedingungen ein zusätzliches Membransystem aus, sodass sich die Membranoberfläche deutlich vergrößert (Drews & Golecki, 1995). Dies stellt einen Vorteil dar, da die Membranoberfläche bei der Expression von membranbindenden Proteinen häufig ein limitierender Faktor ist, was zu unfunktionell aggregierenden Zielproteinen führen kann.

Ein weiterer Vorteil des Bakteriums ist, dass es tolerant ist in Bezug auf seine Nährstoffversorgung. Aus diesem Grund ist *R. capsulatus* in der Natur sehr weit verbreitet. Es ist natürlicherweise in Sümpfen, Seen und sogar in Abwassern zu finden (Imhoff & Trüper, 1989). Es kann verschiedenste Arten von Abwasser als Lebensort nutzen, und ist dabei sogar in der Lage, verschiedene Schadstoffe abzubauen und neue Stoffe zu produzieren (Liu *et al.*, 2015). Da *R. capsulatus* die Fähigkeit besitzt Sonnenlicht als Energiequelle zu nutzen, könnte der Organismus sehr kostengünstig und ökologisch vorteilhaft eingesetzt werden. Eine zukünftige Anwendung könnte sein, *R. capsulatus* nur unter Verwendung von Sonnenlicht und Abwasser, industriell relevante Stoffe produzieren zu lassen,

während das Abwasser von Schadstoffen befreit wird, wie es bereits durch den Einsatz von Mikroalgen versucht wurde (Pulz & Gross, 2004; Del Campo *et al.*, 2007; Richmond, 2014).

Die in dieser Arbeit am Beispiel der Terpenoidproduktion entwickelten Kultivierungsstrategien und molekularbiologischen *tools* zur Stammoptimierung können dazu beitragen, in Zukunft eine breitere Anwendung von *R. capsulatus* in den genannten Gebieten zu etablieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Terpenoide gehören zu einer der größten Gruppen von Sekundärmetaboliten, die aufgrund vielfältiger bioaktiver und therapeutischer Eigenschaften bedeutsam für die Pharma-, Kosmetik- und auch Lebensmittelindustrie sind. Die Herstellung von Terpenoiden in ihren natürlichen Produzenten erfolgt oft nur in geringen Mengen, sodass durch Extraktion typischerweise nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden. Neben der schwierigen und teuren chemischen Synthese kann die heterologe Produktion in Mikroorganismen dem gegenüber eine ökonomische und ökologische Alternative darstellen. Das fakultativ phototrophe Bakterium *R. capsulatus* stellt natürlicherweise Carotinoide (Tetraterpenoide) in hohen Mengen her, deren Vorstufen über den DXP-Biosyntheseweg bereitgestellt werden. Im Vergleich mit anderen etablierten Wirten stellt das Bakterium einen bislang weniger untersuchten Produktionswirt dar. Aufgrund seiner spezifischen Physiologie unter phototrophen Bedingungen ist er allerdings eine vielversprechende Alternative.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, am Beispiel der Patchoulolsynthase aus dem indischen Patchouli *Pogostemon cablin* systematisch zu evaluieren, ob es möglich ist, in *R. capsulatus* wirtsfremde Terpenoide zu produzieren. Darüber hinaus wurden verschiedene spezifische *metabolic engineering*-Strategien entwickelt und ihre Anwendung in *R. capsulatus* im Hinblick auf die Steigerung der Terpenoidproduktion evaluiert. Es konnte festgestellt werden, dass die Produktion wirtsfremder Sesquiterpene (i) durch Coexpression von IspA und Verwendung einer Δ*crtE*-Mutante, sowie (ii) durch die Steigerung der Isoprenoidbiosynthese sowohl mittels Coexpression der bekannten DXP-Weg-limitierenden Enzyme DxS und Idi als auch (iii) durch den Transfer des MVA-Wegs aus *Paracoccus zeaxanthinifaciens* in *R. capsulatus* gesteigert werden konnte. Dabei stellte sich die *R. capsulatus* Mutante SB1003+MVA mit plasmidbasierter Coexpression von *ispA*, *dxs* und *idi* als besonders erfolgreich heraus. Mit diesem Stamm konnte die Patchoulolausbeute gegenüber dem Ausgangsstamm um das 112-fache gesteigert werden und führte zu dem höchsten bislang publizierten Produkttiter von 66,3 mg/l.

Da ein ganzes Set an Expressionsvektoren für *R. capsulatus* erzeugt wurde, durch die verschiedene *engineering*-Strategien an unterschiedlichen Stellen der Terpenbiosynthese verfolgt werden können, steht somit für zukünftige Studien und Anwendungen eine *toolbox* zur Verfügung, um die Produktion von verschiedensten wirtsfremden Terpenoiden zu steigern.

Es konnte die allgemeine Anwendbarkeit des Expressionswirts und verschiedener *engineering*-Maßnahmen auf die Produktion anderer Terpenoide am Beispiel von zwei unterschiedlich aktiven Valencensynthasen aus der Nootka-Scheinzypresse *Callitropsis nootkatensis* und der Orange *Citrus sinensis* bestätigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass vermutlich die katalytische Effizienz

der Terpensynthase bei der Wahl der *engineering*-Strategie entscheidend ist, da eine zu effiziente Bereitstellung der Isopren-Vorstufen möglicherweise zu inhibitorischen Effekten in dem rekombinanten Sesquiterpenbiosyntheseweg führen kann. Durch die vergleichende Evaluierung der verschiedenen *metabolic engineering* Strategien konnte für die Valencensynthase aus *C. nootkatensis* so ein *R. capsulatus* Stamm erzeugt werden, der im Vergleich zum Wildtyp eine um das 255-fache gesteigerte Valencenausbeute von 324 mg/l aufwies.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass *R. capsulatus* ein vielversprechender alternativer Wirt für die nachhaltige Produktion wirtsfremde Terpenoiden ist. Die besonderen physiologischen Eigenschaften und die erzeugten Expressionvektoren, durch die an verschiedenen Stellen *metabolic engineering* angewendet werden kann, machen das phototrophe Bakterium zu einem vielversprechenden Plattformorganismus für die Produktion und Charakterisierung neuer und biotechnologisch relevanter Terpenoide.

6 SUMMARY

Terpenoids belong to one of the largest group of secondary metabolites that are of interest for the pharmaceutical, cosmetics as well as the food industry due to their bioactive and therapeutic properties. Typically, terpenoids are produced in low quantities by organisms so that extraction of terpenoids from their natural sources oftentimes results in low yields of product. The heterologous production of terpenoids in microbial platforms may present a cost-effective and ecological alternative to the costly and complicated production of terpenoids by chemical synthesis. The facultative phototrophic bacterium *R. capsulatus* is naturally capable of producing high quantities of carotenoids (tetraterpenoids) using the DXP pathway for precursor biosynthesis. In contrast to more established microbial platforms *R. capsulatus* presents a production host that has not been explored to a great extent so far. However, owing to a special physiology under phototrophic conditions the organism presents a promising alternative to other platforms.

For this reason the aim of this thesis was to systematically evaluate the feasibility of producing non-native terpenoids in *R. capsulatus* by using the example of the patchoulol synthase from the Indian patchouli *Pogostemon cablin*. Additionally, different *metabolic engineering* strategies were developed and their application in *R. capsulatus* evaluated with regard to the increase in terpenoid production. It could be asserted that the production of non-native sesquiterpenes in *R. capsulatus* was increased by (i) co-expression of *IspA* and using a *R. capsulatus* Δ*crtE*-mutant (ii) increasing the isoprenoid biosynthesis by co-expression of genes encoding enzymes DxS and Idi which are known to be limiting factors for isoprenoid production in the DXP pathway as well as (iii) transfer of the mevalonic acid pathway from *Paracoccus zeaxanthinifaciens.* Using the *R. capsulatus* mutant strain SB1003+MVA in combination with plasmid-based co-expression of *ispA*, *dxs* and *idi* proved to be especially successful. Compared to the original strain that was used as a starting point, the yield of patchoulol production could be increased by a factor 112 using this strain, ultimately resulting in yields corresponding to 66.3 mg/l patchoulol, the highest production yield that has been published yet.

Due to the fact that a whole set of different expression plasmids was developed for *R. capsulatus*, different engineering strategies targeting different steps of terpenoid biosynthesis may be pursued, so that for future studies and applications a toolbox for increasing the production of different non-native terpenoids is readily available.

The general applicability of *R. capsulatus* as an expression host as well as the application of different engineering procedures in the host for the production of other non-native terpenoids could be shown. This was accomplished by using the examples of two differently active valancene synthases,

one from Nootka Cypress *Callitropsis nootkatensis* and the other from the orange fruit *Citrus sinensis* respectively. It was determined that the catalytic efficiency of the respective enzyme is probably a determinative factor for the selection of the right engineering strategy, as too efficient a supply of Isoprenoid-precursors might possibly be resulting in inhibitory effects on the recombinant biosynthesis pathway of the sesquiterpene in this expression host. By comparative evaluation of the application of different *metabolic engineering* strategies for the valancene synthase from *C. nootkatensis* a *R. capsulatus* production strain could be engineered that was characterized by a valencene yield of 324 mg/l which reflects an increase factor of valencene yield by 255 compared to the wild type strain.

In the scope of this thesis it could be shown that *R. capsulatus* is a promising alternative host for the sustainable production of non-native terpenoids. The special physiological characteristics of the organism and the developed set of expression plasmids, that allow for targeting different steps of the biosynthesis pathways by way of *metabolic engineering*, make the phototrophic bacterium *R. capsulatus* a promising platform organism for the production and characterisation of novel and biotechnologically relevant terpenoids.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, Mucha O, Phon TH, Stephanopoulos G (**2008**). Terpenoids: Opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm*. **5**(**2**):167–190.

Ajikumar PK, Xiao W, Tyo KEJ, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G (**2010**). Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*. **330**(**6000**):70–74.

Albertsen L, Chen Y, Bach LS, Rattleff S, Maury J, Brix S, Nielsen J, Mortensen UH (**2011**). Diversion of flux toward sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* by fusion of host and heterologous enzymes. *Appl Environ Microbiol*. **77**(**3**):1033–1340.

Alexeyev M (**1995**). Three kanamycin resistance gene cassettes with different polylinkers. *Biotechniques*. **18**(**1**):52,54,56.

Allen CM, Alworth W, Macrae A, Bloch K (**1967**). A long chain terpenyl pyrophosphate synthetase from *Micrococcus lysodeikticus*. *J Biol Chem*. **242**(**8**):1895–1902.

Armstrong GA, Alberti M, Leach F, Hearst JE (**1989**). Nucleotide sequence, organization, and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Gen Genet*. **216**(**2**–**3**):254–268.

Asadollahi MA, Maury J, Møller K, Nielsen KF, Schalk M, Clark A, Nielsen J (**2008**). Production of plant sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of ERG9 repression on sesquiterpene biosynthesis. *Biotechnol Bioeng*. **99**(**3**):666–677.

Asadollahi MA, Maury J, Schalk M, Clark A, Nielsen J (**2010**). Enhancement of farnesyl diphosphate pool as direct precursor of sesquiterpenes through *metabolic engineering* of the mevalonate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. **106**(**1**):86–96.

Austin S, Buck M, Cannon W, Eydmann T, Dixon R (**1994**). Purification and *in vitro* activities of the native nitrogen fixation control proteins NifA and NifL. *J Bacteriol*. **176**(**12**):3460–3465.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (**2008**). Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol*. **46**(**2**):446–475.

Banerjee A, Preiser AL, Sharkey TD (**2016**). Engineering of recombinant poplar deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (*Pt*DXS) by site-directed mutagenesis improves its activity. *PLoS One*. **11**(**8**):e0161534.

Banerjee A, Wu Y, Banerjee R, Li Y, Yan H, Sharkey TD (**2013**). Feedback inhibition of deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase regulates the methylerythritol 4-phosphate pathway. *J Biol Chem*. **288**(**23**):16926–16936.

Bartley GE, Schmidhauser TJ, Yanofsky C, Scolnik PA (**1990**). Carotenoid desaturases from *Rhodobacter capsulatus* and *Neurospora crassa* are structurally and functionally conserved and contain domains homologous to flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem*. **265**(**26**):16020–16024.

Bartley GE, Viitanen P V., Bacot KO, Scolnik PA (**1992**). A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *J Biol Chem*. **267**(**8**):5036–5039.

Bauer C, Elsen S, Swem LR, Swem DL, Masuda S (**2003**). Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **358**(**1429**):147–154.

Bauer CE (**1995**). Regulation of photosynthesis gene expression. *In: Anoxygenic photosynthetic bacteria. Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*. 1221–1234.

Bauer K, Garbe D, Surburg H (**2001**). Common fragrance and flavor materials. *Wiley-VCH, Weinheim, Germany*.

Beatty M, Hayes K, Hou Z, Meyer D, Nannapaneni K, Rife C, Wells D, Zastrow- Hayes G (**2013**). Legume isoprene synthase for production of isoprene. *USA Patent US 20130330709*.

Beck ZQ, Calabria AR, Miller MC, Vaviline D V, Nielsen AT (**2013**). Increased isoprene production using the archaeal lower mevalonate pathway. *USA Patent US8361762*.

Beekwilder J, van Houwelingen A, Cankar K, van Dijk ADJ, de Jong RM, Stoopen G, Bouwmeester H, Achkar J, Sonke T, Bosch D (**2014**). Valencene synthase from the heartwood of Nootka cypress (*Callitropsis nootkatensis*) for biotechnological production of valencene. *Plant Biotechnol J*. **12**(**2**):174–182.

Biel AJ, Marrs BL (**1985**). Oxygen does not directly regulate carotenoid biosynthesis in *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Bacteriol*. **162**(**3**):1320–1321.

Binder D, Frohwitter J, Mahr R, Bier C, Grünberger A, Loeschcke A, Peters-Wendisch P, Kohlheyer D, Pietruszka J, Frunzke J, Jaeger K, Wendisch V, Drepper T (**2016**). Light-controlled cell factories – Employing photocaged IPTG for light-mediated optimization of *lac*-based gene expression and (+)-valencene biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*. **82**(**20**):6141–6149.

Birnboim HC, Doly J (**1979**). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucleic Acids Res. **7**(**6**):1513–1523.

Bitok JK, Meyers CF (**2012**). 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate enhances and sustains cyclodiphosphate synthase IspF activity. *ACS Chem Biol*. **7**(**10**):1702–1710.

Boronat A, Rodríguez-Concepción M (**2015**). Terpenoid biosynthesis in prokaryotes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. **148:**3–18.

Bräutigam E, Fiedler F, Woitzik D, Flammann HT, Weckesser J (**1988**). Capsule polysaccharide-protein-peptidoglycan complex in the cell envelope of *Rhodobacter capsulatus*. *Arch Microbiol*. **150:**567–573.

Breitmaier E (**2006**). Terpenes. Flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. *Wiley-VCH, Weinheim, Germany*. **70**(**4**):711.

Brimacombe CA, Stevens A, Jun D, Mercer R, Lang AS, Beatty JT (**2013**). Quorum-sensing regulation of a capsular polysaccharide receptor for the *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent (RcGTA). *Mol Microbiol*. **87**(**4**):802–817.

Britton G (**1995**). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*. **9**(**15**):1551–1558.

Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (**2004**). Carotenoids, handbook. *Birkhäuser, Basel*.

Broers STJ (**1994**). Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli*. *Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich*.

Burt S (**2004**). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *Int J Food Microbiol*. **94**(**3**):223–253.

Calabria AR, Cervin M, La Duca R, McAuliffe JC, Miller MC, Sabo TA, Sanford KJ, Webster EL, Whited GM (**2013**). Compositions and methods for producing isoprene free of C5 hydrocarbons under decoupling conditions and/or safe operating ranges. *USA Patent US8420360*.

Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG (**2007**). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. **74**(**6**):1163–1174.

Caruthers JM, Kang I, Rynkiewicz MJ, Cane DE, Christianson DW (**2000**). Crystal structure determination of aristolochene synthase from the blue cheese mold, *Penicillium roqueforti*. *J Biol Chem*. **275**(**33**):25533–25539.

Chandran SS, Kealey JT, Reeves CD (**2011**). Microbial production of isoprenoids. *Process Biochem*. **46**(**9**):1703–1710.

Chen Y, Partow S, Scalcinati G, Siewers V, Nielsen J (**2012**). Enhancing the copy number of episomal plasmids in *Saccharomyces cerevisiae* for improved protein production. *FEMS Yeast Res*. **12**(**5**):598–607.

Chen Y, Zhou YJ, Siewers V, Nielsen J (**2015**). Enabling technologies to advance microbial isoprenoid production. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. **148:**143–160.

Christianson DW (**2006**). Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem Rev*. **106**(**8**):3412–3442.

Clark WG, Davidson E, Marrs BL (**1984**). Variation of levels of mRNA coding for antenna and reaction center polypeptides in *Rhodopseudomonas capsulata* in response to changes in oxygen concentration. *J Bacteriol*. **157**(**3**):945–948.

Cordoba E, Salmi M, León P (**2009**). Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *J Exp Bot*. **60**(**10**):2933–2943.

Croteau R, Ketchum REB, Long RM, Kaspera R, Wildung MR (**2006**). Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochem Rev*. **5**(**1**):75–97.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (**2000**). Natural products (secondary metabolites). *In: Biochemistry & molecular biology of plants. Buchanan B, Gruissem W, Jones R (ed.). American Society of Plant Physiologists*. 1250–1318.

Cullen PJ, Bowman WC, Kranz RG (**1996**). *In vitro* reconstitution and characterization of the *Rhodobacter capsulatus* NtrB and NtrC two-component system. *J Biol Chem*. **271**(**11**):6530–6536.

D'Haene SE, Crouch LI, Jones MR, Frese RN (**2014**). Organization in photosynthetic membranes of purple bacteria *in vivo*: The role of carotenoids. *Biochim Biophys Acta*. **1837**(**10**):1665–1673.

Dai J, Cardellina II JH, Mahon JBM, Boyd MR (**1997**). Zerumbone, an HIV-inhibitory and cytotoxic sesquiterpene of *Zingiber Aromaticum* and *Z. Zerumbet*. *Nat Prod Lett*. **10**(**2**):115–118.

Das A, Yoon SH, Lee SH, Kim JY, Oh DK, Kim SW (**2007**). An update on microbial carotenoid production: Application of recent *metabolic engineering* tools. *Appl Microbiol Biotechnol*. **77**(**3**):505–512.

Davies D, Parsek M, Pearson J, Iglewski B, Costerton J, Greenberg E (**1998**). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. **280**(**5361**):259–258.

Davies FK, Work VH, Beliaev AS, Posewitz MC (**2014**). Engineering limonene and bisabolene production in wild type and a glycogen-deficient mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Front Bioeng Biotechnol*. **2:**21.

Davis EM, Croteau R (**2000**). Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Top Curr Chem*. **209:**53–95.

Deguerry F, Pastore L, Wu S, Clark A, Chappell J, Schalk M (**2006**). The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. *Arch Biochem Biophys*. **454**(**2**):123–136.

Dewick PM (**2002**). The biosynthesis of C_5-C_{25} terpenoid compounds. *Nat Prod Rep*. **19**(**2**):181–222.

Dimster-Denk D, Thorsness MK, Rine J (**1994**). Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. **5**(**6**):655–665.

Dixon R (**1998**). The oxygen-responsive NIFL-NIFA complex: A novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in gamma-proteobacteria. *Arch Microbiol*. **169**(**5**):371–380.

Dogbo O, Laferrière A, D'Harlingue A, Camara B (**1988**). Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *Proc Natl Acad Sci USA*. **85**(**19**):7054–7058.

Donald KAG, Hampton RY, Fritz IB (**1997**). Effects of overproduction of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on squalene synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* **63**(**9**):3341–3344.

Dorsey JK, Porter JW (**1968**). The inhibition of mevalonic kinase by geranyl and farnesyl pyrophosphates. *J Biol Chem*. **243**(**18**):4667–4670.

Drepper T, Groß S, Yakunin AF, Hallenbeck PC, Masepohl B, Klipp W (**2003**). Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology*. **149**(**8**):2203–2212.

Drews G (**1985**). Structure and functional organization of light-harvesting complexes and photochemical reaction centers in membranes of phototrophic bacteria. *Microbiol Rev*. **49**(**1**):59–70.

Drews G (**2013**). The intracytoplasmic membranes of purple bacteria - Assembly of energy-transducing complexes. *J Mol Microbiol Biotechnol*. **23**(**1–2**):35–47.

Drews G, Golecki JR (**1995**). Structure, molecular organization, and biosynthesis of membranes of purple bacteria. *In: Anoxygenic photosynthetic bacteria. Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*. 231–257.

Drews G, Oelze J (**1981**). Organization and differentiation of membranes of phototrophic bacteria. *Adv Microb Physiol*. **22:**1–92.

Du S, Bird TH, Bauer CE (**1998**). DNA binding characteristics of RegA: A constitutively active anaerobic activator of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J Biol Chem*. **273**(**29**):18509–18513.

Dugaiczyk A, Boyer H, Goodman H (**1975**). Ligation of *Eco*RI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol*. **96**(**1**):171–184.

Duport C, Meyer C, Naud I, Jouanneau Y (**1994**). A new gene expression system based on a fructose-dependent from *Rhodobacter capsulatus*. *Gene*. **145**(**1**):103–108.

Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem IDA, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward S a, Krishna S (**2003**). Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **424**(**6951**):957–961.

Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG (**1997**). The carotenoids as anti-oxidants - A review. *J Photochem Photobiol B*. **41**(**3**):189–200.

Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F (**2004**). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci*. **61**(**12**):1401–1426.

Elhai J, Wolk C (**1988**). Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol*. **167:**747–754.

Elsen S, Jaubert M, Pignol D, Giraud E (**2005**). PpsR: A multifaceted regulator of photosynthesis gene expression in purple bacteria. *Mol Microbiol*. **57**(**1**):17–26.

Elsen S, Ponnampalam SN, Bauer CE (**1998**). CrtJ bound to distant binding sites interacts cooperatively to aerobically repress photopigment biosynthesis and light harvesting II gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J Biol Chem*. **273**(**46**):30762–30769.

Feeny P (**1992**). The evolution of chemical ecology: Contributions from the study of herbivorous insects. *In: Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites. Rosenthal GA & Berenbaum MR (ed.). Vol. II, Ecological and Evolutionary Processes, Academic Press, New York*. 1–44.

Fewell AM, Roddick JG (**1993**). Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids α-solanine and α-chaconine. *Phytochemistry*. **33**(**2**):323–328.

Fischer H (**1994**). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev*. **58**(**3**):352–386.

Flesch G, Rohmer M (**1988**). Prokaryotic hopanoids: The biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose. *Eur J Biochem*. **175**(**2**):405–11.

Fraatz MA, Berger RG, Zorn H (**2009**). Nootkatone - A biotechnological challenge. *Appl Microbiol Biotechnol*. **83**(**1**):35–41.

Frank T, Bieri K, Speiser B (**2002**). Feeding deterrent effect of carvone, a compound from caraway seeds, on the slug *Arion lusitanicus*. *Ann Appl Biol*. **141**(**2**):93–100.

Friedman M, Henika PR, Mandrell RE (**2002**). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot*. **65**(**10**):1545–1560.

Frister T, Beutel S (**2015**). Moschusduft und Patchouliöl. Zwei Duftbausteine für Parfümerie und Kosmetik. *Chem Unserer Zeit*. **49**(**5**):294–301.

Frohwitter J, Heider S a E, Peters-Wendisch P, Beekwilder J, Wendisch VF (**2014**). Production of the sesquiterpene (+)-valencene by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*. **191:**205–213.

Furusawa M, Hashimoto T, Noma Y, Asakawa Y (**2005**). Highly efficient production of nootkatone, the grapefruit aroma from valencene, by biotransformation. *Chem Pharm Bull*. **53**(**11**):1513–1514.

Gershenzon J, Dudareva N (**2007**). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol*. **3**(**7**):408–414.

Ghirardo A, Wright LP, Bi Z, Rosenkranz M, Pulido P, Rodríguez-Concepción M, Niinemets Ü, Brüggemann N, Gershenzon J, Schnitzler J (**2014**). Metabolic flux analysis of plastidic isoprenoid biosynthesis in poplar leaves emitting and nonemitting isoprene. *Plant Physiol*. **165**(**1**):37–51.

Girhard M, Machida K, Itoh M, Schmid RD, Arisawa A, Urlacher VB (**2009**). Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system. *Microb Cell Fact*. **8:**36.

Goldstein JL, Brown MS (**1990**). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. **343**(**6257**):425–430.

Golecki J, Schumacher A, Drews G (**1980**). The differentiation of the photosynthetic apparatus and the intracytoplasmic membrane in cells of *Rhodopseudomonas capsulata* upon variation of light intensity. *Eur J Cell Biol*. **23**(**1**):1–5.

González JE, Keshavan ND (**2006**). Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev*. **70**(**4**):859–875.

Goodman J, Walsh V (**2001**). The story of taxol: Nature and politics in the pursuit of an anti-cancer drug. *BMJ*. **323:**115.

Goodwin TW (**1980**). The biochemistry of the carotenoids. *New York: Chapman & Hall*. **1:**63.

Goodwin TW, Land DG, Sissins ME (**1956**). Studies in carotenogenesis. 23. The nature of the carotenoids in the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas spheroides* (athiorhodaceae). *Biochem J*. **64**(**3**):486–492.

Gora L (**2015**). Evaluation of the *Rhodobacter capsulatus* based synthesis of squalene and further plant triterpenes. *Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*.

Gregor J, Klug G (**2002**). Oxygen-regulated expression of genes for pigment binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. **4**(**3**):249–253.

Gregor J, Klug G (**1999**). Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiol Lett*. **179:**1–9.

Griffiths M, Sistrom WR, Cohen-Bazire G, Stanier RY (**1955**). Function of carotenoids in photosynthesis. *Nature*. **176**(**4495**):1211–1214.

Gruchattka E, Kayser O (**2015**). *In vivo* validation of *in silico* predicted *metabolic engineering* strategies in yeast: Disruption of α-ketoglutarate dehydrogenase and expression of ATP-citrate lyase for terpenoid production. *PLoS One*. **10**(**12**):e0144981.

Gubellini F, Francia F, Turina P, Lévy D, Venturoli G, Melandri BA (**2007**). Heterogeneity of photosynthetic membranes from *Rhodobacter capsulatus*: Size dispersion and ATP synthase distribution. *Biochim Biophys Acta*. **1767**(**11**):1340–1352.

Hahn FM, Baker JA, Poulter CD (**1996**). Open reading frame 176 in the photosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus* encodes *idi*, a gene for isopentenyl diphosphate isomerase. *J Bacteriol*. **178**(**3**):619–624.

Hahn FM, Eubanks LM, Testa CA, Blagg BSJ, Baker JA, Poulter CD (**2001**). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, the gene product of open reading frame (ORF) 2816 and ORF 2895 in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*. **183**(**1**):1–11.

Hahn FM, Hurlburt AP, Poulter CD (**1999**). *Escherichia coli* open reading frame 696 is *idi*, a nonessential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase. *J Bacteriol*. **181**(**15**):4499–4504.

Halaweish FT, Kronberg S, Mindy BH, Rice JA (**2002**). Toxic and aversive diterpenes of *Euphorbia esula*. *J Chem Ecol*. **28**(**8**):1599–1611.

Hamano Y, Kuzuyama T, Itoh N, Furihata K, Seto H, Dairi T (**2002**). Functional analysis of eubacterial diterpene cyclases responsible for biosynthesis of a diterpene antibiotic, terpentecin. *J Biol Chem*. **277**(**40**):37098–37104.

Hammer KA, Carson CF, Riley T V. (**2003**). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol*. **95**(**4**):853–860.

Hanahan D (**1983**). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. **166**(**4**):557–580.

Harada H, Misawa N (**2009**). Novel approaches and achievements in biosynthesis of functional isoprenoids in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. **84**(**6**):1021–1031.

Harker M, Bramley PM (**1999**). Expression of prokaryotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatases in *Escherichia coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. *FEBS Lett*. **448**(**1**):115–119.

Harrewijin P, van Oosten AM, Piron PGM, Hedden P (**2001**). Natural terpenoids as messengers. A multidisciplinary study of their production, biological functions and practical applications. *Ann Bot*. **90**(**2**):299–300.

Heath RJ, Rock CO (**2002**). The Claisen condensation in biology. *Nat Prod Rep*. **19**(**5**):581–596.

Heck A (**2008**). Synthese heterologer Membranproteine und Carotinoide in dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*.

Heider SAE, Peters-Wendisch P, Wendisch VF (**2012**). Carotenoid biosynthesis and overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Microbiol*. **12:**198.

Hemmerlin A, Harwood JL, Bach TJ (**2012**). A *raison d'être* for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Prog Lipid Res*. **51**(**2**):95–148.

Hemschemeier SK, Ebel U, Jäger A, Balzer A, Kirndörfer M, Klug G (**2000a**). *In vivo* and *in vitro* analysis of RegA response regulator mutants of *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. **2**(**3**):291–300.

Hemschemeier SK, Kirndörfer M, Ebel U, Klug G (**1999**). Transcriptional regulation of *puf* and *puc* operon expression in *Rhodobacter capsulatus* by the DNA binding protein RegA. *In: The phototrophic prokaryotes. Peschek et al. (ed), Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York,*. 127–131.

Hemschemeier SK, Kirndörfer M, Hebermehl M, Klug G (**2000b**). DNA binding of wild type RegA protein and its differential effect on the expression of pigment binding proteins in *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. **2**(**2**):235–243.

Hick AJ, Luszniak MC, Pickett J a. (**1999**). Volatile isoprenoids that control insect behaviour and development. *Nat Prod Rep*. **16**(**1**):39–54.

Hindson DD, Chambliss KL, Toth MJ, Tanaka RD, Gibson KM (**1997**). Post-translational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways. *J Lipid Res*. **38**(**11**):2216–2223.

Holton R a, Somoza C, Kim H, Liang F, Biediger RJ, Boatman PD, Shindo M, Smith CC, Kim S, Nadizadeh H, Suzuki Y, Tao C, Vu P, Tang S, Zhang P, Murthi KK, Gentile LN, Liu JH (**1994**). First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *J Am Chem Soc*. **116**(**4**):1597–1598.

Huang Q, Roessner CA, Croteau R, Scott AI (**2001**). Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. *Bioorg Med Chem*. **9**(**9**):2237–2242.

Hübner P, Willison JC, Vignais PM, Bickle TA (**1991**). Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*. **173**(**9**):2993–2999.

Hümbelin M, Thomas A, Lin J, Li J, Jore J, Berry A (**2002**). Genetics of isoprenoid biosynthesis in *Paracoccus zeaxanthinifaciens*. *Gene*. **297**(**1–2**):129–139.

Hunter CN, Daldal F, Thurnauer MC, Beatty JT (**2009**). The purple phototrophic bacteria. Advances in photosynthesis and respiration. Volume 28. *Springer, Drodrecht, The Netherlands*.

Imhoff JF, Trüper HG (**1989**). Purple nonsulfur bacteria. *In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Staley JT (ed). The Williams & Wilkins Co., Baltimore*. 1658–1682.

Imhoff JF, Trüper HG, Pfennig N (**1984**). Rearrangement of the species and genera of the phototrophic "purple nonsulfur bacteria." *Int J Syst Bacteriol*. **34**(**3**):340–343.

Inoue K, Kouadio JK, Mosley CS, Bauer CE (**1995**). Isolation and *in vitro* phosphorylation of sensory transduction components controlling anaerobic induction of light harvesting and reaction center gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry*. **34**(**2**):391–396.

Isman MB, Koul O, Luczynski A, Kaminski J (**1990**). Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *J Agric Food Chem*. **38**(**6**):1406–1411.

Ito H, Muranaka T, Mori K, Jin ZX, Yoshida T (**1997**). Dryofragin and aspidin pd, piscicidal compononents from *Dryopteris fragrans*. *Chem Pharm Bull*. **45**(**10**):1720–1722.

Jahn A, Keuntje B, Drffler M, Klipp W, Oelze J (**1994**). Optimizing photoheterotrophic H_2 production by *Rhodobacter capsulatus* upon interposon mutagenesis in the *hupL* gene. *Appl Microbiol Biotechnol*. **40**(**5**):687–690.

Jansen BJM, de Groot A (**2004**). Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. *Nat Prod Rep*. **21**(**4**):449–477.

Jingami H, Brown MS, Goldstein JL, Anderson RG, Luskey KL (**1987**). Partial deletion of membrane-bound domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase eliminates sterol-enhanced degradation and prevents formation of crystalloid endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. **104**(**6**):1693–1704.

Jordan MA, Wilson L (**2004**). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. **4**(**4**):253–265.

Jung V, Pohnert G (**2001**). Rapid wound-activated transformation of the green algal defensive metabolite caulerpenyne. *Tetrahedron*. **57**(**33**):7169–7172.

Justicia J, Oltra JE, Barrero AF, Guadaño A, González-Coloma A, Cuerva JM (**2005**). Total synthesis of 3-hydroxydrimanes mediated by titanocene(III) - Evaluation of their antifeedant activity. *Eur J Org Chem*. **2005**(**4**):712–718.

Kajiwara S, Fraser PD, Kondo K, Misawa N (**1997**). Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J*. **324**(**2**):421–426.

Kakinuma K, Dekishima Y, Matsushima Y, Eguchi T, Misawa N, Takagi M, Kuzuyama T, Seto H (**2001**). New approach to multiply deuterated isoprenoids using triply engineered *Escherichia coli* and its potential as a tool for mechanistic enzymology. *J Am Chem Soc*. **123**(**6**):1238–1239.

Katzke N (**2010**). Entwicklung eines *Rhodobacter*-basierten Systems zur Synthese wirtsfremder Proteine und Phospholipide. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*.

Katzke N, Arvani S, Bergmann R, Circolone F, Markert A, Svensson V, Jaeger K-E, Heck A, Drepper T (**2010**). A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Expr Purif*. **69**(**2**):137–146.

Kaufmann N, Reidl H-H, Golecki JR, Garcia AF, Drews G (**1982**). Differentiation of the membrane system in cells of *Rhodopseudomonas capsulata* after transition from chemotrophic to phototrophic growth conditions. *Arch Microbiol*. **131:**313–322.

Kavanagh KL, Guo K, Dunford JE, Wu X, Knapp S, Ebetino FH, Rogers MJ, Russell RGG, Oppermann U (**2006**). The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**(**20**):7829–34.

Keasling JD, Newman JD, Pitera DJ (**2010**). Method for enhancing production of isoprenoid compounds. *US 7670825 B2*.

Kekulé A (**1863**). Lehrbuch der organischen Chemie. *Verlag von Ferdinand Enke, Erlangen*.

Kemp LE, Alphey MS, Bond CS, Ferguson MAJ, Hecht S, Bacher A, Eisenreich W, Rohdich F, Hunter WN (**2005**). The identification of isoprenoids that bind in the intersubunit cavity of *Escherichia coli* 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase by complementary biophysical methods. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **61**(**1**):45–52.

Kemp LE, Bond CS, Hunter WN (**2002**). Structure of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase: An essential enzyme for isoprenoid biosynthesis and target for antimicrobial drug development. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**(**10**):6591–6596.

Kern M, Kamp P, Paschen A, Masepohl B, Klipp W (**1998**). Evidence for a regulatory link of nitrogen fixation and photosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* via HvrA. *J Bacteriol*. **180**(**7**):1965–1969.

Khan NE, Nybo SE, Chappell J, Curtis WR (**2015**). Triterpene hydrocarbon production engineered into a metabolically versatile host - *Rhodobacter capsulatus*. *Biotechnol Bioeng*. **112**(**8**):1523–1532.

Kiley PJ, Kaplan S (**1988**). Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiol Rev*. **52**(**1**):50–69.

Kingston D, Jagtop P, Yuan H, Samala L (**2002**). The chemistry of taxol and related taxoids. *Fortschr Chem Org Naturst*. **84:**53–225.

Kingston DGI (**1994**). Taxol: The chemistry and structure-activity relationships of a novel anticancer agent. *Trends Biotechnol*. **12**(**6**):222–227.

Kirby J, Keasling JD (**2008**). *Metabolic engineering* of microorganisms for isoprenoid production. *Nat Prod Rep*. **25**(**4**):656–61.

Kirndörfer M, Jäger A, Klug G (**1998**). Integration host factor affects the oxygen-regulated expression of photosynthesis genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Gen Genet*. **258**(**3**):297–305.

Klipp W, Masepohl B, Pühler A (**1988**). Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: Duplication of a *nifA-nifB* region. *J Bacteriol*. **170**(**2**):693–699.

Klug G, Kaufmann N, Drews G (**1985**). Gene expression of pigment-binding proteins of the bacterial photosynthetic apparatus: Transcription and assembly in the membrane of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **82**(**19**):6485–6489.

Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, Ståhl B (**2006**). Diversity and distribution of floral scent. *Bot Rev*. **72**(**1**):1–120.

Kobayashi K, Suzuki M, Tang J, Nagata N, Ohyama K, Seki H, Kiuchi R, Kaneko Y, Nakazawa M, Matsui M, Matsumoto S, Yoshida S, Muranaka T (**2007**). Lovastatin insensitive 1, a novel pentatricopeptide repeat protein, is a potential regulatory factor of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. **48**(**2**):322–331.

Koh CM (**2013**). Storage of bacteria and yeast. *Methods Enzymol*. **533:**15–21.

Kovach M, Phillips R, Elzer P, Roop R 2nd, Peterson K (**1994**). pBBR1MCS: A broad-host-range cloning vector. *Biotechniques*. **16**(**5**):800–802.

Kranz RG, Gabbert KK, Locke TA, Madigan MT (**1997**). Polyhydroxyalkanoate production in *Rhodobacter capsulatus*: Genes, mutants, expression, and physiology. *Appl Environ Microbiol*. **63**(**8**):3003–3009.

Kranz RG, Haselkorn R (**1986**). Anaerobic regulation of nitrogen-fixation genes in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **83**(**18**):6805–6809.

Krishna S, Woodrow CJ, Staines HM, Haynes RK, Mercereau-Puijalon O (**2006**). Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of *in vitro* resistance. *Trends Mol Med*. **12**(**5**):200–205.

Kunert G, Otto S, Röse USR, Gershenzon J, Weisser WW (**2005**). Alarm pheromone mediates production of winged dispersal morphs in aphids. *Ecol Lett*. **8**(**6**):596–603.

Kuzuyama T, Takagi M, Takahashi S, Seto H (**2000**). Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J Bacteriol*. **182**(**4**):891–897.

Laemmli U (**1970**). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**(**5259**):680–685.

Lange BM, Rujan T, Martin W, Croteau R (**2000**). Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**(**24**):13172–13177.

Langenheim JH (**1994**). Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. *J Chem Ecol*. **20**(**6**):1223–1280.

Lauersen KJ, Baier T, Wichmann J, Wördenweber R, Mussgnug JH, Hübner W, Huser T, Kruse O (**2016**). Efficient phototrophic production of a high-value sesquiterpenoid from the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Metab Eng*. **38:**331–343.

Laurent P, Braekman JC, Daloze D, Pasteels J (**2003**). Biosynthesis of defensive compounds from beetles and ants. *Eur J Org Chem*. **2003**(**15**):2733–2743.

Lee S, Peterson CJ, Coats JR (**2003**). Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J Stored Prod Res*. **39**(**1**):77–85.

Leffingwell JC, Leffingwell D (**2015**). Biotechnology - conquests and challenges in flavors & fragrances. *Leffingwell Reports*. **7**(**2**):1–11.

Leivar P, Antolín-Llovera M, Ferrero S, Closa M, Arró M, Ferrer A, Boronat A, Campos N (**2011**). Multilevel control of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by protein phosphatase 2A. *Plant Cell*. **23**(**4**):1494–511.

Lesburg CA, Zhai G, Cane DE, Christianson DW (**1997**). Crystal structure of pentalenene synthase: Mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science*. **277**(**5333**):1820–1824.

Lim HN, Lee Y, Hussein R (**2011**). Fundamental relationship between operon organization and gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. **108**(**26**):10626–10631.

Linke K (**2017**). Heterologe Produktion von verschiedenen Terpenklassen in *Rhodobacter capsulatus*. *Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*.

Liu K, Chen Q, Liu Y, Zhou X, Wang X (**2012**). Isolation and biological activities of decanal, linalool, valencene, and octanal from sweet orange oil. *J Food Sci*. **77**(**11**):C1156-1161.

Liu S, Li X, Zhang G, Zhang J (**2015**). Effect of magnesium ion on *crt* gene expression in improving carotenoid yield of *Rhodobacter sphaeroides*. *Arch Microbiol*. **197**(**9**):1101–1108.

Loeschcke A (**2012**). Funktionelle Koexpression geclusterter Gene in verschiedenen Bakterien mithilfe des TREX-Systems. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*.

Loeschcke A, Markert A, Wilhelm S, Wirtz A, Rosenau F, Jaeger K-E, Drepper T (**2013**). TREX: A universal tool for the transfer and expression of biosynthetic pathways in bacteria. *ACS Synth Biol*. **2**(**1**):22–33.

Lois LM, Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N, Boronat A (**2000**). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J*. **22**(**6**):503–513.

Lorimer SD, Perry NB, Foster LM, Burgess EJ, Douch PGC, Hamilton MC, Donaghy MJ, McGregor RA (**1996**). A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products. *J Agric Food Chem*. **44**(**9**):2842–2845.

Lunde CS, Kubo I (**2000**). Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**(**7**):1943–1953.

Lüttgen H, Rohdich F, Herz S, Wungsintaweekul J, Hecht S, Schuhr C a, Fellermeier M, Sagner S, Zenk MH, Bacher A, Eisenreich W (**2000**). Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**(**3**):1062–1067.

Malach A (**2013**). *Rhodobacter capsulatus* als Wirtsstamm zum aktivitätsbasierten Screening von Enzymen und

zur Synthese von Membranproteinen. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*.

Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD (**2003**). Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*. **21**(**7**):796–802.

Martin VJJ, Yoshikuni Y, Keasling JD (**2001**). The in vivo synthesis of plant sesquiterpenes by *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. **75**(**5**):497–503.

Martínez-Argudo I, Martín-Nieto J, Salinas P, Maldonado R, Drummond M, Contreras A (**2001**). Two-hybrid analysis of domain interactions involving NtrB and NtrC two-component regulators. *Mol Microbiol*. **40**(**1**):169–178.

Marusich WL, Bauernfeind J (**1981**). Oxycarotenoids in poultry feed. *In: Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Bauernfeind JC (ed.). Academic Press, New York*. 319–462.

Masepohl B, Drepper T, Paschen A, Groß S, Pawlowski A, Raabe K, Riedel K-U, Klipp W (**2002**). Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. **4**(**3**):243–248.

Masepohl B, Hallenbeck P (**2010**). Nitrogen and molybdenum control of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Adv Exp Med Biol.* **675:**49–70.

Masepohl B, Klipp W, Pühler A (**1988**). Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Gen Genet*. **212**(**1**):27–37.

Masepohl B, Kranz RG (**2009**). Regulation of nitrogen fixation. *In: The purple phototrophic bacteria. Hunter C N, Daldal F, Thurnauer M C, Beatty J T (ed). Springer, Drodrecht, The Netherlands*. 759–775.

Matthews PD, Wurtzel ET (**2000**). *Metabolic engineering* of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase. *Appl Microbiol Biotechnol*. **53**(**4**):396–400.

McCrindle S, Kappler U, McEwan A (**2005**). Microbial dimethylsulfoxide and trimethylamine-N-oxide respiration. *Adv Microb Physiol.* **50:**147–198.

Miallau L, Alphey MS, Kemp LE, Leonard G a, McSweeney SM, Hecht S, Bacher A, Eisenreich W, Rohdich F, Hunter WN (**2003**). Biosynthesis of isoprenoids: crystal structure of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**(**16**):9173–9178.

Miller B, Heuser T, Zimmer W (**1999**). A *Synechococcus leopoliensis* SAUG 1402-1 operon harboring the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase gene and two additional open reading frames is functionally involved in the dimethylallyl diphosphate synthesis. *FEBS Lett*. **460**(**3**):485–490.

Miller B, Heuser T, Zimmer W (**2000**). Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett*. **481**(**3**):221–226.

Miller B, Madilao LL, Ralph S, Bohlmann J (**2005**). Insect-induced conifer defense. White pine weevil and methyl jasmonate induce traumatic resinosis, de novo formed volatile emissions, and accumulation of terpenoid synthase and putative octadecanoid pathway transcripts in Sitka spruce. *Plant Physiol*. **137**(**1**):369–382.

Mirza SS, Qazi JI, Zhao Q, Chen S (**2013**). Photo-biohydrogen production potential of *Rhodobacter capsulatus*-PK from wheat straw. *Biotechnol Biofuels*. **6**(**1**):144.

Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K, Yamano S, Izawa Y, Nakamura K, Harashima K (**1990**). Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **172**(**12**):6704–6712.

Mitchell W (**2011**). Natural products from synthetic biology. *Curr Opin Chem Biol*. **15**(**4**):505–515.

Miziorko H (**2011**). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*. **505**(**2**):131–143.

Molisch H (**1907**). Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen: Eine mikrobiologische Studie von Molisch, Hans [1856-1937]. *Gustav Fischer, Jena - Expatriate Bookshop of Denmark*.

Morett E, Buck M (**1988**). NifA-dependent *in vivo* protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*. **85**(**24**):9401–9405.

Mosley CS, Suzuki JY, Bauer CE (**1994**). Identification and molecular genetic characterization of a sensor kinase responsible for coordinately regulating light harvesting and reaction center gene expression in response to anaerobiosis. *J Bacteriol*. **176**(**24**):7566–7573.

Mullis KB, Faloona FA (**1987**). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. **155:**335–350.

Mumm R, Hilker M (**2006**). Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. *Trends Plant Sci*. **11**(**7**):351–358.

Munck SL, Croteau R (**1990**). Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase patchoulol synthase from *Pogostemon cablin*. *Arch Biochem Biophys*. **282**(**1**):58–64.

Murakami A, Takahashi D, Kinoshita T, Koshimizu K, Kim H, Yoshihiro A, Nakamura Y, Jiwajinda S, Terao J, Ohigashi H (**2002**). Zerumbone, a Southeast Asian ginger sesquiterpene, markedly suppresses free radical generation, proinflammatory protein production, and cancer cell proliferation accompanied by apoptosis: The alpha,beta-unsaturated carbonyl group is a prerequisite. *Carcinogenesis*. **23**(**5**):795–802.

Nadell CD, Xavier JB, Levin SA, Foster KR (**2008**). The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PloS Biol*. **6**(**1**):e14.

Näf F, Decorzant R, Giersch W, Ohloff G (**1981**). A stereocontrolled access to (±)-, (−)-, and (+)-patchouli alcohol. *Helv Chim Acta*. **64**(**5**):1387–1397.

Narberhaus F, Lee HS, Schmitz RA, He L, Kustu S (**1995**). The C-terminal domain of NifL is sufficient to inhibit NifA activity. *J Bacteriol*. **177**(**17**):5078–5087.

Nedorostova L, Kloucek P, Kokoska L, Stolcova M, Pulkrabek J (**2009**). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*. **20**(**2**):157–160.

Nelson D, Cox M (**2009**). Lehninger Biochemie. *Springer, 4. Auflage*. 259–267.

Newman JD, Marshall J, Chang M, Nowroozi F, Paradise E, Pitera D, Newman KL, Keasling JD (**2006**). High-level production of amorpha-4,11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. **95**(**4**):684–691.

Niederman RA (**2013**). Membrane development in purple photosynthetic bacteria in response to alterations in light intensity and oxygen tension. *Photosynth Res*. **116**(**2**–**3**):333–348.

Oelze J, Drews G (**1972**). Membranes of photosynthetic bacteria. *Biochim Biophys Acta*. **265:**209–239.

Ogura K, Koyama T (**1998**). Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chem Rev*. **98**(**4**):1263–1276.

Ohnuma SI, Hirooka K, Tsuruoka N, Yano M, Ohto C, Nakane H, Nishino T (**1998**). A pathway where polyprenyl diphosphate elongates in prenyltransferase. Insight into a common mechanism of chain length determination of prenyltransferases. *J Biol Chem*. **273**(**41**):26705–26713.

Ohnuma SI, Narita K, Nakazawa T, Ishida C, Takeuchi Y, Ohto C, Nishino T (**1996**). A role of the amino acid residue located on the fifth position before the first aspartate-rich motif of farnesyl diphosphate synthase on determination of the final product. *J Biol Chem*. **271**(**48**):30748–30754.

Okada K, Kasahara H, Yamaguchi S, Kawaide H, Kamiya Y, Nojiri H, Yamane H (**2008**). Genetic evidence for the role of isopentenyl diphosphate isomerases in the mevalonate pathway and plant development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. **49**(**4**):604–616.

Omar AS, Flammann HT, Golecki JR, Weckesser J (**1983**). Detection of capsule and slime polysaceharide layers in two strains of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch Microbiol*. **134:**114–117.

Ozaki Y, Kawahara N, Harada M (**1991**). Anti-inflammatory effect of *Zingiber cassumunar* Roxb. and its active principles. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **39**(**9**):2353–2356.

Özgür AY (**2015**). Evaluation of a *Rhodobacter capsulatus nif* promoter-based system for the heterologous expression of therapeutically relevant membrane proteins. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*.

Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, Benjamin K, Fisher K, McPhee D, *et al.* (**2013**). High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*. **496**(**7446**):528–532.

Paduch R, Kandefer-Szerszeń M, Trytek M, Fiedurek J (**2007**). Terpenes: Substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Exp*. **55**(**5**):315–327.

Pandey AK, Palni UT, Tripathi NN (**2014a**). Repellent activity of some essential oils against two stored product beetles *Callosobruchus chinensis* L. and *C. maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) with reference to *Chenopodium ambrosioides* L. oil for the safety of pigeon pea seeds. *J Food Sci Technol*. **51**(**12**):4066–4071.

Pandey AK, Singh P, Palni UT, Tripathi NN (**2014b**). *In vivo* evaluation of two essential oil based botanical formulations (EOBBFs) for the use against stored product pathogens and pests, *Aspergillus* species and *Callosobruchus* species (Coleoptera: Bruchidae). *J Stored Prod Res*. **59:**285–291.

Paradise EM, Kirby J, Chan R, Keasling JD (**2008**). Redirection of flux through the FPP branch-point in *Saccharomyces cerevisiae* by down-regulating squalene synthase. *Biotechnol Bioeng*. **100**(**2**):371–378.

Park J, Zielinski M, Magder A, Tsantrizos YS, Berghuis AM (**2017**). Human farnesyl pyrophosphate synthase is allosterically inhibited by its own product. *Nat Commun*. **8**(**14132**):1–8.

Pateraki I, Heskes AM, Hamberger B (**2015**). Cytochromes P450 for terpene functionalisation and *metabolic engineering*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. **148:**107–139.

Patra B, Schluttenhofer C, Wu Y, Pattanaik S, Yuan L (**2013**). Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *Biochim Biophys Acta*. **1829**(**11**):1236–1247.

Paul VJ, Van Alstyne KL (**1992**). Activation of chemical defenses in the tropical green algae *Halimeda* spp. *J Exp Mar Biol Ecol*. **160**(**2**):191–203.

Paul VJ, Seo Y, Cho KW, Rho JR, Shin J, Bergquist PR (**1997**). Sesquiterpenoids of the drimane class from a

sponge of the genus *Dysidea*. *J Nat Prod*. **60**(**11**):1115–1120.

Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, Keasling JD (**2007**). Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*. **9**(**2**):193–207.

Ponnampalam SN, Buggy JJ, Bauer CE (**1995**). Characterization of an aerobic repressor that coordinately regulates bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*. **177**(**11**):2990–2997.

Popják G, Agnew W (**1979**). Squalene synthetase. *Mol Cell Biochem*. **27**(**2**):97–116.

Preker P, Hübner P, Schmehl M, Klipp W, Bickle TA (**1992**). Mapping and characterization of the promoter elements of the regulatory *nif* genes *rpoN* , *nifA1* and *nifA2* in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol*. **6**(**8**):1035–1047.

Proteau PJ (**2004**). 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: An overview. *Bioorg Chem*. **32**(**6**):483–493.

Pulz MO, Gross W (**2004**). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*. **65:**635–648.

Quintana A, Reinhard J, Faure R, Uva P, Bagnères AG, Massiot G, Clément JL (**2003**). Interspecific variation in terpenoid composition of defensive secretions of European *Reticulitermes* termites. *J Chem Ecol*. **29**(**3**):639–652.

Rasmann S, Köllner TG, Degenhardt J, Hiltpold I, Toepfer S, Kuhlmann U, Gershenzon J, Turlings TC (**2005**). Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*. **434**(**7034**):732–737.

Rastogi N, Abaul J, Goh KS, Devallois A, Philogèn E, Bourgeois P (**1998**). Antimycobacterial activity of chemically defined natural substances from the Caribbean flora in Guadeloupe. *FEMS Immunol Med Microbiol*. **20**(**4**):267–273.

Richmond A (**2014**). Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. *Blackwell Science, Oxford , UK*.

Rilling HC (**1985**). The mechanism of the condensation reactions of cholesterol biosynthesis. *Biochem Soc Trans*. **13**(**6**):997–1003.

Rilling HC, Poulter CD, Epstein WW, Larsen B (**1971**). Studies on the mechanism of squalene biosynthesis. Presqualene pyrophosphate, stereochemistry and a mechanism for its conversion to squalene. *J Am Chem Soc*. **93**(**7**):1783–1785.

Ro D-K, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho K a, Eachus R a, Ham TS, Kirby J, Chang MCY, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD (**2006**). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*. **440**(**7086**):940–943.

Rohdich F, Hecht S, Gärtner K, Adam P, Krieger C, Amslinger S, Arigoni D, Bacher A, Eisenreich W (**2002**). Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**(**3**):1158–1163.

Rohdich F, Wungsintaweekul J, Fellermeier M, Sagner S, Herz S, Kis K, Eisenreich W, Bacher A, Zenk MH (**1999**). Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**(**21**):11758–11763.

Rohmer M (**1999**). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep*. **16**(**5**):565–574.

Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahm H (**1993**). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J*. **295**(**2**):517–524.

Rosenau F, Jaeger K-E (**2004**). Overexpression and secretion of biocatalysts in *Pseudomonas*. *In: Enzyme Functionality—Design, Engineering, and Screening. Svendsen A (Ed.), Marcel Dekker, New York*. 617–631.

Rowinsky EK, Citardi MJ, Noe DA, Donehower RC (**1993**). Sequence-dependent cytotoxic effects due to combinations of cisplatin and the antimicrotubule agents taxol and vincristine. *J Cancer Res Clin Oncol*. **119**(**12**):727–733.

Russin WA, Ellis DD, Gottwald JR, Zeldin EL, Brodhagen M, Evert RF (**1995**). Immunocytochemical localization of taxol in *taxus cuspidata*. *Int J Plant Sci*. **156**(**5**):668–678.

Ruzicka L (**1953**). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*. **9**(**10**):357–367.

Ruzicka L (**1963**). Perspektiven der Biogenese und der Chemie der Terpene. *Biogenese und Chemie der Terpene*. **6**(**4**):493–523.

Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H (**1988**). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**(**4839**):487–491.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (**1989**). Molecular cloning: A laboratory manual. *2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.*

Sato R, Goldstein JL, Brown MS (**1993**). Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**(**20**):9261–9265.

Schafer BL, Bishop RW, Kratunis VJ, Kalinowski SS, Mosley ST, Gibson KM, Tanakan RD (**1992**). Molecular cloning of human mevalonate kinase and identification of a missense mutation in the genetic disease mevalonic aciduria. *J Biol Chem*. **267**(**19**):13229–13238.

Schneider K, Müller A, Schramm U, Klipp W (**1991**). Demonstration of a molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a *nifHDK*-deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *Eur J Biochem*. **195**(**3**):653–661.

Scholtmeijer K, Cankar K, Beekwilder J, Wösten H a B, Lugones LG, Bosch D (**2014**). Production of (+)-valencene in the mushroom-forming fungus *S. commune*. *Appl Microbiol Biotechnol*. **98**(**11**):5059–5068.

Schüddekopf K, Hennecke S, Liese U, Kutsche M, Klipp W (**1993**). Characterization of *anf* genes specific for the alternative nitrogenase and identification of *nif* genes required for both nitrogenases in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol*. **8**(**4**):673–684.

Schumacher A, Drews G (**1978**). The formation of bacteriochlorophyll.protein complexes of the photosynthetic apparatus of *Rhodopseudomonas capsulata* during early stages of development. *Biochim Biophys Acta*. **501**(**2**):183–194.

Schwarz MK (**1994**). Terpen Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte. *Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich*.

Sganga MW, Bauer CE (**1992**). Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light-harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Cell*. **68**(**5**):945–954.

Shields VDC, Hildebrand JG (**2001**). Responses of a population of antennal olfactory receptor cells in the female moth *Manduca sexta* to plant-associated volatile organic compounds. *J Comp Physiol A*. **186**(**12**):1135–1151.

Shimada H, Kondo K, Fraser PD, Miura Y, Saito T, Misawa N (**1998**). Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through *metabolic engineering* of the isoprenoid pathway. *Appl Environ Microbiol*. **64**(**7**):2676–2680.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson T, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson J, Higgins D (**2011**). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. **7:**593.

Simon R, Priefer U, Pühler A (**1983**). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotechnol*. **1**(**9**):784–791.

Simpson KL, Katayama T, Chichester CO (**1981**). Carotenoids in fish feed. *In: Carotenoids as food colorants and vitamie A precursors. Academic press, New York*. 463–538.

Singh J, Tripathi NN (**1999**). Inhibition of storage fungi of blackgram (*Vigna mungo* L.) by some essential oils. *Flavour Frag J*. **14**(**1**):1–4.

Singh M, Sharma S, Ramesh S (**2002**). Herbage, oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate. *Ind Crop Prod*. **16**(**2**):101–107.

Singh S, Majumdar DK, Rehan HMS (**1996**). Evaluation of anti-inflammatory potential of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holybasil) and its possible mechanism of action. *J Ethnopharmacol*. **54**(**1**):19–26.

Sistrom B, Griffiths M, Stanier RY (**1956**). The biology of a photosynthetic bacterium which lacks colored carotenoids. *J Cell Comp Physiol*. **48**(**3**):473–515.

Smith HO, Birnstiel ML (**1976**). A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Res*. **3**(**9**):2387–2398.

Somleva MN, Peoples OP, Snell KD (**2013**). PHA bioplastics, biochemicals, and energy from crops. *Plant Biotechnol J*. **11**(**2**):233–252.

Song JH, Murphy RJ, Narayan R, Davies GBH (**2009**). Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **364**(**1526**):2127–2139.

Starks CM, Back K, Chappell J, Noel JP (**1997**). Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. *Science*. **277**(**5333**):1815–1820.

Steele CL, Crock J, Bohlmann J, Croteau R (**1998**). Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *J Biol Chem*. **273**(**4**):2078–2089.

Steinbacher S, Kaiser J, Wungsintaweekul J, Hecht S, Eisenreich W, Gerhardt S, Bacher A, Rohdich F (**2002**). Structure of 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase involved in mevalonate-independent biosynthesis of isoprenoids. *J Mol Biol*. **316**(**1**):79–88.

Steinbüchel A (**2003**). Production of rubber-like polymers by microorganisms. *Curr Opin Microbiol*. **6**(**3**):261–270.

Stoppani AOM, Fuller RC, Calvlin M (**1955**). Carbon dioxid fixation by *Rhodopseudomonas capsulatus*. *J Bacteriol*. **69**(**5**):491–501.

Strnad H, Lapidus A, Paces J, Ulbrich P, Vlcek C, Paces V, Haselkorn R (**2010**). Complete genome sequence of the photosynthetic purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB1003. *J Bacteriol*. **192**(**13**):3545–3546.

Summers C, Karst F, Charles AD (**1993**). Cloning, expression and characterisation of the cDNA encoding human hepatic squalene synthase, and its relationship to phytoene synthase. *Gene*. **136**(**1–2**):185–192.

Mac Sweeney A, Lange R, Fernandes RPM, Schulz H, Dale GE, Douangamath A, Proteau PJ, Oefner C (**2005**). The crystal structure of *E. coli* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation. *J Mol Biol*. **345**(**1**):115–127.

Szczepanik M, Dams I, Wawrzeńczyk C (**2005**). Feeding deterrent activity of terpenoid lactones with the p - menthane system against the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ Entomol*. **34**(**6**):1433–1440.

Szkopińska A, Swiezewska E, Karst F (**2000**). The regulation of activity of main mevalonic acid pathway enzymes: farnesyl diphosphate synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, and squalene synthase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. **267**(**1**):473–477.

Tabita R (**1995**). The biochemistry and metabolic regulation of carbon metabolism and CO_2 fixation in purple bacteria. *In: Anoxygenic photosynthetic bacteria. Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*.

Tarshis LC, Yan M, Poulter CD, Sacchettini JC (**1994**). Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-A resolution. *Biochemistry*. **33**(**36**):10871–10877.

Temple SJ, Vance CP, Gantt JS (**1998**). Glutamate synthase and nitrogen. *trends in plant science reviews*. **3**(**2**):51–56.

Theis N, Lerdau M (**2003**). The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int J Plant Sci*. **164**(**S3**):93–102.

Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, O'Maille P, Osbourn A (**2014**). Triterpene biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol*. **65:**225–57.

Tsuruta H, Paddon CJ, Eng D, Lenihan JR, Horning T, Anthony LC, Regentin R, Keasling JD, Renninger NS, Newman JD (**2009**). High-level production of amorpha-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. *PLoS One*. **4**(**2**):e4489.

Tucker JD, Siebert CA, Escalante M, Adams PG, Olsen JD, Otto C, Stokes DL, Hunter CN (**2010**). Membrane invagination in *Rhodobacter sphaeroides* is initiated at curved regions of the cytoplasmic membrane, then forms both budded and fully detached spherical vesicles. *Mol Microbiol*. **76**(**4**):833–847.

Verwaal R, Wang J, Meijnen J, Visser H, Sandmann G, van den Berg JA, van Ooyen AJJ (**2007**). High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol*. **73**(**13**):4342–4350.

Vignais PM, Dimon B, Zorin NA, Tomiyama M, Colbeau A (**2000**). Characterization of the hydrogen-deuterium exchange activities of the energy-transducing HupSL hydrogenase and H_2-signaling HupUV hydrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*. **182**(**21**):5997–6004.

Vogel BS, Wildung MR, Vogel G, Croteau R (**1996**). Abietadiene synthase from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase involved in resin acid biosynthesis. *J Biol Chem*. **271**(**38**):23262–23268.

Vogelstein B, Gillespie D (**1979**). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA*. **76**(**2**):615–619.

Vourc'h G, De Garine-Wichatitsky M, Labbé A, Rosolowski D, Martin JL, Fritz H (**2002**). Monoterpene effect on feeding choice by deer. *J Chem Ecol*. **28**(**12**):2411–2427.

Walker JE, Saraste M, Runswick M, Gay NJ (**1982**). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*. **1**(**8**):945–951.

Wang G, Tang W, Bidigare RR (**2005**). . *In: Natural products: Drug discovery and therapeutic medicine; Zhang & Demain (ed.); Humana Press: Totowa, NJ, USA*. 197–227.

Wang KC, Ohnuma S ichi (**2000**). Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim Biophys Acta*. **1529**(**1–3**):33–48.

Weaver PF, Wall JD, Gest H (**1975**). Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch Microbiol*. **105**(**3**):207–216.

Weber TM (**2016**). Produktion des Triterpens Squalen und verschiedener Derivate in *Rhodobacter capsulatus*.

Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Weckesser J, Drews G, Fromme I (**1972**). Chemical analysis of and degradation studies on the cell wall lipopolysaccharide of *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Bacteriol*. **109**(**3**):1106–1113.

Weitzel C, Simonsen HT (**2013**). Cytochrome P450-enzymes involved in the biosynthesis of mono- and sesquiterpenes. *Phytochem Rev*. **14**(**1**):7–24.

Wellington CL, Taggart AKP, Beatty JT (**1991**). Functional significance of overlapping transcripts of *crtEF*, *bchCA*, and *puf* photosynthesis gene operons in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*. **173**(**9**):2954–2961.

Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, Eng D, Woolard FX, Regentin R, *et al.* (**2012**). Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc Natl Acad Sci USA*. **109**(**3**):E111-118.

Whited GM, Feher FJ, Benko DA, Cervin MA, Chotani GK, McAuliffe JC, La Duca RJ, Ben-Shoshan E, Sanford KJ (**2010**). Development of a gas-phase bioprocess for isoprene-monomer production using metabolic pathway engineering. *Ind Biotechnol*. **6**(**3**):152–163.

Willett J, Smart JL, Bauer CE (**2007**). RegA control of bacteriochlorophyll and carotenoid synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*. **189**(**21**):7765–7773.

Wilson KJ, Juan PM (**1989**). Protein and peptide purification. *In Protein sequencing, a practical approach. Findley JBC & Geisow ML (ed.). IRL Press, Oxford*.

Withers ST, Keasling JD (**2007**). Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Appl Microbiol Biotechnol*. **73**(**5**):980–990.

Woronowicz K, Harrold JW, Kay JM, Niederman RA (**2013**). Structural and functional proteomics of intracytoplasmic membrane assembly in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. **23**(**1–2**):48–62.

Wouters J, Oudjama Y, Ghosh S, Stalon V, Droogmans L, Oldfield E (**2003**). Structure and mechanism of action of isopentenylpyrophosphate-dimethylallylpyrophosphate isomerase. *J Am Chem Soc*. **125**(**11**):3198–3199.

Wu J, Bauer C (**2008**). RegB/RegA, a global redox-responding two-component system. *Adv Exp Med Biol.* **631:**131–148.

Xiao Z, Itokawa H, Lee K-H (**2003**). Total synthesis of taxoids. *In: Taxus - The Genus Taxus. XIAO Z, ITOKAWA H, LEE K-H (ed.). Taylor & Francis, London and New York*. 245–297.

Ye L, Zhang C, Bi C, Li Q, Zhang X (**2016**). Combinatory optimization of chromosomal integrated mevalonate pathway for β-carotene production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. **15**(**1**):202.

Yen HC, Marrs B (**1976**). Map of genes for carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Bacteriol*. **126**(**2**):619–629.

Yoon S-H, Lee Y-M, Kim J-E, Lee S-H, Lee J, Kim J-Y, Jung K-H, Shin Y-C, Keasling JD, Kim S-W (**2006**). Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate. *Biotechnol Bioeng*. **94**(**6**):1025–1032.

Zannoni D (**1995**). Aerobic and anaerobic electron transport chains in anoxygenic phototrophic bacteria. *In: Anoxygenic photosynthetic bacteria. Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*.

Zhou K, Zou R, Zhang C, Stephanopoulos G, Too H-P (**2013**). Optimization of amorphadiene synthesis in *Bacillus subtilis* via transcriptional, translational, and media modulation. *Biotechnol Bioeng*. **110**(**9**):2556–2561.

8 ANHANG

8.1 Kodonoptimierte Sequenzen der verwendeten Terpensynthasen

8.1.1 Kodonoptimierte DNA-Sequenz der Patchoulolsynthase aus *Pogostemon cablin*

ATGGAACTGTATGCGCAGTCGGTGGGCGTGGGCGCCGCGTCGCGGCCGCTGGCGAACTTCCACCCCTGCGTGTGGGGCG
ATAAATTCATCGTCTATAACCCCCAGTCGTGCCAGGCCGGGGAGCGGGAAGAGGCGGAAGAGCTGAAGGTCGAGCTCAA
GCGGGAGCTGAAGGAAGCGAGCGATAACTATATGCGGCAGCTGAAAATGGTGGACGCCATCCAGCGCCTGGGGATCGA
TTATCTGTTCGTCGAGGACGTCGATGAAGCCCTGAAGAACCTGTTCGAGATGTTCGATGCCTTCTGCAAAAACAACCATGA
CATGCATGCCACCGCCCTTTCCTTCCGGCTGCTGCGCCAGCATGGCTACCGCGTCAGCTGCGAGGTCTTTGAGAAGTTCAA
GGATGGGAAGGACGGCTTCAAGGTCCCGAACGAGGACGGCGCGGTCGCGGTGCTGGAATTTTTCGAAGCCACCCATCTG
CGGGTCCACGGCGAAGACGTGCTGGACAACGCCTTCGACTTCACGCGCAATTACCTTGAGTCCGTGTACGCCACCCTGAAT
GACCCGACCGCCAAACAGGTCCATAACGCGCTGAACGAGTTCTCGTTCCGCCGGGGCCTGCCGCGCGTGGAAGCGCGCA
AGTATATCTCCATCTATGAGCAATACGCGTCCCATCACAAGGGCCTTCTGAAGCTGGCGAAGCTGGACTTCAATCTGGTGC
AAGCCCTGCATCGCCGCGAGCTTTCCGAGGACTCGCGGTGGTGGAAAACCCTGCAAGTGCCCACGAAACTTTCGTTCGTG
CGCGATCGGCTGGTCGAGTCGTACTTCTGGGCGTCCGGCTCGTACTTCGAGCCGAACTATAGCGTCGCGCGCATGATCCTT
GCGAAGGGGCTTGCCGTCCTGAGCCTGATGGATGATGTGTATGACGCGTATGGCACGTTTGAAGAGCTGCAGATGTTCAC
CGATGCGATCGAGCGCTGGGATGCGTCCTGCCTGGACAAGCTGCCCGACTATATGAAAATCGTGTACAAAGCCCTTCTGG
ATGTCTTCGAAGAGGTCGACGAAGAACTGATCAAGCTGGGCGCGCCGTATCGCGCCTATTATGGGAAAGAGGCGATGAA
GTACGCGGCGCGGGCCTATATGGAGGAGGCCCAGTGGCGGGAGCAAAAACATAAGCCGACGACCAAAGAGTACATGAA
GCTGGCCACCAAGACGTGCGGCTATATCACGCTGATCATCCTGTCGTGCCTGGGCGTGGAAGAAGGGATCGTCACGAAG
GAAGCGTTCGATTGGGTGTTTTCCCGGCCGCCCTTTATCGAGGCGACCCTGATCATCGCCCGGCTGGTCAACGATATCACC
GGCCATGAGTTCGAGAAGAAGCGCGAACATGTGCGCACCGCCGTGGAATGCTATATGGAGGAACATAAAGTCGGCAAGC
AGGAGGTCGTGTCGGAGTTCTATAACCAGATGGAAAGCGCGTGGAAGGATATCAATGAGGGCTTTCTGCGCCCCGTGGA
ATTCCCGATCCCGCTGCTGTACCTGATCCTTAACTCCGTGCGGACCCTGGAGGTGATCTATAAGGAAGGCGACTCGTATAC
CCATGTGGGCCCCGCGATGCAAAACATCATCAAGCAGCTGTACCTTCACCCGGTGCCCTATTGA

8.1.2 Kodonoptimierte DNA-Sequenz der Valencensynthase aus *Citrus sinensis*

ATGTCCTCGGGCGAGACCTTCCGGCCCACCGCGGATTTCCATCCCTCCCTGTGGCGGAATCATTTCCTTAAAGGCGCCTCCG
ATTTCAAGACCGTGGATCACACCGCCACGCAAGAGCGGCACGAAGCGCTGAAAGAGGAGGTCCGGCGGATGATCACGGA
TGCCGAAGACAAGCCGGTCCAAAAGCTGCGCCTGATCGACGAGGTCCAGCGCCTGGGCGTGGCGTACCACTTCGAGAAG
GAAATCGGCGACGCGATCCAAAAACTGTGCCCCATCTACATCGACTCCAACCGCGCCGACCTGCATACGGTGTCCCTGCAC
TTCCGCCTGCTGCGGCAGCAGGGCATCAAGATCTCGTGCGATGTCTTCGAAAAGTTCAAAGACGACGAGGGGCGGTTCAA
ATCGTCGCTTATCAACGATGTGCAAGGGATGCTGAGCCTGTACGAAGCGGCGTATATGGCCGTCCGCGGCGAGCACATCC
TGGATGAGGCGATCGCCTTTACGACCACCCATCTTAAATCGCTGGTCGCGCAAGACCATGTGACGCCCAAGCTGGCCGAA
CAGATCAACCACGCGCTGTACCGCCCGCTGCGGAAGACCCTTCCCCGCCTGGAGGCGCGCTATTTTATGTCGATGATCAAC
AGCACGTCGGACCACCTGTGCAACAAGACCCTGCTGAATTTCGCGAAACTGGATTTTAATATCCTTCTGGAGCTGCATAAG
GAAGAGCTGAACGAGCTGACCAAATGGTGGAAGGACCTGGATTTCACCACGAAGCTGCCGTATGCCCGGGATCGCCTGG
TGGAACTTTACTTCTGGGATCTGGGCACCTACTTCGAACCGCAGTACGCCTTCGGGCGCAAAATCATGACGCAGCTGAACT
ACATCCTGTCGATCATCGACGACACGTACGATGCGTATGGCACCCTGGAAGAACTGAGCCTGTTTACCGAGGCGGTGCAG
CGCTGGAATATCGAGGCGGTGGACATGCTGCCGGAGTACATGAAGCTGATCTACCGGACCCTGCTGGATGCCTTCAATGA
AATCGAGGAGGATATGGCCAAGCAGGGGCGCTCGCACTGCGTGCGCTACGCCAAGGAAGAAAACCAGAAAGTGATCGG
CGCGTATTCGGTCCAAGCCAAGTGGTTCAGCGAGGGCTATGTCCCGACCATCGAAGAATACATGCCGATCGCGCTGACCA
GCTGCGCGTATACCTTTGTCATCACCAATTCCTTCCTGGGCATGGGCGATTTCGCGACCAAGGAGGTGTTCGAGTGGATCT
CGAACAACCCGAAGGTGGTGAAGGCCGCCTCGGTCATCTGCCGGCTTATGGACGATATGCAGGGCCACGAGTTTGAGCA
GAAGCGCGGCCACGTGGCGAGCGCGATCGAATGCTATACCAAGCAACATGGCGTGTCGAAGGAGGAAGCCATCAAGATG
TTCGAGGAGGAAGTGGCCAATGCCTGGAAGGACATCAACGAAGAACTGATGATGAAGCCGACCGTGGTGGCGCGCCCGC
TGCTGGGCACCATCCTGAACCTGGCGCGGGCGATCGACTTCATCTACAAGGAAGATGATGGCTACACCCATAGCTATCTG
ATCAAAGACCAAATCGCGTCCGTGCTGGGCGATCATGTGCCGTTCTGA

8.1.3 Kodonoptimierte DNA-Sequenz der Valencensynthase aus *Callitropsis nootkatensis*

ATGGCGGAAATGTTCAACGGCAACAGCAGCAACGATGGCAGCAGCTGCATGCCGGTGAAAGATGCGCTGCGCCGCACCG
GCAACCATCATCCGAACCTGTGGACCGATGATTTCATCCAGAGCCTGAACAGCCCGTATAGCGATAGCAGCTATCATAAAC
ATCGCGAAATCCTGATCGATGAAATCCGCGATATGTTCAGCAACGGCGAAGGCGATGAATTCGGCGTGCTGGAAAACATC
TGGTTCGTGGATGTGGTGCAGCGCCTGGGCATCGATCGCCATTTCCAGGAAGAAATCAAAACCGCGCTGGATTATATCTAT
AAATTCTGGAACCATGATAGCATCTTCGGCGATCTGAACATGGTGGCGCTGGGCTTCCGCATCCTGCGCCTGAACCGCTAT
GTGGCGAGCAGCGATGTGTTCAAAAAATTCAAAGGCGAAGAAGGCCAGTTCAGCGGCTTCGAAAGCAGCGATCAGGATG
CGAAACTGGAAATGATGCTGAACCTGTATAAAGCGAGCGAACTGGATTTCCCGGATGAAGATATCCTGAAAGAAGCGCGC
GCGTTCGCGAGCATGTATCTGAAACATGTGATCAAAGAATATGGCGATATCCAGGAAAGCAAAAACCCGCTGCTGATGGA
AATCGAATATACCTTCAAATATCCGTGGCGCTGCCGCCTGCCGCGCCTGGAAGCGTGGAACTTCATCCATATCATGCGCCA
GCAGGATTGCAACATCAGCCTGGCGAACAACCTGTATAAAATCCCGAAAATCTATATGAAAAAAATCCTGGAACTGGCGA
TCCTGGATTTCAACATCCTGCAAAGCCAGCATCAGCATGAAATGAAACTGATCAGCACCTGGTGGAAAAACAGCAGCGCG
ATCCAGCTGGATTTCTTCCGCCATCGCCATATCGAAAGCTATTTCTGGTGGGCGAGCCCGCTGTTCGAACCGGAATTCAGC
ACCTGCCGCATCAACTGCACCAAACTGAGCACCAAAATGTTCCTGCTGGATGATATCTATGATACCTATGGCACCGTGGAA
GAACTGAAACCGTTCACCACCACCCTGACCCGCTGGGATGTGAGCACCGTGGATAACCATCCGGATTATATGAAAATCGC
GTTCAACTTCAGCTATGAAATCTATAAAGAAATCGCGAGCGAAGCGGAACGCAAACATGGCCCGTTCGTGTATAAATATCT
GCAAAGCTGCTGGAAAAGCTATATCGAAGCGTATATGCAGGAAGCGGAATGGATCGCGAGCAACCATATTCCGGGCTTC
GATGAATATCTGATGAACGGCGTGAAAAGCAGCGGCATGCGCATCCTGATGATCCATGCGCTGATCCTGATGGATACCCC
GCTGAGCGATGAAATCCTGGAACAGCTGGATATCCCGAGCAGCAAAAGCCAGGCGCTGCTGAGCCTGATCACCCGCCTG
GTGGATGATGTGAAAGATTTCGAAGATGAACAGGCGCATGGCGAAATGGCGAGCAGCATCGAATGCTATATGAAAGATA
ACCATGGCAGCACCCGCGAAGATGCGCTGAACTATCTGAAAATCCGCATCGAAAGCTGCGTGCAGGAACTGAACAAAGA
ACTGCTGGAACCGAGCAACATGCATGGCAGCTTCCGCAACCTGTATCTGAACGTGGGCATGCGCGTGATCTTCTTCATGCT
GAACGATGGCGATCTGTTCACCCATAGCAACCGCAAAGAAATCCAGGATGCGATCACCAAATTCTTCGTGGAACCGATCAT
CCCGTAA

8.2 Sequenz-Vergleich der *dxs*-Genvarianten aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*

8.2.1 DNA-Sequenz-Vergleich

R. capsulatus besitzt zwei *dxs*-Gene *dxs1* (dxs1rc) und *dxs2* (dxs2rc) genauso wie auch *R. sphaeroides*, die als *dxs* (dxsrs) und *dxsA* (dxsArs) bezeichnet werden.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
dxs2rc      ----------ATGAGCCAGCCCCCAGTGACCCCGATCCTCGACCGCGTGCGTCTGCCCTCT
dxsrs       ----------ATGACCGACAGACCCTGCACGCCGACGCTCGACCGGGTGACGCTCCCGGTG
dxs1rc      ------ATGAGCGCCACGCCATCCCGCACTCCCCATCTTGACCGCGTGACCGGTCCTGCC
dxsArs      ATGACCAATCCCACCCCGCGACCCGAAACCCCGCTTTTGGATCGCGTCTGCTGCCCGGCC
                        *       *    ** **     * ** ** **       **

dxs2rc      GACATGAAGGGGCTGAGCGACCGCGACCTGCACCGCCTGGCCGATGAATTGCGCGCCGAG
dxsrs       GACATAAAGGGCCTCACGGACCGTGAGTTGCGCTCGCTGGCCGACGAGCTGCGGGCCGAA
dxs1rc      GATCTCAAGGCGATGAGCATCGCCGATCTGACGGCGCTCGCCTCCGAAGTCCGGCGCGAG
dxsArs      GACATGAAGGCGCTGAGTGACGCCGAACTGGAGCGGCTGGCCGACGAAGTGCGTTCCGAG
            **  * ****   * *    *   **  **      ** ***   **  * **   ***

dxs2rc      ACGATCTCGGCCGTATCGGTGACGGGCGGGCATCTGGGCGCCGGGCTGGGGGTGGTGGAA
dxsrs       ACGATCTCGGCCGTGTCGGTGACGGGCGGGCATCTGGGCGCAGGCCTCGGCGTGGTGGAG
dxs1rc      ATCGTCGAAGTCGTCAGCCAGACCGGGGGGCATCTTGGCTCTTCGCTGGGCGTCGTCGAG
dxsArs      GTGATTTCGGTCGTTGCCGAGACGGGAGGACATCTGGGGTCCTCGCTGGGGGTGGTTGAG
                *    * ***      *** ** ** ***** **  *    ** ** ** ** **

dxs2rc      CTGACCGTGGCGCTGCATGCGGTCTTCGACTGCCCGCGCGACAAGATCATCTGGGACGTG
dxsrs       TTGACGGTTGCGCTGCATGCGATCTTCGATGCGCCCCGCGACAAGATCATCTGGGACGTG
dxs1rc      CTGACGGTCGCGCTGCATGCGGTCTTCAATTCACCCGGCGACAAGCTGATCTGGGACGTG
```

```
dxsArs      CTGACTGTCGCGCTGCATGCGGTCTTCAACACGCCCACCGACAAGCTCGTCTGGGACGTG
             **** ** ************ ***** *    **   ******* *  ***********

dxs2rc      GGGCACCAATGCTACCCGCACAAGATCCTGACCGGGCGACGCGACCGTATCCGGACGCTG
dxsrs       GGCCACCAGTGCTACCCCCACAAGATCCTGACCGGGCGGCGCGACCGCATCCGCACCCTG
dxs1rc      GGGCACCAATGCTATCCGCACAAGATCCTGACCGGCCGCCGCTCGCGCATGCTGACCCTG
dxsArs      GGCCACCAGTGCTACCCCCACAAGATCCTCACCGGCCGGCGCGAGCAGATGCGCACCCTG
            ** ***** ***** ** ********** ***** ** ***   *  ** *  ** ***

dxs2rc      CGCACCAGGGGCGGGCTCTCGGGCTTCACCAAGCGGTCCGAAAGCCCCTATGACGCCTTC
dxsrs       CGGCAGGGCGGGGGTCTCTCGGGCTTCACCAAGCGCTCCGAGAGCCCCTATGACTGTTTC
dxs1rc      CGCCAGGCCGGGGGGATCTCGGGCTTTCCGAAACGCTCCGAGAGCCCGCATGACGCCTTT
dxsArs      CGCCAGAAGGGCGGCCTCTCGGGCTTCACCAAGCGCTCGGAATCCGCCTACGACCCGTTC
            **       ** **  **********  * ** ** ** **   * *  * ***   **

dxs2rc      GGGGCCGGGCATTCTTCGACCTCGATTTCCGCGGCGCTGGGCTTCACCATGGCGCGGGAA
dxsrs       GGCGCGGGCCATTCCTCGACCTCGATCTCGGCCGCGGTGGGCTTTGCCGCGGCACGCGAG
dxs1rc      GGCGCGGGCCATTCCTCGACCTCGATCTCGGCCGCTCTGGGCTTTGCAGTCGGTCGGGAA
dxsArs      GGCGCGGCTCATTCCTCGACCTCGATCTCGGCCGCGCTCGGCTTTGCCATGGGTCGCGAG
            ** ** *  ***** ********** ** ** **  * *****  *    *  ** **

dxs2rc      CTGGGGTCCGAATGCGGCGATGCCATCGCGGTGATCGGCGACGGCGCGATGACCGGTGGC
dxsrs       ATGGGCGGCGACACGGGCGACGCGGTGGCGGTGATCGGCGACGGCTCGATGTCGGCCGGC
dxs1rc      CTGGGCCAGCCGGTGGGTGACACCATCGCGATCATCGGCGACGGCTCGATCACCGCGGGC
dxsArs      CTGGGCCAGCCCGTGGGCGACACGATCGCCGTGATCGGCGACGGCTCCATCACCGCGGGC
             ****          ** **  *  * **  * ************ * **  * *  ***

dxs2rc      ATGGCGTTTGAGGCCCTCAATCACGGCGGCCATCTGGGCAAGCGGATGTTCGTCATCCTG
dxsrs       ATGGCCTTCGAGGCGCTGAACCACGGCGGGCACCTGAAGAACCGGGTGATCGTGATCCTG
dxs1rc      ATGGCCTATGAGGCGCTCAACCACGCCGGCCATCTGAAATCGCGGATGTTCGTGATTTTG
dxsArs      ATGGCCTACGAGGCACTGAACCACGCGGGCCATCTGAACAAGCGCCTGTTCGTGATCCTG
            ***** *  ***** ** ** ****  ** ** ***      **  ** **** **  **

dxs2rc      AACGACAATGAAATGTCGATCTCGCCCCCCGTCGGCGCGCTCTCGTCCTACCTGACGCGG
dxsrs       AACGACAACGAGATGAGCATCGCGCCGCCGGTGGGGGCGCTGTCGTCCTATCTCTCGCGG
dxs1rc      AACGACAATGACATGTCGATCGCGCCGCCGGTGGGGGCGCTGCAGCATTATCTGAACACC
dxsArs      AACGACAATGACATGAGCATCGCGCCGCCCGTGGGGGCGCTTGCGCGCTATCTCGTGAAT
            ******** ** ***   *** **** ** ** ** *****   *   ** **

dxs2rc      CTTTACGCCGAAGCACCGATGCAGGATCTCAAGGCGATGGCCAAGGGCGCCGTCAGCCTT
dxsrs       CTCTATGCGGGCGCGCCGTTCCAGGACTTCAAGGCGGCCGCCAAGGGAGCGCTCGGGCTT
dxs1rc      ATCGCCCGGCAGGCGCCCTTTGCGGCGCTCAAGGCCGCGGCCGAGGGGATCGAGATGCAT
dxsArs      CTCTCCTCGAAGGCGCCCTTCGCCACGCTGCGCGCGGCCGCCGACGGGCTCGAGGCCTCG
             *          ** **  *        *    **    *** * **

dxs2rc      TTGCCCGAACCCTTCCAGGAAGGCGCGCGGCGGGCCAAGGAAATGCTCAAGGGCATGACC
dxsrs       CTGCCCGAACCGTTCCAGGAGGGCGCGCGCCGCGCCAAGGAGATGCTGAAGAGCGTCACC
dxs1rc      CTGCCCGGCCCGGTGCGCGACGGCGCCCGACGCGCGCGGCAGATGGTGACCGCGATGCCC
dxsArs      CTGCCGGGGCCGCTCCGCGACGGGGCGCGCCGGGCGCGCCAGCTCGTGACCGGGATGCCG
             **** *  **  * *  ** ** ** ** ** **     *  *  * *      *  *

dxs2rc      ATTGGCGGCACGCTCTTCGAGGAGCTGGGCTTCGATTATGTCGGCCCGGTCGACGGGCAT
dxsrs       GTCGGCGGCACGCTCTTCGAGGAGCTGGGTTTCTCCTATGTCGGCCCGATCGACGGGCAC
dxs1rc      GGCGGCGCGACGCTGTTTGAAGAGCTCGGCTTCGACTATATCGGCCCGGTCGATGGCCAT
dxsArs      GGCGGGGGCACGCTCTTCGAGGAGCTGGGCTTCACCTATGTCGGCCCCATCGACGGCCAC
               ** *  ***** ** ** ***** ** ***   *** *******  **** ** **

dxs2rc      GACCTTGAGACGCTCTTGCATCTCTTCCGCACGCTGAAGACGCGGGCGACGGGGCCGGTG
dxsrs       GATCTCGACCAGCTTCTGCCGGTGCTGCGGACCGTCAAGCAGCGGGCGCATGCGCCGGTG
dxs1rc      GACATGGCCGAACTGGTCGAAACCCTGCGCGTCACCCGCGCCCGCGCTTCGGGGCCGGTG
dxsArs      GACATGGAGGCGCTCCTCCAGACGCTGCGCGCGGCGCGGGCCCGGACCACGGGGCCGGTG
            **  * *     **  *        * **            **  *    * *******
```

```
dxs2rc      CTGATCCATGCGCTGACGAAAAAGGGCAAGGGCTATGCCCCCGCCGAGAACCGCCCGGAT
dxsrs       CTGATCCATGTCATCACCAAGAAGGGCAGGGGCTATGCTCCGGCCGAGGCCGCGCGCGAC
dxs1rc      CTGATCCATGTCTGCACCACCAAGGGCAAGGGCTATGCCCCCGCCGAGGGCGCCGAGGAC
dxsArs      CTCATCCATGTGGTCACGAAGAAGGGCAAGGGTTACGCCCCCGCCGAGAATGCCCCCGAC
            ** *******     ** *  ******* *** ** ** ** ******         **

dxs2rc      CGCGGCCATGCCACGGCGCGGTTCGACGTGCTGACCGGCGCGCAGGTCAAGGCCGCCTCG
dxsrs       CGTGGCCATGCCACGAACAAGTTCAACGTCCTGACCGGCGCGCAGGTGAAGCCGGTCTCG
dxs1rc      AAGCTGCATGGCGTGTCGAAATTCGACATCGAGACCGGCAAGCAGAAGAAATCGATCCCG
dxsArs      AAGTATCACGGGGTGAACAAGTTCGACCCCGTCACGGGCGAGCAGAAGAAGTCGGTGGCC
                  ** *    *      *** **      ** ***  ****   **  *     *

dxs2rc      AACGCGCCCAGCTACACCAAGGTCTTTGCCGAAAGCCTGATCGATCAGGCCTCGCGCGAT
dxsrs       AACGCCCCCTCCTATACCAAGGTCTTCGCCCAGAGCCTCATCAAGGAGGCCGAGGTCGAC
dxs1rc      AATGCCCCGAACTACACCGCCGTCTTCGGCGAGCGTCTGACCGAGGAAGCCGCCCGCGAT
dxsArs      AACGCGCCGAACTACACCAAGGTCTTCGGCTCCACCCTGACCGAGGAGGCCGCGCGCGAT
            ** ** **   *** ***   ***** * *      ** * * *  * ***     ***

dxs2rc      GAAAAGATCGTCGCGGTGACGGCGGCGATGCCCGAAGGCACCGGGCTGAACCTTTTCGCC
dxsrs       GAGCGGATCTGCGCGGTGACGGCCGCCATGCCGGACGGGACGGGGCTCAACCTCTTCGGC
dxs1rc      CAGGCGATCGTGGCGGTCACCGCGGCGATGCCCACCGGCACCGGTCTTGACATCATGCAA
dxsArs      CCGCGCATCGTGGCGATCACCGCCGCTATGCCCTCGGGCACCGGCGTCGACATCATGCAG
                  ***   *** * ** ** ** *****    ** ** **  *  ** *  *

dxs2rc      GAGCGCTTTCCGCGCCGCTGCTTCGATGTCGGCATCGCGGAACAGCATGGCGTGACCTTT
dxsrs       GAGCGGTTTCCGAAGCGCACCTTCGATGTGGGCATCGCGGAACAGCATGCGGTGACCTTC
dxs1rc      AAACGCTTTCCGCGCCGGGTGTTTGACGTCGGCATCGCGGAACAGCATGCGGTGACCTTT
dxsArs      AAGCGTTTCCCGAACCGCGTCTTCGACGTGGGCATCGCCGAGCAGCATGCCGTGACCTTC
             * ** ** ***   **    ** ** ** ******** ** *******  ********

dxs2rc      TCGGCCGGGCTCGCGGCGGGGGGGATGAAACCCTTCTGCGCGATCTACTCGACCTTCCTG
dxsrs       TCGGCGGCGCTTGCGGCAGGCGGCATGCGGCCCTTCTGCGCCATCTATTCCACCTTCCTC
dxs1rc      GCCGCGGGCATGGCGGCCGCCGGGCTGAAACCCTTCCTCGCGCTTTATTCCAGCTTCGTG
dxsArs      GCGGCCGGCCTCGCCGGGGCCGGGATGAAGCCCTTCTGCGCGATCTATTCCTCGTTCCTG
             * ** *   * ** *  *  **  **   ******  ***  * ** **    *** *

dxs2rc      CAGCGCGGCTATGACCAGATTGTGCATGATGTGGCGATCCAGCGCCTGCCGGTGCGCTTT
dxsrs       CAGCGCGGCTACGACCAGATCGTGCATGACGTGGCGATCCAGCGCCTGCCGGTGCGCTTT
dxs1rc      CAGCGCGGCTATGACCAGCTCGTGCATGATGTCGCGCTGCAGAACCTGCCGGTGCGGCTG
dxsArs      CAACGGGGTTACGACCAGATCGCCCATGACGTGGCGCTGCAGAACCTTCCCGTCCGCTTC
            ** ** ** ** ****** * *  ***** ** *** * ***  *** ** ** **  *

dxs2rc      GCCATCGACCGCGCCGGTCTGGTGGGGGCCGACGGCGCCACCCACGCGGGGGCGTTTGAC
dxsrs       GCCATCGACCGCGCCGGCCTCGTGGGGGCGGACGGCGCCACCCATGCGGGCTCGTTCGAT
dxs1rc      ATGATCGACCGCGCCGGGCTGGTGGGGCAGGACGGGGCGACCCATGCCGGGGCGTTCGAC
dxsArs      GTGATCGACCGGGCGGGGCTCGTGGGGGCCGATGGCGCGACCCATGCGGGGGCCTTCGAC
               ******** ** ** ** ******   ** ** ** ***** ** **  * ** **

dxs2rc      ATCGGCTTCATGGCGAACCTGCCCGGCATGGTAGTGATGGCCGCCGCCGACGAGGCGGAT
dxsrs       GTGGCCTTCCTGTCGAACCTGCCCGGCATCGTGGTGATGGCCGCCGCCGACGAGGCCGAG
dxs1rc      GTTTCCATGCTGGCGAACCTGCCGAACTTCACCGTGATGGCGGCCGCCGACGAGGCGGAG
dxsArs      GTTGGCTTCATCACTTCGCTGCCCAACATGACCGTGATGGCCGCGGCCGACGAGGCCGAG
             *   * *  *  *    *****   * *    ******** ** ********** **

dxs2rc      CTGGTGCACATGGTCGCCACCGCTGCGGCGCATGACGAGGGCCCGATCGCCTTCCGCTAT
dxsrs       CTCGTCCATATGGTAGCCACCGCCGCCGCCCATGACGAAGGGCCCATCGCCTTCCGCTAT
dxs1rc      CTTTGCCACATGGTGGTGACGGCCGCGGCGCATGACAGCGGGCCGATTGCCTTGCGCTAT
dxsArs      CTCATCCACATGATCGCCACCGCCGTGGCCTTCGACGAGGGCCCCATCGCCTTCCGCTTC
            **    ** *** * *  ** ** *  **    ***   ** ** ** ***** ****

dxs2rc      CCCCGCGGCGAGGGGATGGGGGTGGATATGCCCACCCAAGGCGTGCCGCTTGAAATCGGC
dxsrs       CCGCGCGGCGACGGCGTGGGGGTCGAGATGCCGGTGAAGGGCGTGCCGCTCCAGATCGGC
dxs1rc      CCGCGCGGCGAGGGGCGGGGCGTCGAGATGCCCGAGCGCGGCGAAGTGCTGGAAATCGGC
```

```
dxsArs      CCGCGGGGCGAGGGGGTGGGCGTCGAGATGCCCGAGCGCGGGACGGTGCTGGAGCCCGGC
            ** ** ***** **   *** ** ** *****       **      ***  *   ****

dxs2rc      AAGGGCCGGATCATTTCCGAAGGCGCGCGGGTCGCGATCCTCTCCTTCGGCACGCGTCTG
dxsrs       CGTGGCCGGGTGGTGAGCGAGGGCACGCGAATCGCGCTCCTGTCCTTCGGCACCCGTCTG
dxs1rc      AAGGGCCGGGTCATGACCGAAGGCACCGAGGTCGCGATCCTGTCCTTTGGCGCGCATCTG
dxsArs      CGGGGCCGCGTGGTGCGCGAAGGGACGGATGTCGCGATCCTCTCCTTCGGCGCGCATCTG
               *****  *  *   *** **  *     ***** **** ***** *** * * ****

dxs2rc      GCCGAGGTGCTGAAGGCGCGCGAGGCGCTCGCCGCCCGCGGCCTGGCGCCGACCGTGGCC
dxsrs       GCCGAGGTGCAGGTGGCCGCCGAGGCGCTGGCTGCGCGCGGGATCTCTCCCACGGTTGCG
dxs1rc      GCGCAGGCGCTGAAGGCGGCCGAGATGCTGGAGGCCGAGGGGGTTTCGACCACCGTCGCC
dxsArs      CACGAGGCCTTGCAGGCGGCGAAACTTCTCGAGGCCGAGGGGGTGAGCGTGACCGTGGCC
                ***    *  ***     *    ** *  **    **  *       ** ** **

dxs2rc      GATGCCCGTTTCGCGAAACCGCTCGACAAAGATCTGATCCTGCGGCTTGTGGCCGAACAC
dxsrs       GATGCGCGCTTTGCAAAGCCGCTCGACCGGGATCTGATCCTGCAGCTCGCGGCCCATCAC
dxs1rc      GATGCCCGCTTCTGCCGTCCGCTCGACACCGATCTGATCGACCGGCTGATCGAGGGGCAC
dxsArs      GACGCCCGCTTCTCGCGCCCGCTCGACACGGGGCTCATCGACCAGCTCGTGCGCCATCAC
            ** ** ** **       *********   *  ** ***   * ***          ***

dxs2rc      GAGGCGCTCATTTGCATCGAGGAAGGCGCCGTGGGCGGTTTCGGCAGCCATGTGGCGCAA
dxsrs       GAGGCGCTCATTACCATCGAGGAGGGCGCCATCGGCGGCTTCGGCAGCCATGTGGCGCAG
dxs1rc      GCGGCGCTGATCACGCTGGAACAGGGCGCGATGGGCGGTTTCGGCGCGATGGTGCTGCAT
dxsArs      GCGGCGCTGGTAACGGTGGAGCAGGGGGCCATGGGCGGCTTCGGCGCCCATGTCATGCAC
            * ******  *     * **  * ** **  * ***** ******      **   ***

dxs2rc      TTCCTGTCGGAGCAGGGGGTGTTCGACCGCGGCTACAAGTTCCGCTCGATGGTGCTGCCC
dxsrs       CTTCTGGCCGAGGCCGGGGTCTTCGACCGCGGCTTCCGGTATCGCTCGATGGTGCTGCCC
dxs1rc      TATCTGGCCCGCACCGGCCAGCTGGAAAAGGGCCGCGCCATCCGCACGATGACGCTGCCC
dxsArs      TATCTCGCCAATTCCGGCGGCTTCGACGGGGGCCTCGCGCTCCGGGTCATGACGCTGCCC
               **  *       **     * **    ***  *      **    ***  *******

dxs2rc      GACACCTTCATCGACCATGCCAATCCCGAGGACATGTATGCGGTCGCGCGGATGAACGCG
dxsrs       GACACGTTCATCGACCACAACAGCGCCGAAGTGATGTATGCCACCGCCGGGCTGAATGCG
dxs1rc      GATTGCTACATCGACCACGGCTCGCCCGAGGAAATGTATGCCTGGGCCGGGCTGACGGCG
dxsArs      GACCGCTTCATCGAGCAGGCGAGCCCCGAGGACATGTATGCCGATGCGGGGCTGCGGGCC
            **    * ****** **        **** *  ********    **  ** **   **

dxs2rc      GCGGATATCGAAGCGAAAGTGCTCGATCTGCTCGGCGTCGCGGTGGCGAAACGCGCCTGA
dxsrs       GCCGACATAGAGCGGAAGGCGCTGGAGACGCTGGGGGTGGAGGTCCTCGCCCGCCGCGCC
dxs1rc      AATGACATCCGCGACACCGCGCTGGCGGCGGCCCGGCCGTCGAAATCGGTGCGGATCGTG
dxsArs      GAGGATATCGCGGCCACCGCGCGGGGCGCGCTCGCCCGGGGGCGCGTGATGCCGCTCCGG
               ** **       *  * **  *    *          *         *    *

dxs2rc      ---------------------------
dxsrs       TGA------------------------
dxs1rc      CACAGCGCGTAA---------------
dxsArs      CAGACGGCAAAGCCGCGGGCGGTCTGA
```

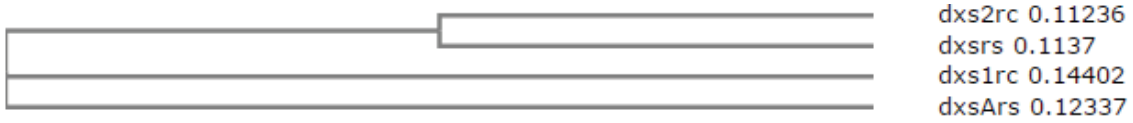

Abb. 25. Verwandtschaftsgrad der DNA-Sequenzen zwischen den *dxs*-Genen in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*.
Mit Hilfe des *Multiple Sequence Alignment Tools* von Clustal Omega konnte herausgefunden werden, welche Gene sich am ähnlichsten sind.

8.2.2 Proteinsequenz-Vergleich

```
CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment
dxsrs       ---MTDRPCTPTLDRVTLPVDIKGLTDRELRSLADELRAETISAVSVTGGHLGAGLGVVE
dxs2rc      ---MSQPPVTPILDRVRLPSDMKGLSDRDLHRLADELRAETISAVSVTGGHLGAGLGVVE
dxsArs      MTNPTPRPETPLLDRVCCPADMKALSDAELERLADEVRSEVISVVAETGGHLGSSLGVVE
dxs1rc      --MSATPSRTPHLDRVTGPADLKAMSIADLTALASEVRREIVEVVSQTGGHLGSSLGVVE
                :    ** ****  * *:*.::  :*  **.*:* * :..*: ******:.*****

dxsrs       LTVALHAIFDAPRDKIIWDVGHQCYPHKILTGRRDRIRTLRQGGGLSGFTKRSESPYDCF
dxs2rc      LTVALHAVFDCPRDKIIWDVGHQCYPHKILTGRRDRIRTLRTRGGLSGFTKRSESPYDAF
dxsArs      LTVALHAVFNTPTDKLVWDVGHQCYPHKILTGRREQMRTLRQKGGLSGFTKRSESAYDPF
dxs1rc      LTVALHAVFNSPGDKLIWDVGHQCYPHKILTGRRSRMLTLRQAGGISGFPKRSESPHDAF
            *******:*: * **::******************.:: ***  **:*** ***** :* *

dxsrs       GAGHSSTSISAAVGFAAAREMGGDTGDAVAVIGDGSMSAGMAFEALNHGGHLKNRVIVIL
dxs2rc      GAGHSSTSISAALGFTMARELGSECGDAIAVIGDGAMTGGMAFEALNHGGHLGKRMFVIL
dxsArs      GAAHSSTSISAALGFAMGRELGQPVGDTIAVIGDGSITAGMAYEALNHAGHLNKRLFVIL
dxs1rc      GAGHSSTSISAALGFAVGRELGQPVGDTIAIIGDGSITAGMAYEALNHAGHLKSRMFVIL
            **.*********:**: .**:*   **::*:****:::.***:*****.*** .*::***

dxsrs       NDNEMSIAPPVGALSSYLSRLYAGAPFQDFKAAAKGALGLLPEPFQEGARRAKEMLKSVT
dxs2rc      NDNEMSISPPVGALSSYLTRLYAEAPMQDLKAMAKGAVSLLPEPFQEGARRAKEMLKGMT
dxsArs      NDNDMSIAPPVGALARYLVNLSSKAPFATLRAAADGLEASLPGPLRDGARRARQLVTGMP
dxs1rc      NDNDMSIAPPVGALQHYLNTIARQAPFAALKAAAEGIEMHLPGPVRDGARRARQMVTAMP
            ***:***:******  **  :   **:  ::* *.*    ** *.::*****::::..:

dxsrs       VGGTLFEELGFSYVGPIDGHDLDQLLPVLRTVKQRAHAPVLIHVITKKGRGYAPAEAARD
dxs2rc      IGGTLFEELGFDYVGPVDGHDLETLLHLFRTLKTRATGPVLIHALTKKGKGYAPAENRPD
dxsArs      GGGTLFEELGFTYVGPIDGHDMEALLQTLRAARARTTGPVLIHVVTKKGKGYAPAENAPD
dxs1rc      GGATLFEELGFDYIGPVDGHDMAELVETLRVTRARASGPVLIHVCTTKGKGYAPAEGAED
             *.******** *:**:****:  *:  :*. : *: .*****. *.**:******   *

dxsrs       RGHATNKFNVLTGAQVKPVSNAPSYTKVFAQSLIKEAEVDERICAVTAAMPDGTGLNLFG
dxs2rc      RGHATARFDVLTGAQVKAASNAPSYTKVFAESLIDQASRDEKIVAVTAAMPEGTGLNLFA
dxsArs      KYHGVNKFDPVTGEQKKSVANAPNYTKVFGSTLTEEAARDPRIVAITAAMPSGTGVDIMQ
dxs1rc      KLHGVSKFDIETGKQKKSIPNAPNYTAVFGERLTEEAARDQAIVAVTAAMPTGTGLDIMQ
            : *.. :*:  ** * *   ***.** **.. * .:*  *  * *:***** ***::::

dxsrs       ERFPKRTFDVGIAEQHAVTFSAALAAGGMRPFCAIYSTFLQRGYDQIVHDVAIQRLPVRF
dxs2rc      ERFPRRCFDVGIAEQHGVTFSAGLAAGGMKPFCAIYSTFLQRGYDQIVHDVAIQRLPVRF
dxsArs      KRFPNRVFDVGIAEQHAVTFAAGLAGAGMKPFCAIYSSFLQRGYDQIAHDVALQNLPVRF
dxs1rc      KRFPRRVFDVGIAEQHAVTFAAGMAAAGLKPFLALYSSFVQRGYDQLVHDVALQNLPVRL
            :***.* *********.***:*.:*..*::** *:**:*:******:.****:*.****:

dxsrs       AIDRAGLVGADGATHAGSFDVAFLSNLPGIVVMAAADEAELVHMVATAAAHDEGPIAFRY
dxs2rc      AIDRAGLVGADGATHAGAFDIGFMANLPGMVVMAAADEADLVHMVATAAAHDEGPIAFRY
dxsArs      VIDRAGLVGADGATHAGAFDVGFITSLPNMTVMAAADEAELIHMIATAVAFDEGPIAFRF
dxs1rc      MIDRAGLVGQDGATHAGAFDVSMLANLPNFTVMAAADEAELCHMVVTAAAHDSGPIALRY
             ******** *******:**:.:::.** :.********:* **:.**.*.*.****:*:

dxsrs       PRGDGVGVEMPVKGVPLQIGRGRVVSEGTRIALLSFGTRLAEVQVAAEALAARGISPTVA
dxs2rc      PRGEGMGVDMPTQGVPLEIGKGRIISEGARVAILSFGTRLAEVLKAREALAARGLAPTVA
dxsArs      PRGEGVGVEMPERGTVLEPGRGRVVREGTDVAILSFGAHLHEALQAAKLLEAEGVSVTVA
dxs1rc      PRGEGRGVEMPERGEVLEIGKGRVMTEGTEVAILSFGAHLAQALKAAEMLEAEGVSTTVA
            ***:* **:** :*  *: *:**:: **: :*:****::* :.  * : * *.*:: ***

dxsrs       DARFAKPLDRDLILQLAAHHEALITIEEGAIGGFGSHVAQLLAEAGVFDRGFRYRSMVLP
dxs2rc      DARFAKPLDKDLILRLVAEHEALICIEEGAVGGFGSHVAQFLSEQGVFDRGYKFRSMVLP
dxsArs      DARFSRPLDTGLIDQLVRHHAALVTVEQGAMGGFGAHVMHYLANSGGFDGGLALRVMTLP
dxs1rc      DARFCRPLDTDLIDRLIEGHAALITLEQGAMGGFGAMVLHYLARTGQLEKGRAIRTMTLP
            ****.:***  ** :*   * **: :*:**:****: * : *:. * :: *   * *.**
```

```
dxsrs       DTFIDHNSAEVMYATAGLNAADIERKALETLGVEVLARRA--------
dxs2rc      DTFIDHANPEDMYAVARMNAADIEAKVLDLLGVAVAKRA---------
dxsArs      DRFIEQASPEDMYADAGLRAEDIAATARGALARGRVMPLRQTAKPRAV
dxs1rc      DCYIDHGSPEEMYAWAGLTANDIRDTALAAARPSKSVRIVHSA-----
            * :*:: . * *** * : * **  ..
```

Abb. 26. Verwandtschaftsgrad der Protein-Sequenzen zwischen der DxS-Proteine aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*.
Mit Hilfe des *Multiple Sequence Alignment Tools* von Clustal Omega konnte identifiziert werden, welche Proteine sich am ähnlichsten sind.

8.3 Sequenz-Vergleich der *idi*-Genvarianten aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*

R. capsulatus besitzt zwei Kopien des *idi* Gens *idi1* und *idi2* und *R. sphaeroides* besitzt nur ein Gen für *idi* (idi). Um herauszufinden, ob die Gen-Sequenzen und Protein-Sequenzen aus *R. sphaeroides* zu denen aus *R. capsulatus* ähnlich sind, wurde dieses mit Hilfe des *Multiple Sequence Alignment Tools* von Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) untersucht.

8.3.1 DNA-Sequenz-Vergleich

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
idi2        ATGGACCTGACCATGGCCGAGGAGATGATCCCCGCCTGGGTCGAGGGCGTGCTGCAACCC
idi         ---------------ATGACGGAAATGGTTCCCGCCTGGGTCGAGGGCCGGCTGATGCCG
idi1        ---------------ATGAGTGAGCTTATACCCGCCTGGGTTGGTGACAGACTGGCTCCG
                           **  *  * *********** *  * *   ***   **

idi2        GTCGAGAAGCTGGAGGCCCACCGCAAGGGCCTGCGGCATCTGGCGATTTCGGTCTTCGTG
idi         GTCGAGAAGCTGGAGGCGCACCAGCGCGGCCTGCGTCACATGGCGATCTCGGTCTTTGTC
idi1        GTGGACAAGTTGGAGGTGCATTTGAAAGGGCTCCGCCACAAGGCGGTGTCTGTTTTCGTC
            ** ** *** ******  **       ** ** ** **   **** * ** ** ** **

idi2        ACGCGCGGCAACAAGGTGCTTTTGCAGCAACGCGCGCTGTCGAAATATCACACGCCGGGG
idi         ATGGCCGGCGAGGCGGTGCTGATCCAGCGCCGCGCGGCCGGCAAGTATCACACGCCCGGC
idi1        ATGGATGGCGAAAACGTGCTGATCCAGCGCCGCTCGGAGGAGAAATATCACTCTCCCGGG
            * *   *** *    *****  * ****  *** **      ** ****** * ** **

idi2        CTTTGGGCGAATACCTGCTGCACCCATCCCTATTGGGGCGAGGATGCGCCGACCTGCGCC
idi         CTCTGGGCGAATACCTGCTGCACCCATCCCCGCTGGGGCGAGGAGGCGGCCGACTGCGCC
idi1        CTTTGGGCGAACACCTGCTGCACCCATCCGGGCTGGACCGAACGCCCCGAGGAATGCGCG
            ** ******** *****************    ***  ***     *       *****

idi2        GCCCGCCGTCTGGGGCAGGAGCTGGGCATCGTCGGGCTGAAGCTGCGCCACATGGGGCAG
idi         GTCCGGCGCCTGCGCGAGGAACTGGGGATCACCGGGCTCGTCACCGTCTTCGCCGACCGC
idi1        GTGCGGCGGCTGCGCGAGGAGCTGGGGATCACCGGGCTTTATCCCGCCCATGCCGACCGG
            *  ** ** *** *  **** ***** ***  ******         *      *  *

idi2        CTGGAATACCGCGCCGATGTGAACAACGGCATGATCGAGCATGAGGTGGTGGAGGTCTTC
idi         GTGGAATATCGCGCCGACGTGGGCAACGGGCTGACCGAGCATGAGGTGGTCGACATCTTC
idi1        CTGGAATATCGCGCCGATGTCGGCGGCGGCATGATCGAGCATGAGGTGGTCGACATCTAT
             ******* ******** **   *  ***  *** *************** **  ***
```

```
idi2      ACCGCCGAAGCGCCCGAGGGGATCGAGCCGCAACCCGACCCCGAGGAAGTGGCCGATACC
idi       GTGGCCGAGGCGCCCTCGGACCTGCCGGTGAACCCGGACCCGGAAGAGGTGTGGGAGACC
idi1      CTGGCCTATGCCAAACCGCATATGCGGATCACCCCCGATCCGCGCGAAGTGGCCGAGGTG
             *** * **      *    *   *      ** ** **    ** ***   **

idi2      GAATGGGTGCGCATCGACGCGCTGCGCTCGGAGATCCACGCCAATCCGGAACGCTTCACG
idi       CGCTGGGTCGACCTCACCGATCTCGCGCGCGAGGTGAAGGAGCATCCCGAGCGCTTCACA
idi1      CGCTGGATCGGCCTTTACGATCTGGCGGCCGAGGCCGGTCGGCATCCCGAGCGGTTCTCG
             *** *   * *   **  **       ***          **** ** ** *** *

idi2      CCCTGGCTCAAGATCTATATCGAGCAGCACCGCGACATGATCTTTCCGCCGGTGACGGCC
idi       CCCTGGCTCCGGATCTATCTGGCCGAGCATATGGAGCGGATCTTCGGCAAGCTGCGCGTC
idi1      AAATGGCTCAACATCTATCTGTCGAGCCATCTTGACCGGATTTTCGGATCGATCCTGCGC
             ******   ****** *       **    **   *** **      * *      *

idi2      TGA------
idi       GTGCAGTAA
idi1      GGCTGA---
```

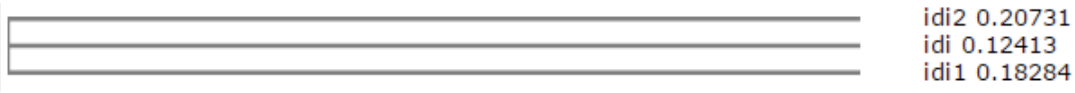

Abb. 27. Gen-Sequenzvergleich zwischen den *idi*-Genvarianten aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*.
Mit Hilfe des *Multiple Sequence Alignment Tools* von Clustal Omega konnte identifiziert werden, in wie weit sich die Gene ähneln.

8.3.2 Protein-Sequenzvergleich

```
CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment
idi2      MDLTMAEEMIPAWVEGVLQPVEKLEAHRKGLRHLAISVFVTRGNKVLLQQRALSKYHTPG
idi1      -----MSELIPAWVGDRLAPVDKLEVHLKGLRHKAVSVFVMDGENVLIQRRSEEKYHSPG
idi       -----MTEMVPAWVEGRLMPVEKLEAHQRGLRHMAISVFVMAGEAVLIQRRAAGKYHTPG
                 *::****   * **:***.* :**** *:****  *: **:*:*:  ***:**

idi2      LWANTCCTHPYWGEDAPTCAARRLGQELGIVGLKLRHMGQLEYRADVNNGMIEHEVVEVF
idi1      LWANTCCTHPGWTERPEECAVRRLREELGITGLYPAHADRLEYRADVGGGMIEHEVVDIY
idi       LWANTCCTHPRWGEEAADCAVRRLREELGITGLVTVFADRVEYRADVGNGLTEHEVVDIF
          ********** * *    **.*** :****.**   .  ::******  *: *****:::

idi2      TAEAPEGIEPQPDPEEVADTEWVRIDALRSEIHANPERFTPWLKIYIEQHRDMIFPPVTA
idi1      LAYAKPHMRITPDPREVAEVRWIGLYDLAAEAGRHPERFSKWLNIYLSSHLDRIFGSILR
idi       VAEAPSDLPVNPDPEEVWETRWVDLTDLAREVKEHPERFTPWLRIYLAEHMERIFGKLRV
           * *   :   ***.** :..*: :  *  *   .****: **.**: .* : **  :

idi2      --
idi1      G-
idi       VQ
```

Abb. 28. Protein-Sequenzvergleich der Idi-Proteine aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides*.
Mit Hilfe des *Multiple Sequence Alignment Tools* von Clustal Omega konnte identifiziert werden, welche Proteine sich am ähnlichsten sind.

8.4 Optische Dichte bei 660 nm einzelner Expressionskulturen

8.4.1 Zelldichten zur Untersuchung der natürlichen Carotinoidproduktion in *R. capsulatus* in Abhängigkeit von Sauerstoff

Tab. 17. Zelldichten zum Ende der Kultivierung der Expressionskulturen zur Untersuchung der Sauerstoffabhängigen Carotinoidproduktion in *R. capsulatus* (3.1.1, Abb. 12).
Es sind die Zelldichten der SB1003 Kulturen zu den einzelnen Kultivierungsbedingungen in Dreifachbestimmung aufgelistet. Die Kultivierung wurden unter anaeroben ($-O_2$) und unter (mikro-)aeroben Bedingungen durchgeführt, wobei der Sauerstoffgehalt mit zunehmendem Füllvolumen (10 - 80 ml) sinkt.

Kultivierungsbedingung	$OD_{660\ nm}$ der Dreifachbestimmung		
$-O_2$	2,17	2,30	2,23
10 ml	1,89	1,94	1,88
20 ml	2,1	2,03	2,03
30 ml	2,27	2,22	2,12
40 ml	2,29	2,30	2,31
50 ml	2,23	2,23	2,20
60 ml	2,14	2,16	2,1
70 ml	1,92	1,93	1,91
80 ml	1,78	1,76	1,77

8.4.2 Zelldichten zur Untersuchung der Sauerstoffabhängigkeit des *nif*-Systems

Tab. 18. Zelldichten zum Ende der Kultivierung der Expressionskulturen zur Untersuchung der Sauerstoffabhängigkeit des *nif*-Systems (3.1.2, Abb. 13).
Es sind für die Expressionsvektoren pRhokHi-2-eyfp und pRhon5Hi-2-eyfp die Zelldichten zu den einzelnen Kultivierungsbedingungen in Dreifachbestimmung aufgelistet. Die Kultivierung wurden unter anaeroben ($-O_2$) und unter (mikro-)aeroben Bedingungen, wobei der Sauerstoffgehalt mit zunehmendem Füllvolumen (20 - 70 ml) sinkt, durchgeführt.

Expressionsvektor	Kultivierungsbedingung	$OD_{660\ nm}$ der Dreifachbestimmung		
pRhokHi-2-*eyfp*	$-O_2$	2,08	2,27	2,35
	20 ml	1,49	1,48	1,53
	30 ml	1,51	1,55	1,40
	40 ml	1,58	1,49	1,51
	50 ml	1,85	1,87	1,67
	60 ml	1,76	1,99	1,96
	70 ml	1,52	1,33	1,42
pRhon5Hi-2-*eyfp*	$-O_2$	2,23	2,13	2,12
	20 ml	1,30	1,47	1,48
	30 ml	1,40	1,49	1,41
	40 ml	1,56	1,52	1,63
	50 ml	1,72	2,00	1,66
	60 ml	1,82	2,09	1,99
	70 ml	1,46	1,63	1,47

8.4.3 Zelldichten zum Versuch die Patchoulolsynthase mit verschiedenen Expressionsvektoren in unterschiedlichen Medien zu exprimieren

Tab. 19. End-$OD_{660\ nm}$-Bestimmung der Expressionskulturen, in denen die Patchoulolsynthase mit verschiedenen Expressionsvektoren in unterschiedlichen Medien exprimiert wurden (3.2.1, Abb. 14).
Es wurden die Expressionsvektoren pRhokHi-2-PatS (k), pRhon5Hi-2-PatS und pRhotHi-2-PatS (t) zur Produktion von Patchoulol in dem Serin-haltigen Minimalmedium RCV und in den Vollmedien RCV 2/3 Py und VN verwendet. In der Tab. sind die Zelldichten nach Beendigung der Kultivierung (5 Tage) aufgelistet.

Medium	Expressionsvektor	$OD_{660\ nm}$ der Dreifachbestimmung		
RCV	pRhokHi-2-*PatS* (k)	2,09	2,27	2,00
	pRhon5Hi-2-*PatS* (n)	2,29	2,28	2,32
	pRhotHi-2-*PatS* (t)	1,57	1,76	1,62
RCV 2/3 PY	pRhokHi-2-*PatS* (k)	4,64	4,99	4,93
	pRhon5Hi-2-*PatS* (n)	4,28	3,98	4,63
	pRhotHi-2-*PatS* (t)	5,54	5,52	5,49
VN	pRhokHi-2-*PatS* (k)	5,90	6,26	5,52
	pRhon5Hi-2-*PatS* (n)	6,04	6,24	6,44
	pRhotHi-2-*PatS* (t)	6,52	6,35	6,48

8.5 Übersicht über die mit *metabolic engineering* erreichten Terpenoidausbeuten in den *R. capsulatus* Stämmen SB1003 und SB1003+MVA

Tab. 20. Übersicht über die mit *metabolic engineering* erreichten Terpenoidausbeuten in den *R. capsulatus* Stämmen SB1003 und SB1003+MVA
Die Terpenausbeuten an Patchoulol (Expression von PatS) bzw. Valencen (Expression von ValS bzw. CnVS), die in den *R. capsulatus* Stämmen SB1003 und SB1003+MVA (-) im Vergleich zur zusätzlichen plasmidbasierten Coexpression der modifizierten Module FPP (*ispA*) und DXP (*dxs+idi*) und des MVA-Operons erreicht wurden, sind dargestellt.

Stamm	Plasmidbasierte Coexpression	Terpenoidausbeute [mg/l]		
		Patchoulol	Valencen	
		PatS	ValS	CnVS
SB1003	-	0,53	1,3	20,9
	+*ispA*	± 3,5	1,6	78,3
	+*MVA*	13,0	1,5	186,7
	+*ispA-dxs-idi*	13,3	6,4	47,8
	+*ispA-dxs-idi-MVA*	n.d.	n.d.	13,5
SB1003+MVA	-	Nicht getestet	2,1	46,7
	+*ispA*	27,7	15,5	**324,4**
	+*MVA*	20,4	8,1	217,9
	+*ispA-dxs-idi*	**56,0**	**46,2**	261,7
	+*ispA-dxs-idi-MVA*	n.d.	n.d.	32,9

8.6 Optimierung der heterologen Terpenoidproduktion in *R. capsulatus*

8.6.1 Patchoulolproduktion in dem EPS-defizienten *R. capsulatus* Stamm 37b4

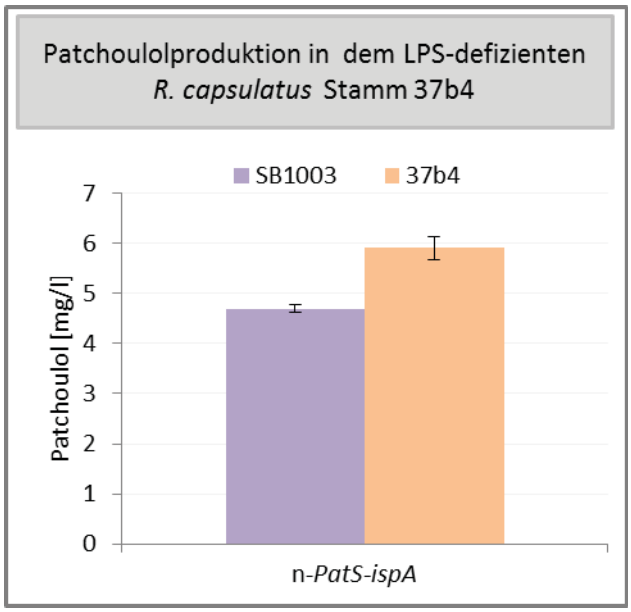

Abb. 29. Patchoulolproduktion in dem EPS-defizienten *R. capsulatus* Stamm 37b4.
Es ist die Patchoulolproduktion in den Stämmen SB1003 und 37b4, die jeweils mit dem Vektor pRhon5Hi-2-*PatS-ispA* transformiert wurden, gezeigt. Die Bestimmung der Patchoulolausbeute erfolgte mittels GC von n-Dodecan-Extrakten. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und ihre zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

8.6.2 Terpenoidsynthese in der *knockout* Mutante *R. capsulatus* SB1003 Δ*crtJ*

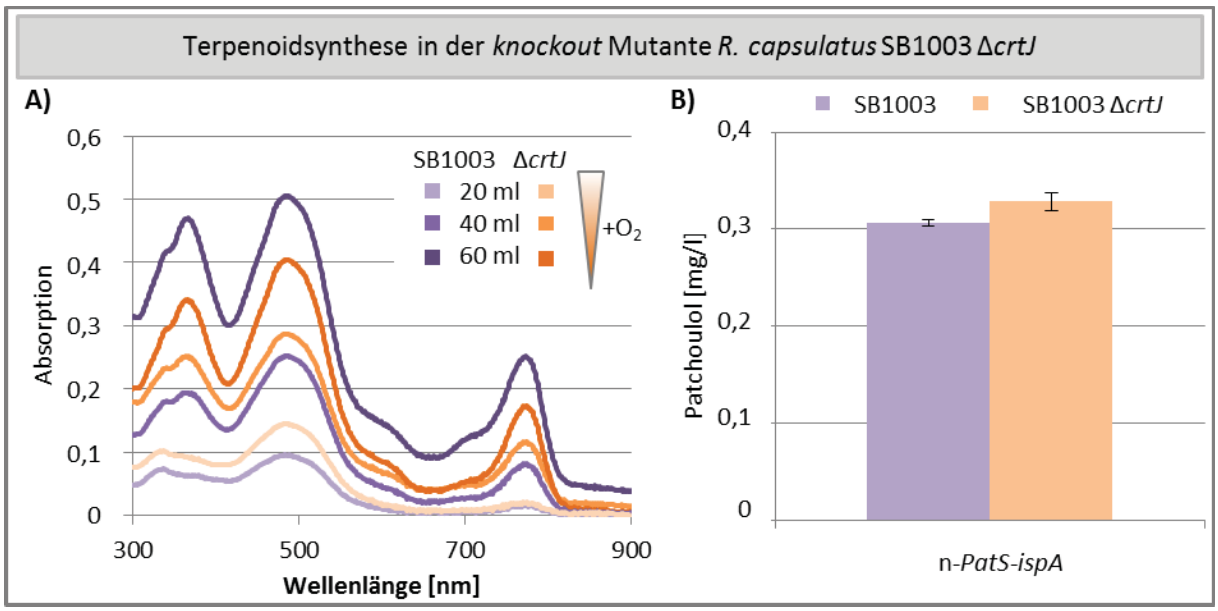

Abb. 30. Terpenoidsynthese in der *knockout* Mutante *R. capsulatus* SB1003 Δ*crtJ*.
A zeigt beispielhafte Absorptionsspektren von 300 -900 nm von Ethanolextrakten aus Zellproben (normiert zu $OD_{660\,nm} = 1$) von Kulturen der Stämme SB1003 und SB1003 Δ*crtJ*, die in Erlenmeyer-Kolben mit unterschiedlichen Volumina an RCV-Medium unter aeroben Bedingungen kultiviert wurden. In **B** sind die Patchoulolkonzentrationen angegeben, die durch die Kultivierung der *R. capsulatus* Stämme SB1003 und SB1003 Δ*crtJ* pRhon5Hi-2-*PatS-ispA* unter aeroben (40 ml) Bedingungen erhalten wurden. Die Bestimmung der Patchoulolausbeute erfolgte mittels GC von n-Dodecan-Extrakten. Dargestellt sind dabei die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und ihre zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

8.6.3 Verwendung von O_2-toleranten NifA-Varianten aus *K. pneumoniae* und *A. vinelandii*

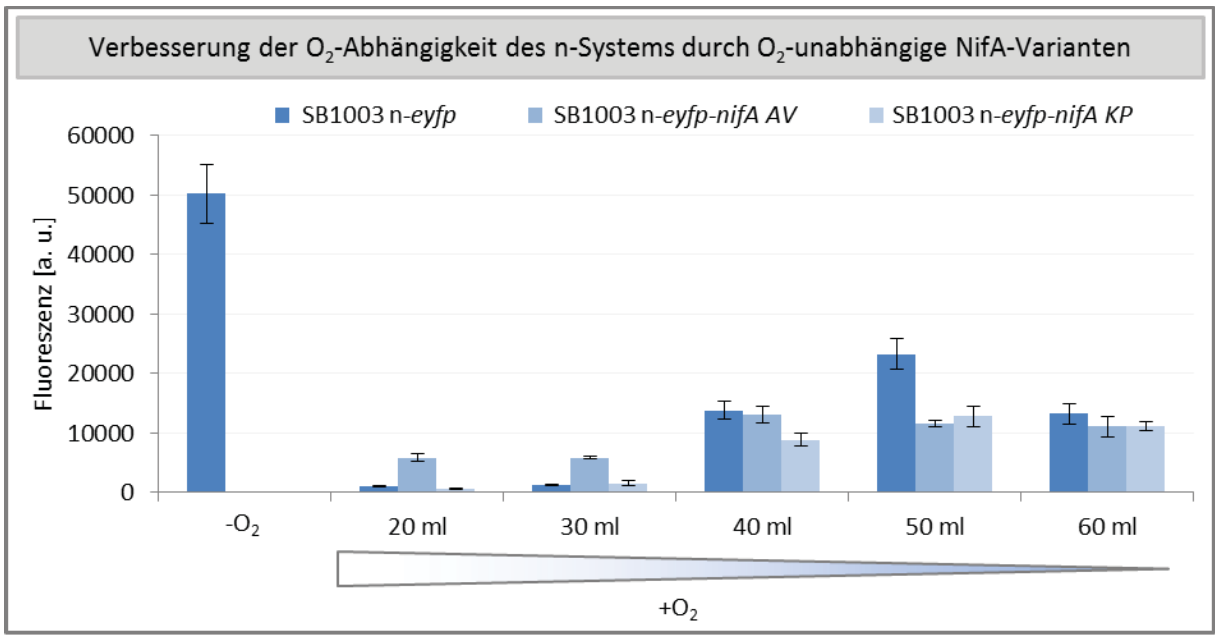

Abb. 31. Fluoreszenz des Reporter-Gens *eyfp* durch die Expression von *eyfp* und *nifA* aus *K. pneumoniae* und *A. vinelandii* in pRhon5Hi-2-*eyfp-nifA KP/AV* unter verschiedener Sauerstoffversorgung.
Die Vektoren pRhon5Hi-2-*eyfp-nifA KP/AV* wurden mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Xho*I in den Vektor pRhon5Hi-2-*eyfp* (**3.1.2**) kloniert (**2.7.4 + 2.7.5**). Der Ablauf des Experiments war identisch mit dem Experiment zur Untersuchung der Sauerstoffabhängigkeit der *nif*-basierten Genexpression (**3.1.2**). Nach 48 h Kultivierung unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen, die von strikt anaerob ($-O_2$) bis (mikro-)aerob ($+O_2$; 20 – 60 ml) variieren, wobei die Sauerstoffversorgung der Zellen von 20 ml zu 60 ml sinkt, wurden Proben (Zellen einer $OD_{660\,nm}$ = 1 entsprechend) entnommen. Die Proben wurden aufgeschlossen und die so erhaltenen löslichen Fraktionen wurden nach 2 h Inkubation, in der das EYFP aus den anaeroben Kulturen nachreifen konnte, für die spektroskopische Fluoreszenzmessung (**2.10.3**) eingesetzt. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten erhaltenen EYFP-Fluoreszenzwerte sowie die zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Düsseldorf, den 06.06.2017

Katrin Troost