

**Rekombinante Alkaloidproduktion
in *Pseudomonas putida* mit Hilfe modularer Systeme
zur Genclusterexpression**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Robin Weihmann

aus Siegburg

Düsseldorf, Mai 2022

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

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferentin: Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 14.09.2022

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation mit dem Thema „**Rekombinante Alkaloidproduktion in *Pseudomonas putida* mit Hilfe modularer Systeme zur Genclusterexpression**“ von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt wurde. Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät eingereicht und ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen. Es handelt sich bei allen von mir eingereichten Dissertationsschriften um in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Düsseldorf, den

Robin Weihmann

Meiner Familie

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Allen bedanken, die mich während dieser besonderen Zeit begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Überlassung des interessanten wissenschaftlichen Themas, sein Interesse an dieser Arbeit und dafür, dass ich meine Dissertation am Institut für Molekulare Enzymtechnologie durchführen durfte.

Frau Prof. Dr. Martina Pohl danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und die lehrreichen wissenschaftlichen Hinweise zu dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Anita Loeschcke für die herzliche, freundliche und freundschaftliche Betreuung während meiner gesamten Zeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie und insbesondere während dieser Arbeit. Ebenfalls für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen, die hervorragende und immer motivierende Leitung unserer Arbeitsgruppe, aber vor allem für den Zuspruch während des Schreibens dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Zudem möchte ich Dr. Thomas Drepper für seine Unterstützung und die immer freundliche und angenehme Atmosphäre in der Arbeitsgruppe Drepper danken, welche einen entscheidenden Anteil daran hatte, dass ich mich zur Promotion entschieden habe.

Ich danke allen Mitarbeitern des IMET für das gute Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft sowie den Zusammenhalt auch über die verschiedenen Arbeitsgruppen hinaus. Hervorheben möchte ich dabei besonders meine Kollegen, die jetzt Freunde sind.

Vielen Dank Fabi, Patrick, Oli, Nora, Luzie und Andrea für Eure Freundschaft, Eure Unterstützung und die schöne Zeit, auch über die Arbeit hinaus. Vielen Dank vor allem Dir, Fabi, für unsere Freundschaft und unseren Zusammenhalt seit unserem ersten Treffen. Ohne Dich wäre die Zeit während Master- und Doktorarbeit nur halb so schön gewesen.

Meinen „Studenten“ Luzie, Aileen, Schinya, Franziska und Florian möchte ich für die sehr gute Arbeit und große Hilfe während ihrer Arbeiten danken. Besonderer Dank gilt dabei Florian für seine herausragende Arbeit und große Unterstützung bei zahlreichen Projekten.

Auch bei allen Kommilitonen, Mitarbeitern des IMETs und Kooperationspartnern, die hier nicht namentlich genannt sind, mich aber dennoch auf diesem Weg begleitet haben, möchte ich mich hiermit herzlich bedanken.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen großartigen Freunden danken. Vielen Dank, dass Ihr immer für mich da wart, auch wenn ich meist viel zu wenig Zeit für Euch hatte. Ihr habt mich nie aufgegeben und insbesondere während der schwierigen Phase des Schreibens haben mir die Gespräche und Treffen mit Euch immer viel Kraft gegeben und zum Durchhalten motiviert. Ohne Euren Rückhalt wäre das alles nicht möglich gewesen und ich wäre nicht da, wo ich heute bin.

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Domröse A., **Weihmann R.**, Thies S., Jaeger K.-E., Drepper T., Loeschcke A. (2017). *Rapid generation of Pseudomonas putida secondary metabolite production strains using yTREX. Synthetic and Systems Biotechnology* 2 (4) 310-319 doi: 10.1038/s41598-019-43405-1

Domröse A., Hage-Hülsmann J., Thies S., **Weihmann R.**, Kruse L., Otto M., Wierckx N., Jaeger K.-E., Drepper T., Loeschcke A. (2019). *Pseudomonas putida rDNA is a favored site for the expression of biosynthetic genes. Scientific Reports*, 9 (7028) 1-13 doi: 10.1038/s41598-019-43405-1.

Weihmann R., Domröse A., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A., (2020). *Protocols for yTREX/Tn5-based gene cluster expression in Pseudomonas putida. Microbial Biotechnology*, 13 (1) 250-262 doi:10.1111/1751-7915.13402

Weihmann R. †, Kubicki S. †, Bitzenhofer N. L., Domröse A., Bator I., Kirschen L.-M., Kofler F., Funk A., Tiso T., Blank L. M., Jaeger K.-E., Drepper T., Thies S., Loeschcke A. *The modular pYT vector series employed for chromosomal gene integration and expression to produce carbazoles and glycolipids in P. putida* (Manuskript in Vorbereitung)

Koßmann D. F.†, Huang M.†, **Weihmann R.†**, Xiao X., Gätgens F., Weber T. M., Bitzenhofer N. L., Ibrahim S., Bangert K., Rehling L., Mueller C., Tiso T., Blank L. M., Drepper T., Jaeger K.-E., Grundler F. M. W., Pietruszka J., Schleker A. S. S., Loeschcke A. *Production of tailored hydroxyl prodiginine showing combinatorial activity with rhamnolipids against plant-parasitic nematodes* (Manuskript in Vorbereitung).

Konferenzbeiträge

Weihmann R., Kubicki S., Loeschcke A., Thies S., Domröse A., Drepper T., Jaeger K.-E., (2017) *Posterpräsentation: Be flexible and effective: yTREX-toolbox for the generation, transfer and expression of synthetic pathways in microorganisms.* 2. BioSC Symposium. Köln/Deutschland, November 2017.

Weihmann R., Kubicki S., Loeschcke A., Thies S., Domröse A., Drepper T., Jaeger K.-E., (2018) *Posterpräsentation: Rapid cloning, transfer and expression of biosynthetic pathways using the yTREX-toolbox.* Mosbacher Kolloquium - "Synthetic Biology - from Understanding to Application". Mosbach/Deutschland, März 2018.

Weihmann R., Kubicki S., Loeschcke A., Thies S., Domröse A., Drepper T., Jaeger K.-E. (2018) *Posterpräsentation: The yTREX-toolbox for rapid cloning, transfer and expression of biosynthetic pathways in bacteria.* Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Wolfsburg/Deutschland, April 2018.

Weihmann R., Kubicki S., Loeschcke a., Thies S., Domröse A., Drepper T., Jaeger K.-E. (2018) *Posterpräsentation: The yTREX-toolbox – Rapid cloning, transfer and expression of modified pathways.* Aachen Protein Engineering Symposium (AcES) 2018. Aachen/Deutschland, Oktober 2018.

Weihmann R., Kubicki S., Thies S., Domröse A., Brass H., Klein A., Pietruszka J., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2019) *Posterpräsentation: Natural product and precursor production by effective TREX-mediated gene cluster expression in Pseudomonas putida.* Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Mainz/Deutschland, März 2019.

Weihmann R., Domröse A., Kubicki S., Thies S., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2019) *Posterpräsentation: yTREX mediated heterologous pathway activation and reporter-based strain selection in Pseudomonas putida.* 2nd Synthetic biology for natural products conference. Puerto Vallarta/Mexiko, Juni 2019.

Weihmann R., Domröse A., Kubicki S., Thies S., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2019) *Posterpräsentation: Engineered natural product synthesis in Pseudomonas putida by using the yTREX-system.* German Conference on Synthetic Biology. Aachen/Deutschland, September 2019.

Weihmann R., Domröse A., Kubicki S., Thies S., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2019) *Posterpräsentation: Natural product synthesis in Pseudomonas putida by using the yTREX-Toolbox.* Pseudomonas grassroots meeting. Leiden/Niederlande, November 2019.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
I. Abbildungsverzeichnis	IV
II. Tabellenverzeichnis	VII
III. Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Naturstoffe	1
1.1.1 Sekundärmetabolite als Quelle bioaktiver Substanzen	1
1.1.2 Antibiotika - Segen und Fluch der modernen Medizin	2
1.2 Alkaloide	4
1.2.1 Strukturelle Vielfalt und Produktion von Prodigininen	5
1.3 Heterologe Produktion von Sekundärmetaboliten	15
1.3.1 <i>Pseudomonas putida</i> als robuster und vielseitiger heterologer Produktionswirt	19
1.4 Das Transfer- und Expressions-System	21
1.4.1 Limitierungen des TREX-Systems – Weiterentwicklung zum γ TREX-System	21
1.4.2 Identifizierung vielversprechender genomischer Loci zur Genclusterexpression	26
1.4.3 Limitierungen des γ TREX-Systems	30
1.5 Zielsetzung	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Verbrauchsmaterialien	32
2.2 Chemikalien	32
2.2.1 Puffer	34
2.2.2 Enzyme	34
2.2.3 Molekularbiologische Kits	35
2.3 Verwendete Geräte und Software	35
2.3.1 Geräte	35
2.3.2 Software	36
2.4 Verwendete Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide	38
2.4.1 Verwendete Bakterien- und Hefestämme	38
2.4.2 Verwendete Plasmide	39

2.4.3	Verwendete Oligonukleotide -----	40
2.5	Mikrobiologische Methoden -----	43
2.5.1	Messung der optischen Dichte von Kulturen-----	43
2.5.2	Allgemeine Kultivierung von Mikroorganismen -----	44
2.5.3	Selektion von Bakterien -----	46
2.5.4	Kulturen zur Produktion verschiedener Metabolite-----	48
2.5.5	Einbringen von DNA in Bakterien und Hefen-----	49
2.6	Molekularbiologische Methoden -----	52
2.6.1	Angewendete Klonierungsmethoden -----	52
2.6.2	Manipulation von DNA -----	53
2.7	Biochemische Analytik-----	56
2.7.1	LacZ basiertes Screening auf X-Gal-Agarplatten-----	56
2.7.2	Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität (ONPG-Test)-----	57
2.7.3	Manuelles Screening nach fluoreszierenden Kolonien auf Agarplatten-----	59
2.7.4	Isolierung fluoreszierender Zellen mittels <i>FACS</i> -----	59
2.8	Analytik von synthetisierten Sekundärmetaboliten -----	60
2.8.1	Extraktion der produzierten Sekundärmetabolite aus <i>P. putida</i> -----	60
2.8.2	Analyse und Quantifizierung der produzierten Sekundärmetabolite -----	62
2.8.3	Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit angeschlossener Photodiodenzeile (PDA)-----	64
2.8.4	Dünnschichtchromatographie (DC) mit Hilfe eines <i>Automatic TLC Sampler</i> -----	67
2.8.5	Isolierung von Prodigininen mit einem Äkta-Chromatographiesystem-----	68
2.8.6	Massenspektrometrische Prodiginin-Analyse-----	69
3	Ergebnisse und Diskussion -----	70
3.1	Rekombinante Biosynthese natürlicher Prodiginine in <i>P. putida</i> -----	71
3.1.1	Umsetzung von Prodigiosin zu Cycloprodigosin -----	71
3.1.2	Produktion von Norprodigosin mit Hilfe eines artifiziellen Genclusters-----	83
3.2	Prodigininmutasynthese -----	97
3.2.1	Erzeugung artifizieller Vorstufenproduzenten zur Mutasynthese von Prodigininen ---	97
3.2.2	Anwendung der erzeugten MBC-Stämme zur Mutasynthese-----	106
3.3	Konzeption der <i>yTREX-Toolbox</i> als modulares Expressionssystem -----	115
3.3.1	Das <i>yTREX-Toolbox</i> Konzept-----	116
3.3.2	Konstruktion der <i>yTREX-Toolbox</i> -Vektoren-----	130

3.3.3	Erzeugung von Stämmen und Vektoren zur gezielten rDNA-Integration -----	137
3.4	Anwendung des <i>yTREX-Toolbox</i> -Systems zur Violaceinproduktion-----	145
3.4.1	Klonierung von <i>vio</i> -Genen in pYT-Vektoren zur Tn5- und 16S-Integration -----	145
3.4.2	Funktionsvalidierung eines pYT-Vektors zur Tn5-Integration -----	147
3.4.3	Funktionsvalidierung eines pYT-Vektors zur 16S-Integration -----	150
3.5	Allgemeine Anwendungsmöglichkeiten des <i>yTREX-Toolbox</i> -Systems -----	159
4	Zusammenfassung -----	162
5	Summary -----	163
6	Literaturverzeichnis -----	164
7	Anhang -----	186
7.1	Massespektren der Rohextrakte von <i>P. putida</i> , <i>P. putida</i> pig21 und <i>P. putida</i> pig21-Prub680 im Rahmen der Cycloprodigiosinproduktion -----	186
7.2	Chromatographie-Tests mit Isaspher C18-AQ Material -----	189
7.3	Die YT_core-Sequenz als Basis des <i>yTREX-Toolbox</i> -Systems -----	190
7.4	Übersicht des Violaceinbiosynthesewegs -----	193
7.5	Integration des Gens <i>sacB</i> in die pYT-Vektoren zur <i>rrn</i> -Integration zur Vermeidung von <i>single crossover</i> Ereignissen -----	194
7.6	Darstellung der in den erzeugten Stämmen aufgetretenen Deletionen im Gen <i>vioD</i> -----	195
8	Anteilerklärung an veröffentlichten Werken -----	197

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Historischer Ablauf der Entdeckung des Penicillins bis zur industriellen Produktion des ersten auf einem Naturstoff basierenden Antibiotikums	2
Abbildung 1-2: Auswahl einiger Grundstrukturen von Alkaloiden	4
Abbildung 1-3: Tripyrrol-Grundstruktur der Prodiginine	6
Abbildung 1-4: Schematische Abbildung des Prodigiosin-Genclusters und des durch dieses kodierten Biosynthesewegs	7
Abbildung 1-5: Strukturen der zyklischen Prodiginine Cycloprodigiosin und Streptorubin B	9
Abbildung 1-6: Bildung von Norprodigiosin in einer <i>Serratia marcescens</i> Mutante.....	10
Abbildung 1-7: Flussschemata von Biosynthese und Derivategewinnung durch vorläufergerichtete Biosynthese oder Mutasynthese	13
Abbildung 1-8: Mutasynthese am Beispiel eines Prodigiosinproduzenten mit partieller Deletion des MAP-Biosynthesewegs	14
Abbildung 1-9: Biosynthetische Produktion diverser Naturstoffe durch heterologe Genexpression in <i>P. putida</i>	20
Abbildung 1-10: Vergleich des Aufbaus der TRES- und der γ TRES-Kassetten	23
Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der Anwendung des γ TRES-Systems	25
Abbildung 1-12: Schematische Darstellung des <i>P. putida</i> KT2440 Chromosoms mit den verschiedenen <i>rrn</i> -Operons	27
Abbildung 1-13: Schematische Darstellung eines Ribosoms bei der Proteinbiosynthese	28
Abbildung 2-1: Verifizierung des Substratüberschusses bei der Durchführung eines ONPG-Tests.....	59
Abbildung 2-2: Kalibration durch Korrelation der Signalfäche bei LC-UV-Detektion von MBC mit der Probenkonzentration.....	66
Abbildung 2-3: Kalibration durch Korrelation der Signalfäche bei HPLC-PDA-Detektion der PCA-Referenz mit der Probenkonzentration.....	67
Abbildung 3-1: Etablierung der Biosynthese von Cycloprodigiosin in <i>P. putida</i>	73
Abbildung 3-2: Prodigiosin- und Cycloprodigiosinproduktion von <i>P. putida</i> -Stämmen unter verschiedenen Bedingungen	76
Abbildung 3-3: ÄKTA-Chromatographie-basierte Trennung des Cycloprodigiosin vom Prodigiosin nach <i>in vivo</i> Umsetzung.....	78
Abbildung 3-4: Erzeugung von pigmentierten Expressionsstämmen durch Integration eines artifiziiellen Norprodigioisin-Genclusters in das Genom von <i>P. putida</i> KT2440	85
Abbildung 3-5: Massenspektrometrische und HPLC-Analyse von Proben der <i>P. putida</i> -Stämme Nor2 und KT2440.....	87

Abbildung 3-6: Vergleich der Norprodigiosinproduktion verschiedener <i>P. putida</i> -Stämme bei verschiedenen Bedingungen	88
Abbildung 3-7: Norprodigiosintiter des Stammes <i>P. putida</i> Nor2 in 50 ml Kulturen vergleichend nach 24 h und 48 h	90
Abbildung 3-8: ÄKTA-Chromatographie-basierte Isolierung und massenspektrometrische Analyse des Pigments aus Extrakten von <i>P. putida</i> Nor2	92
Abbildung 3-9: Blau/weiß-Screening Platte von <i>P. putida</i> PCA-lacZ im Vergleich mit wildtypischen Kolonien	99
Abbildung 3-10: Korrelation zwischen produziertem PCA und der β -Galactosidaseaktivität in rekombinanten <i>P. putida</i> -Stämmen	100
Abbildung 3-11: Vergleich verschieden konzipierter MBC-bildender Mutasynthesestämme.....	103
Abbildung 3-12: MBC-Produktion verschiedener <i>P. putida</i> Expressionsstämme eines artifiziellen MBC-Genclusters	105
Abbildung 3-13: Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen zwischen den Proteinen PigB, PigN/F und PigC	107
Abbildung 3-14: Mutasynthesefähigkeit verschiedener <i>P. putida</i> -Expressionsstämme eines artifiziellen MBC-Genclusters	110
Abbildung 3-15: PigB-abhängige Prodigiosinmutasynthese mit PigC-I1 in <i>P. putida</i> MBC18	113
Abbildung 3-16: Konzept und Prinzip der Entwicklung einer modularen γ TREX-Toolbox	117
Abbildung 3-17: Position der Endonukleaseschnittstellen und Rekombinationssequenzen im Integron eines γ TREX- <i>Toolbox</i> -Vektors	120
Abbildung 3-18: Schematische Darstellung der genetischen Elemente zur Anwendung verschiedener Integrations-mechanismen in der γ TREX- <i>Toolbox</i>	124
Abbildung 3-19: Übersicht der Lokalisation der <i>rrn</i> -Operons im Genom von <i>P. putida</i> KT2440 mit durchschnittlichen Prodigiosintitern	126
Abbildung 3-20: Prodigiosinproduktion in Voll- und Minimalmedium bei <i>pig</i> -Geninsertion in verschiedene <i>rrn</i> -Operons.....	128
Abbildung 3-21: Klonierung des ersten pYT-Vektors zur Tn5-Transposition und anschließende Rekonstruktion des <i>mob</i> -Gens	131
Abbildung 3-22: Gesamtlänge und Codon-Additionen des <i>mob</i> -Gens in verschiedenen Arbeiten....	132
Abbildung 3-23: <i>P. putida</i> -Phänotypen nach pYT-vermittelter Tn5-Transposition verschiedener Transkriptionsreportergene	135
Abbildung 3-24: Klonierung eines Vektors zur Integration der 16S <i>landing site</i> in <i>P. putida rrn</i> -Operons	138

Abbildung 3-25: Integration der 16S <i>landing site</i> in <i>P. putida</i> <i>rrn</i> -Operons am Beispiel des <i>rrn</i> -Operons D.....	140
Abbildung 3-26: Schematischer Arbeitsablaufs zur Identifizierung von sieben <i>P. putida</i> -Stämmen mit individueller 16S <i>landing site</i> Markierung.....	141
Abbildung 3-27: Klonierung eines pYT-Vektors zur chromosomalen Genintegration in die 16S <i>landing site</i>	143
Abbildung 3-28: Parallele Klonierung von <i>vio</i> -Genen in pYT-Vektoren zur Tn5- und 16S-Integration.....	146
Abbildung 3-29: Analyse der produzierten Pigmente in <i>P. putida</i> -Stämmen nach pYT-vermittelter Tn5-Integration von <i>vio</i> -Genen.....	148
Abbildung 3-30: Deoxy-/Violaceintiter verschiedener <i>P. putida</i> -Stämme nach pYT-vermittelter Tn5-Transposition von <i>vio</i> -Genen.....	149
Abbildung 3-31 Analyse der produzierten Pigmente in <i>P. putida</i> -Stämmen nach pYT-vermittelter 16S-Integration von <i>vio</i> -Genen.....	153
Abbildung 3-32: Deoxyviolaceintiter verschiedener <i>P. putida</i> -Stämme nach pYT-vermittelter 16S-Integration von <i>vio</i> -Genen.....	155
Abbildung 3-33: Schematische Abbildung des modularen γ TREX-Toolbox-Systems.....	161
Abbildung 7-1: Massespektrum eines Rohextrakts einer wildtypischen Negativkontrolle von <i>P. putida</i>	186
Abbildung 7-2: Massespektrum eines Rohextrakts des Stammes <i>P. putida</i> <i>pig21</i>	187
Abbildung 7-3: Massespektrum eines Rohextrakts des Stammes <i>P. putida</i> <i>pig21</i> bei gleichzeitiger Expression der Zyklastase Prub680	188
Abbildung 7-4: Übersichtsdarstellung der Gensequenz der YT_ <i>core</i> -Sequenz als Basis des γ TREX-Toolbox-Systems.....	191
Abbildung 7-5: Violaceinbiosyntheseweg	193
Abbildung 7-6: Integration des Gens <i>sacB</i> in den Vektor pYTRW24K_1Ti1	194
Abbildung 7-7: Native Aminosäuresequenz des Gens <i>vioD</i> mit eingetragenen Deletionen der verschiedenen <i>rrn</i> -Integrationsstämme	195
Abbildung 7-8: Lokalisation der aufgetretenen Mutationen in der Kristallstruktur der Hydroxylase VioD	196

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Auflistung verwendeter spezieller Materialien	32
Tabelle 2-2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien	32
Tabelle 2-3: Auflistung spezieller, verwendeter Enzyme	34
Tabelle 2-4: Auflistung der verwendeten molekularbiologischen Kits	35
Tabelle 2-5: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte	35
Tabelle 2-6: Auflistung der während dieser Arbeit verwendeten PC Software	37
Tabelle 2-7 Auflistung der verwendeten Bakterien-und Hefe-Stämme.....	38
Tabelle 2-8: Auflistung der verwendeten Plasmide	39
Tabelle 2-9: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide	40
Tabelle 2-10: Korrelationsfaktoren zur Vergleichbarkeit von Plattenphotometer und Photometermesswerten.....	43
Tabelle 2-11: Auflistung der Inhaltsstoff der verwendeten Medien.....	44
Tabelle 2-12: Auflistung der Inhaltsstoffe von verwendeten Hefemedien.....	45
Tabelle 2-13: Auflistung der in dieser Arbeit genutzte Antibiotika in Vorrats- und Endkonzentrationen	46
Tabelle 2-14: Inhaltsstoffe des mit Saccharose versetzten LB-Mediums zur double-crossover Selektion	47
Tabelle 2-15: Zusammensetzung der verwendeten Puffer	54
Tabelle 2-16: Beispielhafte Ansatzzusammensetzung von 20 und 50 µl PCR-Reaktionen	55
Tabelle 2-17: PCR-Programme von 2-Step und 3-Step PCR, die nach Bedarf angepasst wurden	56
Tabelle 2-18: Puffer und Lösungen zur Durchführung des ONPG-Tests	57
Tabelle 2-19: Zusammensetzung von 1x PBS-Puffer	60
Tabelle 3-1: Nomenklatur, Funktion und Länge der Rekombinationssequenzen.....	121
Tabelle 3-2: Endonuklease, Funktion und Sequenzlänge der Schnittstelle	122
Tabelle 3-3: Resistenzeigenschaften von <i>E. coli</i> DH5 α -Zellen mit verschiedenen pYT-Vektoren.....	134
Tabelle 7-1: Vortests zur Festlegung von Äkta-Chromatographiebedingungen zu Trennung von Prodigininen.....	189
Tabelle 7-2: pYT-Vektor Nomenklatur zur eindeutigen Benennung erzeugter Vektoren.....	191
Tabelle 7-3: Vorkommen von Endonukleaseschnittstellen der YT_core-Sequenz in anderen pYT- Elementen.....	192
Tabelle 7-4: pYT-Plasmide mit SacB-Integration im Vektorrückgrat.....	194

III. Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
ARS	Autonom replizierende Sequenz
AU	Willkürliche Einheit (engl. <i>arbitrary unit</i>)
Bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
DAD	Diodenarray-Detektor
DCM	Dichormethan
DCW	Zelltrockengewicht (engl.: <i>dry cell weight</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
fw	Vorwärts (engl. <i>forward</i>)
g	Gramm
g	Erdanziehungskraft ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
gDNA	genomische DNA
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)s
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HR	Homologe Rekombination
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Irg	Irgasan
k	Kilo (10^3)
Kb	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i> (engl.)

LiAc	Lithiumacetat
Lsg.	Lösung
M	Stoffmengenkonzentration (Molar [mol/L])
m	Meter
m	Milli (10^{-3})
mA	Milliampere
MAP	2-Methyl-3-n-amy-pyrrol
MBC	4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Molekulargewicht (engl.: <i>molecular weight</i>)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
Ori	Replikationsursprung (engl.: <i>origin of replication</i>)
oriC	Chromosomaler Replikationsursprung
oriT	Transferursprung (engl. <i>origin of transfer</i>)
OTR	Sauerstofftransferrate (engl. <i>oxygen transfer rate</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDA	Photodiodenzeile
PEG	Polyethylenglykol
p.a.	analysenrein (pro analysi)
<i>rev</i>	Rückwärts (engl. <i>reverse</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
<i>rrn</i>	Ribosomale RNA
s	Sekunde(n)
SC	Synthetisches Vollmedium (engl. <i>synthetic complete</i>)
SD	Synthetische Dextrose (engl. <i>synthetic dextrose</i>)
Sm	Streptomycin
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TB	<i>Terrific broth</i> (engl.)
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc	Tetracyclin
Tm	Hybridisierungstemperatur

TREX-System	<u>T</u> ransfer und <u>E</u> xpressions-System (engl. <i>transfer and expression</i>)
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
u. a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
UTR	untranslatierte Region (engl. <i>untranslated region</i>)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (engl. <i>volume per volume</i>)
VE	Vollentsalzt
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YNB	Hefe-Stickstoff-Basismedium (engl.: <i>yeast nitrogen base</i>)
γ TREX-System	<u>T</u> ransfer und <u>E</u> xpressions-System (Mit der Möglichkeit zur Hefe Klonierung)
YPD	Hefe-Pepton-Dextrose Medium (engl. <i>yeast peptone dextrose</i>)
z. B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge
μ	Mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Naturstoffe

Ganz allgemein bezeichnet der Begriff Naturstoffe alle Substanzen, die von lebenden Organismen gebildet werden. Innerhalb dieser Substanzen wird seit über 100 Jahren zwischen Primär- und Sekundärmetaboliten unterschieden (Kossel, 1891). Die Einteilung erfolgt nach Kossel aufgrund der Frage, ob die jeweilige Substanz für das Überleben des Organismus notwendig ist oder nicht. Primärmetabolite sind nach dieser Einteilung unverzichtbar und setzen sich aus einer überschaubaren Anzahl bekannter Stoffe wie z.B. Aminosäuren und Kohlenhydraten zusammen (Hanson, 2003), während Sekundärmetabolite eine enorme Vielfalt teils sehr komplexer Substanzen umfassen. Sie sind dabei nicht zwingend zum Überleben notwendig, können jedoch Überlebensvorteile bieten. Da Sekundärmetabolite eine Vielfalt von verschiedenen Funktionen übernehmen können, werden diese in den folgenden Abschnitten genauer erläutert, um die Bedeutung der entsprechenden Naturstoffforschung einzuordnen.

1.1.1 Sekundärmetabolite als Quelle bioaktiver Substanzen

Sekundärmetabolite bilden im Gegensatz zu den Primärmetaboliten eine weitaus größere und diversere Gruppe von Verbindungen. Diese sind besonders interessant, da sie trotz ihrer nicht unmittelbaren Rolle zur Aufrechterhaltung des Metabolismus zum Teil entscheidende Aufgaben für das Überleben eines Organismus oder einer Spezies übernehmen (Caretto et al., 2015; Demain, 1974; Gershenzon & Dudareva, 2007; Haavik, 1979; Vaishnav & Demain, 2011). Die große Anzahl verschiedener Substanzen hat dabei vielfältige Funktionen, indem sie u.a. zur Verteidigung, als Lockstoff oder als Pheromon dienen können (Hanson, 2003). Insbesondere Substanzen, die zur Verteidigung des Produzenten dienen, werden seit fast 100 Jahren zur Herstellung von Antibiotika verwendet. Das bekannteste Beispiel und der erste zu diesem Zweck genutzte Sekundärmetabolit war Penicillin, welches 1928 von Alexander Fleming entdeckt wurde (Abbildung 1-1). Penicillin wurde ab 1942 industriell produziert und stand ab 1950 auch einem großen Teil der Bevölkerung zur Verfügung (Friedrich, 2006; Gradmann, 2014). In der Zeit seit der Entdeckung dieses Antibiotikums und dessen bahnbrechenden Erfolges bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen wurde die Forschung stark ausgeweitet. Diese Forschung führte dazu, dass bis heute viele weitere antibiotisch wirkende natürliche Substanzen entdeckt und pharmazeutisch genutzt werden. Zudem sind auch viele andere Medikamente Naturstoffe oder haben zumindest einen natürlichen Ursprung (Newman & Cragg, 2020, 2016; von Nussbaum et al., 2006).

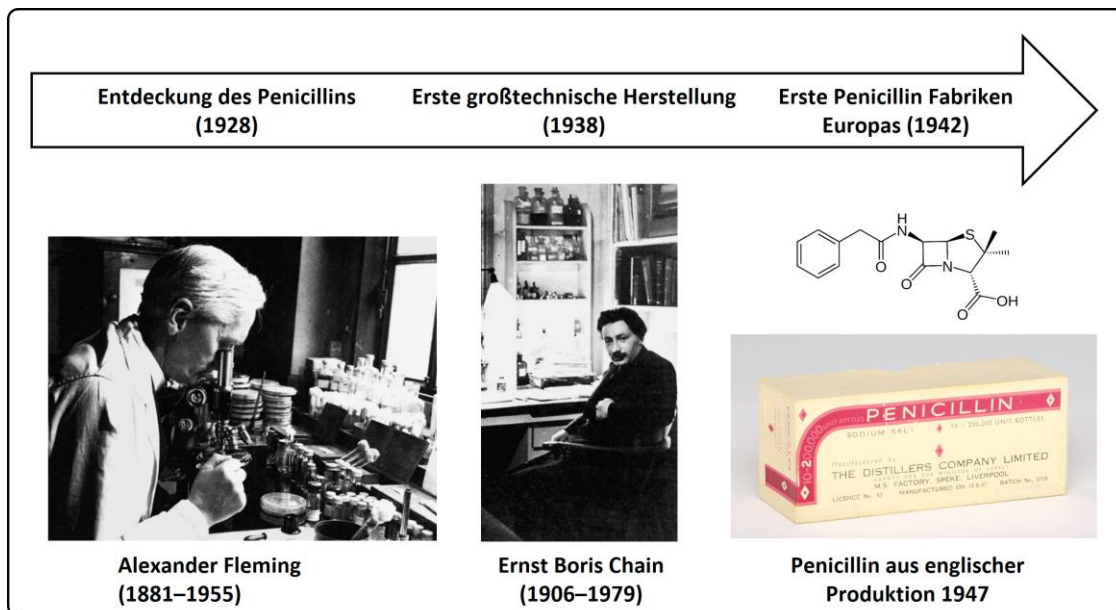


Abbildung 1-1: Historischer Ablauf der Entdeckung des Penicillins bis zur industriellen Produktion des ersten auf einem Naturstoff basierenden Antibiotikums

Alexander Fleming entdeckte die wirksame Substanz im Jahr 1928 im Organismus *Penicillium chrysogenum*, welchen er als Kontamination auf einer mit *Staphylokokken* beimpften Agarplatte fand. Die erste beschriebene großtechnische Produktion des Penicillins wurde schließlich von Ernst Boris Chain im Jahre 1938 durchgeführt. Daraufhin wurden im Jahr 1942 die ersten Penicillin produzierenden Fabriken Europas der Firma „The Distillers Company Limited“ eröffnet. Verwendung der Portraits genehmigt durch Copyright Wiley-VCH GmbH (Friedrich, 2006). Verwendung der Fotografie der Penicillinpackung genehmigt durch Copyright: Deutsche Apotheken Museum-Stiftung. Objekt: Penicillin aus englischer Produktion, hergestellt am 14.08.1047. Inv.-Nr. I B 420.

Auch in der Agrarindustrie werden mehr und mehr natürliche Substanzen eingesetzt, da sie aufgrund ihres natürlichen Ursprungs meist besser oder überhaupt biologisch abbaubar sind und so einen ökologisch verträglicheren und nachhaltigen Einsatz ermöglichen (Karibasappa et al., 2021). Ausgehend von einem aktiven Naturstoff können somit hochwirksame Produkte entwickelt werden. Die breite Anwendbarkeit von Sekundärmetaboliten zeigt, dass diese eine wichtige und wertvolle Quelle zur Identifizierung biologisch aktiver Substanzen für die Pharma- und Agrarindustrie sind.

1.1.2 Antibiotika - Segen und Fluch der modernen Medizin

Die Dringlichkeit mit der die Naturstoffforschung weiter vorangetrieben werden sollte, erscheint am Beispiel der Antibiotika besonders deutlich. Über die Hälfte der von 1981 bis 2019 zugelassenen Antibiotika stellen Naturstoffe oder Derivate von diesen dar (Newman & Cragg, 2020). Aus diesem Grund verwundert es nicht, dass diese Substanzen, wenn auch sehr lange unbewusst, schon seit Jahrtausenden die wirksamen Bestandteile früherer Medizin waren (Bourgaud et al., 2001). Der Einsatz von Antibiotika hat seit den 1930er Jahren zu einer erheblichen Verbesserung der medizinischen Behandlungsmöglichkeiten geführt und stellt bis heute einen Grundpfeiler der modernen Medizin dar (AkadWi Hamburg & Academia Leopoldina, 2012).

Zusammen mit dem vollsynthetischen Sulfonamid Prontosil®, dessen antibiotische Wirkung von Gerhard Domagk entdeckt wurde und welches unter dem Namen Prontalbin® durch Bayer ab 1936 flächendeckend vermarktet wurde (Gradmann, 2014; von Nussbaum et al., 2006), war Penicillin das zweite kommerziell vertriebene Antibiotikum. Jedoch wurden Penicillin wie auch die im Folgenden entdeckten Antibiotika wie Streptomycin (1948), Tetracyclin (1953) sowie das hinsichtlich seiner Säurestabilität verbesserte Penicillin V (1953) in großem Maße eingesetzt. Dadurch traten schnell resistente Bakterienstämme auf, womit die Antibiotika schon nach kurzer Zeit nicht mehr oder nur noch eingeschränkt wirkten (Gradmann, 2014). Die vielfach als Hauptgrund der Entwicklung multiresistenter Keime angesehene Antibiotikagabe bei mikrobiologisch fragwürdigem Befund wurde in dieser Zeit weithin verbreitete Praxis (Gradmann, 2014; von Nussbaum et al., 2006). Daraus ergab sich insbesondere in den Krankenhäusern eine extreme Selektion hin zu resistenten Bakterienstämmen, die gegen immer mehr Antibiotika immun wurden (Gradmann, 2014). Dieses Phänomen setzt sich bis heute fort und führt zu deutlich längeren Krankenhausaufenthalten und damit einhergehend stark gestiegenen Behandlungskosten bis hin zu Todesfällen (AkadWi Hamburg & Academia Leopoldina, 2012; Fair & Tor, 2014; Shlaes, 2010; Sipahi, 2008). Das Problem der zunehmend resistenten Keime insbesondere in Krankenhäusern wird dabei zudem durch den Mangel an neuen Antibiotika begünstigt (Schäberle & Hack, 2014).

Bis zum Anfang der 1980er Jahre wurde die Suche nach neuen Substanzen mit antibiotischer Wirkung noch stark vorangetrieben und es wurden viele neue Verbindungen gefunden. Seitdem wurden die Neuentdeckungen jedoch deutlich seltener und die Forschung auf diesem Gebiet mehr und mehr eingestellt, was zu einer starken Abnahme der Anzahl neu zugelassener Antibiotika führte (Boucher et al., 2009; Newman & Cragg, 2020; Schäberle & Hack, 2014; Spellberg et al., 2004). Dies hat verschiedene Gründe; erstens ist die Forschung und Entwicklung von neuen antibiotisch wirksamen Substanzen durch den stetig steigenden Forschungsaufwand, der betrieben werden muss, um gänzlich neue Verbindungen zu finden, sehr kostenintensiv und zweitens sind die bürokratischen und medizinischen Zulassungsanforderungen mit einem hohen Zeitaufwand verbunden. Dazu kommt, dass die neu entwickelten Medikamente häufig zunächst als Reserveantibiotika zurückgehalten und somit wenig eingesetzt werden. Des Weiteren ist die Behandlungsdauer einer Infektionskrankheit mit einem gut wirksamen Antibiotikum, verglichen mit der einer chronischen Erkrankung sehr gering, was alles in allem zu einem geringen Profit verglichen mit den hohen Investitionskosten führt. Aus diesen Gründen ist die Antibiotikaforschung wenig lohnend für die Unternehmen, weshalb diese sich zunehmend stärker auf die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung chronischer Krankheiten fokussieren (Fair & Tor, 2014; Overbye & Barrett, 2005; Projan, 2003; Ray & Rice, 2004).

Viele Versuche der letzten 5 bis 10 Jahren, neue Antibiotika zu identifizieren, schlugen zudem fehl, da die Pharmaindustrie sich aus Kostengründen vielfach ausschließlich auf Substanzen konzentrierte, welche keinen neuen Angriffspunkt in Bakterien haben, sondern einen bekannten Mechanismus mit einer neuen Substanz ansprechen (da Cunha et al., 2021; Overbye & Barrett, 2005). Da mit der steigenden Verabreichung der gleichen Antibiotika aber immer mehr multiresistente Bakterien auftreten, die nur zum Teil noch auf die wenigen verbliebenen Reserveantibiotika reagieren, ist es umso wichtiger neue Substanzen zu finden, die als Antibiotika eingesetzt werden können. Dabei sollte vor allem die Identifizierung neuer Angriffspunkte im Metabolismus von Mikroorganismen im Vordergrund stehen (Overbye & Barrett, 2005; Ray & Rice, 2004). Um diese Probleme zu lösen, bietet die Naturstoffforschung großes Potential und ist unerlässlich (Rodrigues et al., 2016).

1.2 Alkaloide

Eine große Anzahl der biologisch aktiven Substanzen sind Alkaloide, welche mit ca. 20.000 Verbindungen eine große Gruppe der Naturstoffe darstellen. Die meisten dieser Substanzen wurden dabei aus Pflanzen isoliert, jedoch kommen sie auch in Mikroorganismen und zum Teil auch in Tieren vor. Alkaloide sind organische, stickstoffhaltige Substanzen, welche meist heterozyklische Strukturen mit basischer Natur aufweisen. Die Substanzen sind meistens von Aminosäuren wie beispielsweise Lysin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Ornithin abgeleitet und werden häufig anhand ihrer daraus resultierenden Strukturen klassifiziert. Daneben können auch anders biosynthetisierte wie etwa isoprenoidabgeleitete Verbindungen zu den Alkaloiden gezählt werden (Bhambhani et al., 2021; Roy, 2017; Willems et al., 2020; Wu & Chappell, 2008). Die beiden größten Gruppen sind die Indol- und die Isochinolinalkaloide mit jeweils mehr als 4000 Substanzen. Weitere wichtige Klassen sind die Tropan- oder auch Steroidalkaloide, sowie die Pyrrolidin- und Pyridinalkaloide (Abbildung 1-2).

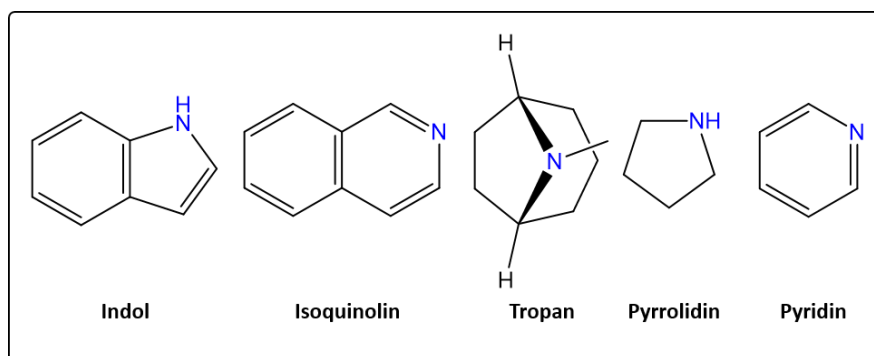


Abbildung 1-2: Auswahl einiger Grundstrukturen von Alkaloiden

Dargestellt ist eine Auswahl der meistvertretenen Grundstrukturen, aus denen die Substanzen der Klasse der Alkaloide aufgebaut sind. Charakteristisch sind die heterozyklisch gebundenen Stickstoffatome.

Häufig haben Alkaloide eine starke biologische Aktivität im menschlichen Körper, welche zum Teil aus der strukturellen Verwandtschaft zu körpereigenen Signalmolekülen resultiert (Bhambhani et al., 2021; Roy, 2017; Verpoorte, 2005).

Darunter sind bekannte Vertreter, wie Koffein oder Nikotin, aber auch pharmazeutisch genutzte Substanzen wie z.B. Morphin. Zudem gehört eine ganze Reihe als Rauschmittel eingestufte Substanzen wie Kokain oder Lysergsäurediethylamid zu den Alkaloiden (Cordell et al., 2001). Der Umstand, dass Alkaloide typischerweise im sauren Milieu wasserlöslich sowie im neutralen und basischen Milieu fettlöslich sind, gibt diesen Substanzen zudem einzigartige Eigenschaften für die medizinische Anwendung (Verpoorte, 2005). Unter anderem die günstige Kombination der aufgezählten Eigenschaften machen Alkaloide besonders attraktiv bei der Suche und der Entwicklung neuer pharmakologisch nutzbarer Substanzen (Rodrigues et al., 2016).

Beispiele für Alkaloide, welche von Mikroorganismen produziert werden und in den letzten Jahren die wissenschaftliche Forschung beschäftigt haben, sind Violacein und die Prodiginine. Bei Violacein handelt es sich um ein Bisindol, welches u. a. von den Bakterien *Chromobacterium violaceum*, *Janthinobacterium lividum*, und *Pseudoalteromonas tunicata* gebildet wird und eine auffällige lila Farbe besitzt (Choi et al., 2015; Hoshino, 2011). Zudem konnten interessante pharmazeutische Eigenschaften wie eine antibiotische und antivirale Wirkung gezeigt werden (Choi et al., 2021). Insbesondere sind jedoch auch die zytotoxische Wirkung sowie die Apoptose auslösende Wirkung hervorzuheben, welche die Wirksamkeit gegen verschiedene Krebszelllinien bedingt (Durán et al., 2016; Durán & Menck, 2001; Melo, 2003). Auch Prodiginine zeigen eine sehr intensive Färbung, welche dafür sorgte, dass Prodiginine schon vor Jahrhunderten den christlichen Glauben beeinflussten. Heute geht man davon aus, dass viele der bekannten Blutwunder auf eine Kontamination mit prodigiosinproduzierenden Bakterien zurückgehen, welche eine rote Färbung haben (Bennett & Bentley, 2000; Garlaschelli, 1999). In der Neuzeit, jedoch vor der kommerziellen Produktion von Pigmenten, wurde Prodigiosin auch vorübergehend aus Bakterien isoliert und zum Färben von Seide und Wolle verwendet (Bennett & Bentley, 2000). Jedoch sind es heute die vielversprechenden biologischen Aktivitäten, welche dieser Klasse hydrophober Pyrrolalkaloide viel Aufmerksamkeit bringen.

1.2.1 Strukturelle Vielfalt und Produktion von Prodigininen

Alle Prodiginine zeichnen sich strukturell dadurch aus, dass sie auf einem Tripyrrolsystem basieren. Dieses besitzt ein immer gleich bleibendes Pyrrolylpyrromethen-Chromophor als zentrale Einheit, welches lediglich unterschiedliche Alkylgruppen besitzt (Fürstner, 2003). Die natürliche Vielfalt der Prodiginine entsteht durch die Kondensationsreaktion zwischen einem Bipyrrrol und einem Monopyrrol, wobei sich die individuelle Struktur dieser Bausteine in den einzelnen Biosynthesewegen der Produktfamilie z.B. durch verschiedene Seitenketten unterscheiden können. Wurden die beiden Vorstufenmoleküle abschließend zum Prodiginin kondensiert, werden die drei Pyrrolringe verbreitet als A-, B- und C-Ring bezeichnet (Abbildung 1-3).

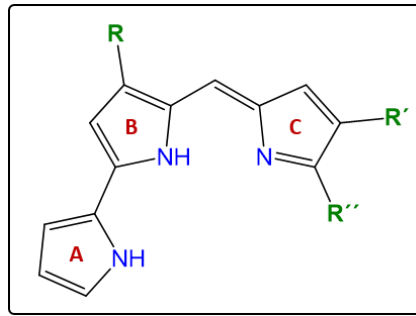


Abbildung 1-3: Tripyrrol-Grundstruktur der Prodiginine

Das Grundgerüst der Prodiginine besteht in einer Tripyrrolstruktur, deren drei Pyrrolringe verbreitet als A-, B- und C-Ring bezeichnet werden. Die Substituenten setzen an der 2- (R') und 3-Position (R) des C-Rings an und führen zur strukturellen Vielfalt der Prodiginine. In manchen Fällen kann sich auch die 4-Position des B-Rings unterscheiden.

Durch die Kondensation zweier Vorläufermoleküle ergeben sich im letzten Schritt der Prodigininbiosynthese schon auf natürlichem Weg verschiedene Varianten, wie zum Beispiel Undecylprodigiosin, Prodigiosin und Norprodigiosin (Williamson et al., 2006, 2005). Allgemein gibt es zwei strukturell unterschiedliche Gruppen von Prodigininen (Bennett & Bentley, 2000; Gerber, 1975). Die erste Gruppe, welche Prodigiosin und Undecylprodigiosin beinhaltet, besitzt nur lineare Alkylketten-Substituenten am C-Pyrrolring. Prodigiosin trägt etwa eine charakteristische 5 Kohlenstoffatome umfassende Kette an der C3-Position. Undecylprodigiosin zeichnet sich dagegen durch eine längere Alkylkette am C-Ring aus, welche 11 Kohlenstoffatome beinhaltet. Die zweite Gruppe umfasst dagegen zyklische Derivate, bei denen die Alkylketten des C-Rings zu weiteren Ringen geschlossen wurden (Williamson et al., 2006). Manche Bakterien wie *Streptomyces coelicolor* A3 produzieren auch eine Mixtur verschiedener Prodiginine, wie z.B. ein 2:1 Verhältnis von Undecylprodigiosin und dem zyklischen Butyl-Meta-Cycloheptylprodiginin (Grimont & Grimont, 1978; Tsao et al., 1985).

1.2.1.1 Prodigiosin

Prodigiosin stellt das namensgebende, prototypische Prodiginin dar, welches zuerst beschrieben wurde. Das bioaktive, rote Pigment wird in *Serratia marcescens* als Sekundärmetabolit gebildet, dessen zweigeteilter Biosyntheseweg durch ein 21 Gene umfassendes Gencluster kodiert wird (Abbildung 1-4, A) (Fürstner, 2003; Williams, 1973). Zusammen mit anderen Prodigininen erregt diese Substanz seit Jahren das wissenschaftliche Interesse aufgrund von u.a. immunsuppressiven, antitumoralen, antibiotischen sowie antiphytopathogenen Eigenschaften (Williamson et al., 2007, 2006). In den 1960er Jahren wurde die Tripyrrol-Struktur des Prodigiosins durch partielle und Totalsynthesen aufgeklärt (Rapoport & Holden, 1962; Wasserman et al., 1960; Williamson et al., 2006). Aufgrund ihrer Eigenschaften als Pigmente und bioaktive Verbindungen wurden Prodiginine schließlich als Modellprodukte zur Untersuchung der genetischen Eignung verschiedener *Serratia* und *Streptomyces* Stämme zur Produktion bakterieller Sekundärmetabolite genutzt (Williamson et al. 2006).

Das Pyrrolylpyrromethen-Gerüst von Prodigiosin wird durch die Kondensation von MBC (4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd) und MAP (2-Methyl-3-n-amylyl-pyrrol) gebildet (Williamson et al., 2005) (Abbildung 1-4, B). Die beiden Pyrrolringe des MBC bilden hier nach der gängigen Nomenklatur (Kapitel 1.2.1) den A- und B-Ring, während der C-Ring des Prodigiosin aus MAP hervorgeht (Darshan & Manonmani, 2015; Melvin et al., 2002). Der A-Ring ist derjenige, welcher abgesehen von der Verbindung zum B-Ring keine weiteren Substituenten besitzt. Dagegen trägt der B-Ring, neben der Verbindung zum MAP noch eine Methoxygruppe. MAP besitzt eine Methylgruppe an der 2- sowie eine C₅-Alkylkette an der 3-Position.

Die biotechnologische Produktion von Prodigiosin wurde bereits mit den nativen Produzenten wie *Serratia* Stämmen in diversen Studien untersucht, wobei größere Mengen Prodigiosin produziert werden konnten (Han et al., 2021; Stankovic et al., 2014). Auch heterolog ist eine Produktion in *Pseudomonas putida* durch die Expression des entsprechenden Genclusters aus *S. marcescens* gelungen (Cook et al., 2021; Domröse et al., 2017, 2015). Zudem können in Folgeschritten z.B. durch enzymatische Umsetzung, zusätzliche Ringschlüsse, etwa zu Cycloprodigiosin, erfolgen (de Rond et al., 2017).

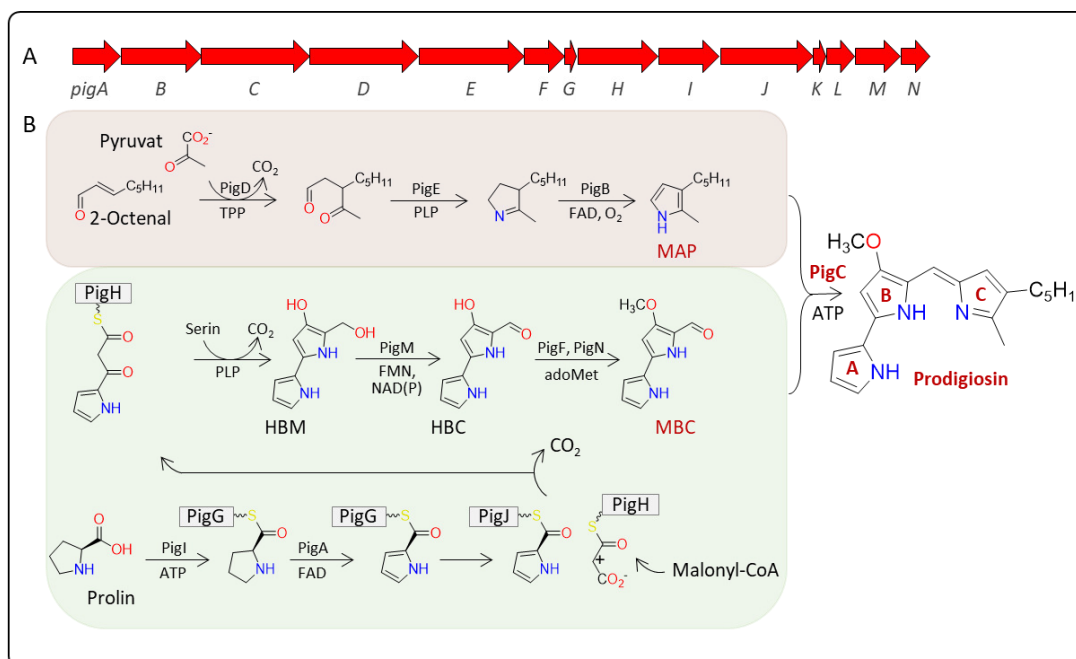


Abbildung 1-4: Schematische Abbildung des Prodigiosin-Genclusters und des durch dieses kodierten Biosynthesewegs
 (A) Schematische Abbildung des Prodigiosin-Genclusters (*pig*-Gencluster) aus *S. marcescens*, bestehend aus 14 unidirektional angeordneten Genen *pigA-pigN*, welches die an der Biosynthese von Prodigiosin beteiligten Enzyme PigA-PigN kodiert. (B) Der Prodigiosinbiosyntheseweg, welcher wiederum aus zwei getrennten Pfaden besteht (Williamson et al., 2006). Der obere, kürzere Pfad zeigt dabei die von 2-Octenal ausgehende Biosynthese des Intermediats 2-Methyl-3-n-amylyl-pyrrol (MAP). Der von Prolin ausgehende zweite Pfad, welcher vielschrittiger verläuft, beschreibt die Biosynthese des zweiten Intermediats 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd (MBC). Beide Intermediate werden anschließend durch PigC zu Prodigiosin kondensiert. In der gezeigten Struktur von Prodigiosin sind zudem die drei Pyrrolringe mit der allgemein gebräuchlichen Beschreibung als A-, B- und C-Ring beschriftet. Abkürzungen: HBC, 4-Hydroxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd; adoMET, S-Adenosylmethionin; ATP, Adenosintri-phosphat; FAD, Flavin-Adenin-Dinukleotid; TPP, Thiaminpyrophosphat; PLP, Pyridoxal-phosphat; FMN, Flavinmononukleotid; NAD(P), Nicotinamidadenindinukleotidphosphat. Angepasst nach (Williamson et al., 2006).

Die physiologische Funktion von Prodigininen in den produzierenden Organismen wird wie bei vielen anderen Sekundärmetaboliten weiterhin untersucht (Darshan & Manonmani, 2015; Williamson et al., 2006). Jedoch erscheint aufgrund der vielfach beschriebenen antibakteriellen Eigenschaft (Darshan & Manonmani, 2016) sowie der reduzierten Proteaseaktivität und Biofilmbildung (Yip et al., 2021) anderer Bakterien in Anwesenheit von Prodigiosin seine Rolle als Substanz zur Verteidigung des eigenen Habitats unstrittig. Eben diese Eigenschaften, welche noch durch die eingangs erwähnten immunsuppressiven und antitumoralen Charakteristika ergänzt werden, machen die Prodiginine zu einer sehr interessanten und vielversprechenden Klasse von Sekundärmetaboliten im Sinne der biotechnologischen und pharmakologischen Forschung.

1.2.1.2 Cycloprodigiosin

Cycloprodigiosin ist, wie der Name sagt, ein Vertreter der zyklischen Derivate der Prodiginine. In dieser Struktur ist die Alkylkette der 3-Position des C-Rings mit der 4-Position verbunden, wodurch ein neuer Hexanring mit einer Methylgruppe an Position C-2 entsteht (Williamson et al., 2006). Cycloprodigiosin wurde erstmals 1979 fast 20 Jahre nach der Strukturaufklärung des von *S. marcescens* gebildeten Prodigiosin aus *Pseudoalteromonas rubra*, einem marinen Bakterium, isoliert (Gerber & Gauthier, 1979; Hu et al., 2016). Neben diesem Bakterium wird Cycloprodigiosin auch von *Pseudoalteromonas denitrificans* (Kawauchi et al., 1997), *Beneckeia gazogenes* und *Zooshikella rubidus* bzw. *marina* produziert (Gerber, 1983; Lee et al., 2011; Ramaprasad et al., 2015). Natürlich produziertes Cycloprodigiosin aus *B. gazogenes* wurde dabei als erstes in größeren Mengen extrahiert und zur Bestätigung der Struktur mittels einer ¹³C-Analyse durch Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) genutzt (Gerber, 1983).

In *Pseudoalteromonas rubra* (DSM6842), wo die Biosynthese von Cycloprodigiosin bisher am detailliertesten untersucht ist, wird dabei Prodigiosin zu Cycloprodigiosin von der Zykklase Prub680 umgewandelt (Abbildung 1-5). Dieses Enzym kann am ehesten der Gruppe der membranintegrierten Di-Eisen-Oxygenasen (Pfam PF04116) zugeordnet werden (de Rond et al., 2017). Interessantweise verläuft die Zyklisierung der Seitenkette am Prodigiosin zu Cycloprodigiosin durch Prub680 analog zur Zyklisierung der Seitenkette am Undecylprodigiosin zu Streptorubin B. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass diese Reaktion durch RedG, einem Rieske Oxygenase ähnlichen Enzym aus *Streptomyces*, katalysiert wird, welches keine Sequenzidentität zu Prub680 aufweist (Sydor et al., 2011) (Abbildung 1-5).

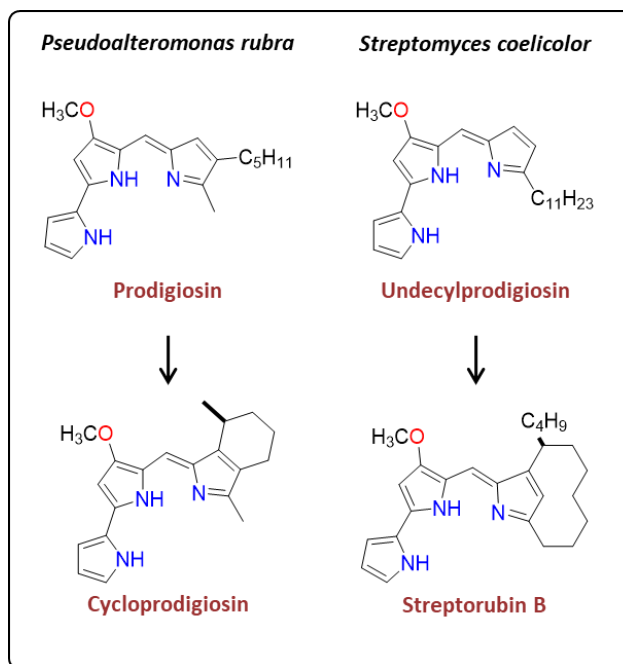


Abbildung 1-5: Strukturen der zyklischen Prodiginine Cycloprodigiosin und Streptorubin B

Die dargestellten Prodiginine werden in *P. rubra* und *S. coelicolor* biosynthetisch gebildet. In beiden Fällen wird das zyklische Derivat durch einen Ringschluss einer Alkylkette am C-Ring des Prodiginins erzeugt, welcher bereits am biosynthetischen Monopyrrol-Baustein vorhanden war.

Die evolutionäre Konvergenz, mit der sich beide Enzyme entwickelt haben, deutet auf einen hohen Selektionsdruck in Richtung zyklischer Prodiginine hin. Dies wiederum deutet darauf hin, dass zyklische Prodiginine möglicherweise eine erhöhte Wirksamkeit besitzen. Für Cycloprodigiosin im Vergleich mit Prodigiosin konnte eine erhöhte Wirksamkeit auch bereits nachgewiesen werden. Allerdings gilt dies nur hinsichtlich der antimikrobiellen Eigenschaften, während Prodigiosin eine höhere Wirksamkeit gegen humane Melanomzellen zeigt (Lee et al., 2011). Zudem zeigt Cycloprodigiosin eine höhere antiinflammatorische Wirkung als Prodigiosin, da es aufgrund seiner Struktur besser mit dem COX-2 Protein interagiert (Krishna et al., 2013). Dieses Protein wird vermehrt bei Entzündungsprozessen gebildet und die dabei auftretenden Symptome wie Schmerzen und Fieber können effektiv mit COX-2-Hemmern behandelt werden.

Allgemein wird in diesem Kontext deutlich, dass es weiterhin sinnvoll erscheint, die Möglichkeiten zur Produktion verschiedener Prodiginine zu verbessern. Insbesondere die biotechnologische Produktion von zyklischen Vertretern sollte dabei im Fokus stehen, da die chemische Synthese deutlich aufwendiger und ineffizienter ist als die biotechnologische Produktion in Mikroorganismen (Han et al., 2021; Hu et al., 2016). Während in der Literatur häufig die vielfältigen biologischen Aktivitäten der Prodiginine beschrieben werden, welche insbesondere für die Nahrungsmittel-, Kosmetik- und Pharma-Forschung interessant sind, wird bisher wenig auf die Produktion in Bakterien eingegangen, welche zur Herstellung für diese Industriezweige geeignet sind.

1.2.1.3 Norprodigiosin

Norprodigiosin gehört wie Prodigiosin zur Klasse der nicht-zyklischen Prodiginine und wird durch die Kondensation von HBC (4-Hydroxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd), der direkten biosynthetischen Vorstufe von MBC und MAP gebildet (Williamson et al., 2005). Dies resultiert in einer Struktur, welche dem Prodigiosin sehr ähnlich ist und nur durch eine Hydroxylgruppe, anstelle der im Prodigiosin vorhandenen Methoxygruppe am B-Ring, von diesem abweicht (Hearn et al., 1964). Norprodigiosin wurde erstmals 1969 in einem gezielt mutagenisierten *S. marcescens* Stamm identifiziert (*strain OF*), welcher ursprünglich von Williams, Gott and Green (1956) erzeugt wurde und durch einen orangen Phänotyp auffiel, welcher zuvor bereits im Kontext natürlicher Mutanten beschrieben wurde (Labrum & Bunting, 1953). In dieser Mutante konnte HBC im Kulturüberstand nachgewiesen werden, welches wiederum mit Diazomethan zu MBC methyliert werden konnte (Medina-Castro, 1969). Zudem konnte die orange Substanz durch Methylierung mit Diazomethan zu Prodigioisin umgewandelt werden (Hearn et al., 1964). Aufgrund des postulierten Biosynthesewegs von Prodigiosin wurde vermutet, dass daher die enzymatische Umwandlung von HBC zu MBC blockiert sei und somit Norprodigiosin gebildet würde. Im weiteren Verlauf konnte schließlich auch Norprodigiosin extrahiert, dessen Extinktionskoeffizient bestimmt und die Struktur durch NMR-Spektroskopie bestimmt werden (Medina-Castro, 1969). Die aufgestellte Hypothese, dass das Enzym zur Methylierung von HBC (PigF) in der *S. marcescens* Mutante *OF* durch die Mutagenese zerstört und so Norprodigiosin produziert wurde, konnte später bestätigt werden (Williamson et al., 2005) (Abbildung 1-6).

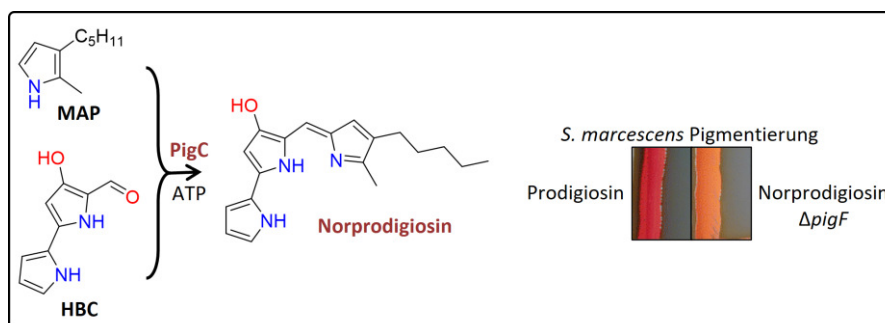


Abbildung 1-6: Bildung von Norprodigiosin in einer *Serratia marcescens* Mutante

Die Kondensationsreaktion von HBC und MAP führt zur Bildung von Norprodigiosin, wie sie bei einem Defekt oder einer Deletion des Gens *pigF* in *S. marcescens* auftritt. Die Phänotypen dieser Stämme, die Prodigiosin bzw. Norprodigiosin produzieren, sind ebenfalls dargestellt. Teile dieser Abbildung wurden übernommen von Williamson et al., 2005, lizenziert durch CCC, Lizenznummer: 5271301092320.

Viele der natürlich vorkommenden Prodiginine wurden schon bezüglich ihrer Bioaktivitäten untersucht (Darshan & Manonmani, 2015; Han et al., 2021; Williamson et al., 2005). Norprodigiosin bildet hier jedoch bisher eine Ausnahme. Ein Grund dafür könnte die schwierige Isolation des Norprodigiosins sein, welches auch aus Kulturen der *S. marcescens* Mutante *OF* problematisch zu gewinnen war. Ein Problem stellte dabei die große Menge des Lipopeptids Serratamolid dar, welches als weiteres Biosyntheseprodukt des Bakteriums vom produzierten Norprodigiosin getrennt werden musste.

Zudem wurde vermutet, dass Norprodigiosin aufgrund der reaktiven Hydroxylgruppe anfällig für oxidative Degradation ist (Medina-Castro, 1969). Abseits dieser Probleme scheint Norprodigiosin, auch aufgrund seiner starken strukturellen Ähnlichkeit zu Prodigiosin, ein spannendes Produkt im Kontext der dringend gesuchten bioaktiven Substanzen zu sein, weshalb es näher untersucht werden sollte. Das Problem der Serratamolidverunreinigung könnte dabei im Zuge einer heterologen Produktion verhindert werden, welche zudem die Produktion in einem für die Industrie nutzbaren Organismus ermöglichen würde.

1.2.1.4 Mutasythese zur Produktion neuartiger Prodiginine

Die Wirkungen von Sekundärmetaboliten sind aufgrund ihrer zum Teil Jahrtausenden andauernden Evolution mitunter sehr spezifisch gegen einzelne Angriffspunkte gerichtet (Eichner et al., 2012; Firn & Jones, 2003). Eine chemische Veränderung dieser Substanzen, im Sinne des pharmazeutischen Nutzens, kann in diesem Kontext vielfältige weitere Möglichkeiten bringen. Dabei bieten die Substanzen aufgrund ihrer allgemein hohen Komplexität diverse Ansatzpunkte, um etwa eine verbesserte Spezifität, effektive Wirkung gegen bestimmte Ziele, sowie eine bessere Wasserlöslichkeit oder Stabilität im Metabolismus zu erreichen. Neben der Suche nach neuen Naturstoffen und deren Bereitstellung ist die Erzeugung von Derivaten dieser Substanzen daher eine Notwendigkeit für medizinische Studien und eine der Herausforderungen bei der Naturstoffforschung.

Mit großen Fortschritten der organischen Chemie ab Mitte des 20. Jahrhunderts wurde die Mehrzahl der bioaktiven Verbindungen durch Totalsynthese bereitgestellt. Durch die Entwicklung immer neuer Reaktionen und die Entdeckung weiterer Katalysatoren können bis heute kontinuierlich neue und komplexe Strukturen chemisch synthetisiert werden (Mahoney et al., 2014). Ein Vorteil dabei ist, dass durch die Vielzahl einzelner Reaktionsschritte an diversen Punkten Einfluss auf das Endprodukt genommen werden kann. Jedoch sinkt mit zunehmender Anzahl der Reaktionsschritte auch die Ausbeute weshalb eine Totalsynthese häufig nicht sinnvoll ist (Eichner et al., 2012; Rinehart, 1977). Was in kleinem Maßstab und zu Forschungszwecken funktionell ist, macht diesen Ansatz für die kommerzielle Produktion der Substanzen häufig nicht anwendbar.

Mögliche Alternativen zur chemischen Produktion liegen in der Biosynthese und in der Kombination von Biosynthese und chemischen Prozessen, welche Synergien zwischen diesen beiden Herangehensweisen schaffen kann (Birch, 1963; Rinehart, 1977). Die älteste dieser Kombinationen ist die Semisynthese, welche in der chemischen Umsetzung isolierter Naturstoffe besteht. Die Semisynthese kommt somit grundsätzlich gänzlich ohne ein Verständnis der molekularbiologischen Syntheseprozesse aus. Diese Erkenntnisse wurden im nötigen Umfang erst mit der Möglichkeit der Sequenzierung (Shendure et al., 2017), sowie der Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) erlangt.

Auf Basis eines tieferen Verständnisses konnten schließlich Techniken wie die *precursor-directed biosynthesis* (PDB, vorläufergerichtete Biosynthese) und die *mutational biosynthesis* (MBS, Mutasynthese) entwickelt werden (Kirschning et al., 2007). Die PDB kann als Vorläufer der Mutasynthese angesehen werden. Bei dieser Technik wird der natürliche Biosyntheseweg eines Produktionsstammes genutzt, um durch Zugabe alternativer Vorläufermoleküle modifizierte Varianten des natürlichen Produktes zu erhalten. Dazu werden die synthetischen Vorläufer-Analoga, die durch chemische Synthese gewonnen werden, während der Biosynthese zum Produktionsstamm supplementiert (Abbildung 1-7, PDB). Diese werden dabei zum Teil statt der nativen Vorstufenmoleküle ins Endprodukt integriert und so ein Naturstoffderivat geschaffen (Weist & Süßmuth, 2005). So können unkompliziert und ohne genetische Manipulation Naturstoffderivate erzeugt werden. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass durch die Zugabe der synthetischen Analoga zwangsläufig ein Produktgemisch aus dem natürlichen Produkt und dem Derivat entsteht, weshalb die Ausbeute häufig gering ist. Zudem müssen folgend beide Substanzen, welche chemisch starke Ähnlichkeiten aufweisen, für eine weitere Verwendung mittels aufwendiger Trennverfahren separiert werden (Weissman, 2007). Das Verhältnis kann dabei durch eine vermehrte Zugabe des synthetischen Vorstufenmoleküls zwar häufig um einen gewissen Anteil zugunsten des Derivats verschoben werden, allerdings ist dies nur begrenzt möglich, da konzentrationsabhängige, toxische Eigenschaften der Verbindungen auftreten können (Kirschning et al., 2007). Als Beispiel für die Anwendung eines solchen Ansatzes, kann die erfolgreiche Mutasynthese neuartiger Aurachine dienen. So konnten drei bisher unbeschriebene, fluorinierte Aurachine in präparativen Mengen synthetisiert werden (Sester et al., 2020). Diese wurden im Anschluss strukturell charakterisiert und auf ihre antibiotische Wirkung im Vergleich zum natürlichen Produkt Ciprofloxacin hin untersucht. Zwar konnten keine neuen hochwirksamen Antibiotika erzeugt werden, dennoch zeigt dieses Beispiel das Potential dieses Ansatzes anhand der relativ unkomplizierten Produktion neuer Substanzen mit antibiotischer Wirkung (Sester et al., 2020; Winand et al., 2021).

Auf diesem System aufbauend und zur Reduktion der genannten Nachteile der PDB, wurde die Mutasynthese entwickelt. Auch bei dieser Methode werden synthetische Vorläufer-Analoga (sog. Mutasynthone) zugesetzt, allerdings wird die Bildung eines Stoffgemischs verhindert. Dazu wird der Produktionsstamm, dem die Mutasynthone supplementiert werden, genetisch so verändert, dass dessen Biosynthese an einem bestimmten Punkt unterbrochen ist. Durch diese Veränderung wird erreicht, dass der Produktionsstamm nicht mehr das natürliche Endprodukt bilden kann, aber die Enzym-Kaskaden zur Umsetzung des synthetischen Mutasynthons bereitstellt (Kennedy, 2008). Auf diese Weise wird die Konkurrenz des Mutasynthons mit dem natürlichen Vorläufer, wie es bei der PDB der Fall ist, verhindert, sodass die Ausbeute ggf. erhöht werden kann. Zudem wird die Bildung eines Stoffgemischs verhindert, welches aufwendig getrennt werden muss (Abbildung 1-7, MBS).

Durch den Umstand, dass für diese Methode ein grundlegendes Verständnis der Genetik sowie des Biosynthesewegs im Produktionswirt gegeben sein muss, wurde diese Methode erst in den 1990er-Jahren entwickelt und bildet somit die jüngste Methode, gezielt synthetische bioaktive Substanzen zu produzieren (Kirschning et al., 2007).

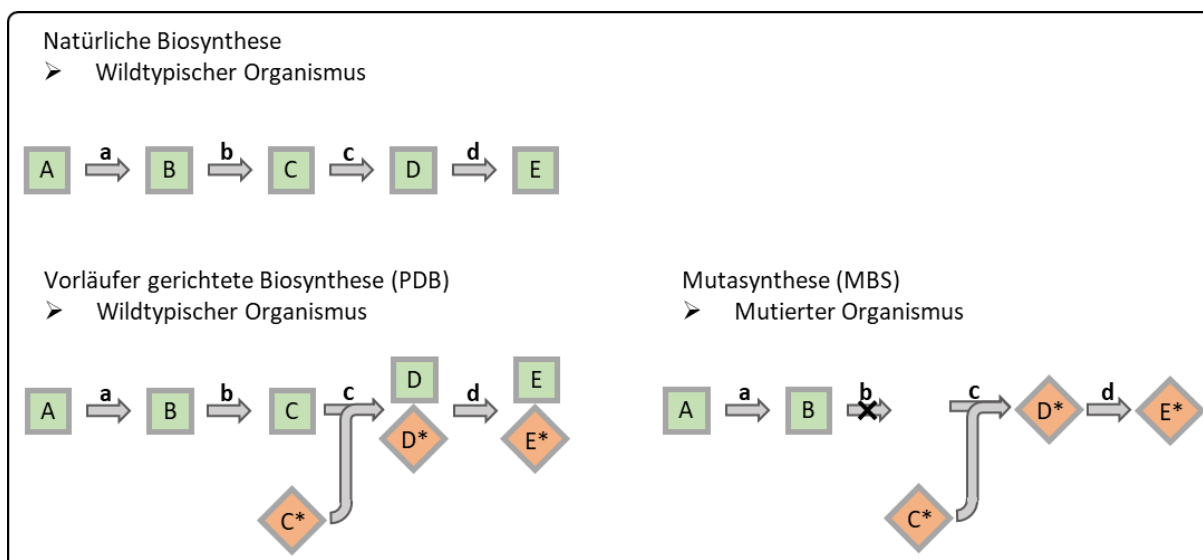


Abbildung 1-7: Flussschemata von Biosynthese und Derivategewinnung durch vorläufergerichtete Biosynthese oder Mutasynthese

In natürlichen Biosynthesewegen verläuft die Umwandlung der Substanzen typischerweise von einfachen hin zu komplexen Verbindungen. Bei der vorläufergerichteten Biosynthese wird dabei das natürlich vorkommende Set katalytischer Enzyme verwendet, jedoch ein alternativer Vorläufer zugesetzt, sodass auch dieser in den Biosyntheseweg eingeht. Aufgrund der Promiskuität der Enzyme kann dieser neben dem natürlichen Substrat zu einem alternativen Endprodukt umgesetzt werden. Bei der Mutasynthese wird aktiv in den Biosyntheseweg eingegriffen und dieser an einer bestimmten Stelle unterbrochen. Diese Situation wird zur Supplementierung von Mutasynthonen genutzt, sodass bei der folgenden Umwandlung nur das Mutasynthon als Enzymsubstrat zur Verfügung steht und daher im optimalen Fall kein Stoffgemisch natürlicher und alternativer Endprodukte entsteht, wie es bei der PDB der Fall ist. Modifiziert nach Kirschning et al., 2007.

Bei der genetischen Veränderung eines Stammes hin zu einem Mutasynthese-Stamm muss beachtet werden, dass keine essenziellen Biosynthesewege unterbrochen werden, weshalb sich insbesondere Gencluster von Sekundärmetaboliten zur Veränderung eignen. Die entsprechenden Synthesewege nutzen zwar Primärmetabolite als Ausgangssubstrate, sind jedoch nicht an deren Bildung beteiligt. Um Mutasynthone in einen natürlichen Biosyntheseweg implementieren zu können, muss zunächst die zelluläre Aufnahme des Mutasynthons möglich sein. Weiterhin ist essenziell, dass durch die Unterbrechung des nativen Biosynthesewegs keine toxischen Zwischenprodukte akkumulieren. Entscheidend ist außerdem, dass die Enzyme, welche die Reaktionen nach Supplementierung des synthetischen Vorläufers katalysieren, entsprechend promisk sind, um eine Akzeptanz des Mutasynthons zu gewährleisten (Kirschning & Hahn, 2012; Weissman, 2007; Weist & Süßmuth, 2005). Die Mutasynthese wurde bereits angewandt, um verschiedene zyklische und nicht zyklische Prodigiosinderivate zu produzieren (Klein et al., 2018, 2017). Dabei wurde der Stamm *P. putida* pig-r2 Δ pigD (Klein et al., 2017) verwendet, welcher aus einem heterolog Prodigiosin produzierenden Stamm erzeugt wurde (Domröse et al., 2015; Klein et al., 2017).

Hier wurde zunächst das gesamte Gencluster aus *S. marcescens* W838 in den heterologen Produktionswirt integriert und durch die Deletion eines Gens ein Teil des Biosynthesewegs unterbrochen (Abbildung 1-8). In diesem Fall wurde damit die Bildung des Monopyrrols MAP verhindert, da das Gen des ersten Enzyms des Biosynthesewegs, die 3-Acetyloctanal Synthase PigD (Williamson et al., 2006), teilweise deletiert wurde. Durch den zweigeteilten Prodigiosinbiosyntheseweg wurde der MBC-Biosyntheseweg dabei nicht beeinflusst, weshalb dieses weiterhin gebildet wurde. So konnte ein *P. putida*-Stamm speziell für die Mutasynthese erzeugt werden, welcher seitdem zur Gewinnung verschiedener neuartiger Prodiginine eingesetzt wird. Die verwendeten Mutasynthone stellen dabei chemisch synthetisierte, zyklische und nicht zyklische MAP-Derivate dar, welche zu den Kulturen des Stammes *P. putida* pig-r2 Δ pigD zugegeben wurden. Aus dem Medium wurden diese in die Zellen aufgenommen und durch die Kondensation mit dem intrazellulär gebildeten MBC, katalysiert durch die Ligase PigC, zu verschiedenen synthetischen Prodigininen umgesetzt (Klein et al., 2018, 2017).

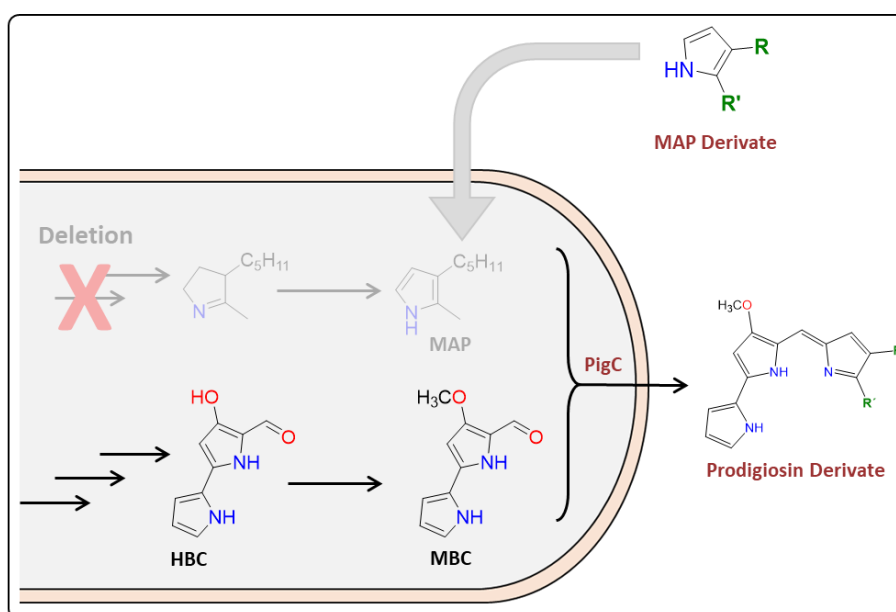


Abbildung 1-8: Mutasynthese am Beispiel eines Prodigiosinproduzenten mit partieller Deletion des MAP-Biosynthesewegs
Schematisch ist der Prodigiosinbiosyntheseweg dargestellt, in dem die MAP-Biosynthese durch eine Deletion des ersten Gens unterbrochen wurde. Aufgrund dieser Tatsache produziert der Stamm nur noch MBC und kann bei Zugabe von MAP-Derivaten zur Mutasynthese von Prodigiosinderivaten genutzt werden. Abbildung angepasst nach A. S. Klein et al. 2018.

Die gewonnenen Derivate erwiesen sich als ebenso bioaktiv wie der Naturstoff und zeigten insbesondere eine Autophagie-inhibierende und so Apoptose-induzierende Wirkung auf Brustkrebszelllinien (Klein et al., 2017). Eine Limitierung dieses Mutasyntheseansatzes stellten allerdings die Produktmengen dar. Während die Biosynthese zu Titern um 90 mg/l führte, konnten mittels Mutasynthese nur 0,6-3,1 mg/l bzw. maximal 19,8 mg/l Derivate gewonnen werden (Klein et al., 2018, 2017).

Dies könnte auf einen eingeschränkten Substrateintritt in die Zellen, eine geringere Aktivität von PigC gegenüber MAP-Analoga oder auch eine aufgrund der Deletion verringerte MBC-Synthese in den Zellen zurückzuführen sein. Die beiden erstgenannten Aspekte wurden bereits in Studien mit Zelllysaten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Limitationen auf das Substratspektrum von PigC zurückzuführen sind (Klein et al., 2017). Das Substratspektrum des kondensierenden Enzyms PigC konnte in einer weiteren Studie vertiefend aufgezeigt werden (Brass et al. 2019).

1.3 Heterologe Produktion von Sekundärmetaboliten

Bei der Produktion von Sekundärmetaboliten gibt es trotz aller Fortschritte im Bereich der Naturwissenschaften und Biotechnologie noch immer viele Herausforderungen. Um diese zu bewältigen, sind verschiedene Herangehensweisen möglich.

Nach der erfolgreichen Identifizierung biologisch aktiver Sekundärmetabolite können diese häufig nicht in ihrem natürlichen Wirt produziert werden, da viele Mikroorganismen sich nur schlecht oder gar nicht im Labor kultivieren lassen und geringe Ausbeuten liefern (Akondi & Lakshmi, 2013; Handelsman, 2004). In den 1990er-Jahren wurde davon ausgegangen, dass nur weniger als 1 % der Mikroorganismen im Labor kultivierbar sind (Amann et al., 1995). Trotz der großen Fortschritte der Mikrobiologie allgemein und auch bezüglich der Kultivierung von Bakterien konnte dies nicht signifikant verbessert werden (Austin, 2017; Bodor et al., 2020; Locey & Lennon, 2016). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die mikrobielle Vielfalt der Erde nach wie vor eine nahezu unergründete Quelle bioaktiver Substanzen bereitstellen kann (Cragg & Newman, 2013; Newman & Cragg, 2020, 2016). Bei den kultivierbaren Organismen kann es sich zudem um Pathogene handeln, welche aufgrund hoher Sicherheitsstandards in den meisten Fällen nicht für eine industrielle Produktion geeignet sind. Ein weiteres Problem ist, dass die natürlichen Wirte das gewünschte Produkt häufig nur in sehr geringen Mengen oder in Mixturen mit anderen Substanzen produzieren. Dabei beziehen sich diese Probleme nicht nur auf Sekundärmetabolite, sondern müssen bei allen Produkten, seien es Proteine oder andere Substanzen, die biotechnologisch hergestellt werden, bedacht werden. Um diese Probleme zu lösen, wird unter anderem die heterologe Produktion bereits seit den 1970er-Jahren angewandt (Backman & Ptashne, 1978).

Um die genannten Probleme der Produktion in nativen Wirten zu umgehen, wird heute zunehmend die einer Biosynthese zugrundeliegende genetische Information separat von ihrem Ursprungsorganismus betrachtet und genutzt. In diesem Zusammenhang wird etwa die Metagenomanalyse angewandt. Die Technik, die außerdem vielfach zur Analyse der Zusammensetzung mikrobieller Konsortien genutzt wird (Hiraoka et al., 2016; Paul et al., 2016), kann auch die Identifizierung von genetischer Information zu neuen Biosynthesewegen ermöglichen. Dabei werden einem Habitat Proben entnommen und die enthaltene DNA isoliert.

Diese wird anschließend sequenziert und im Hinblick auf Gene untersucht, welche die Proteine und Enzyme kodieren, die in Verbindung mit der Biosynthese einer gewünschten Substanz stehen können (Iqbal et al., 2016; Katz et al., 2016; Kim et al., 2010). Im Fall der Suche nach bioaktiven Sekundärmetaboliten wird dabei meist nach großen Biosyntheseegenclustern (BGCs) gesucht (Kenshole et al., 2021; Owen et al., 2013). Das Problem an diesem Ansatz wiederum ist, dass nur nach bekannten und diesen ähnlichen BGCs gesucht werden kann und gänzlich unbekannte Sequenzen nicht ohne Weiteres identifiziert werden. Die Speicherung der Sequenzen in Datenbanken stellt hier einen Schlüssel dar, welcher es ermöglicht, auch Jahre später und mit neuen Erkenntnissen die Sequenzdaten zu durchsuchen (*genome mining*) und so möglicherweise neue Biosynthesewege zu identifizieren (Bachmann et al., 2014; Medema et al., 2011a; Ziemert et al., 2016).

Nachdem ein vielversprechendes Gencluster identifiziert wurde, muss dieses, falls der natürliche Wirt nicht kultivierbar oder aus anderen Gründen nicht zur Produktion verwendbar ist, in einen heterologen Expressionswirt übertragen werden. Viele BGCs sind jedoch mit bis zu über 100 Kb sehr lang, was zu Komplikationen bei der Klonierung führen kann (Schwecke et al., 1995). Eine herkömmliche Klonierung auf Basis von Restriktion und Ligation ist meist aufgrund fehlender singulärer Endonukleaseschnittstellen von vornherein auszuschließen, da dies entweder unmöglich oder mit hohem Aufwand verbunden ist. Moderne Klonierungsmethoden, wie die auf homologer Rekombination basierende Klonierung in Hefe (Ma et al. 1987) oder andere Restriktionsendonuklease-unabhängige Klonierungsmethoden wie Gibson-Assembly® (Gibson et al., 2008) oder In-Fusion® Cloning (Clontech), können diese Probleme aber lösen (Park et al., 2015). Auch für diese Methoden muss jedoch die DNA der BGCs entweder als isolierte genomische DNA oder Metagenomprobe (*environmental DNA* bzw. eDNA) vorliegen. Um die enthaltenen Gene, falls nur wenige Gene benötigt werden, zu amplifizieren, bietet sich die Polymerasekettenreaktion an. Falls dagegen sehr große Bereiche (über 20 Kb) kloniert werden sollen, kann dies mit Hilfe der transformationsassoziierten Rekombination (*transformation-associated recombination* (TAR)) realisiert werden, bei der die native DNA der Metagenomprobe eingesetzt wird (Kouprina & Larionov, 2006). Aufgrund der stark gesunkenen Kosten für DNA-Synthesen ist es mittlerweile aber auch kostengünstig möglich, die entsprechenden DNA-Fragmente, basierend auf den Sequenzdaten solcher BGCs, synthetisch erzeugen zu lassen (Brieke et al., 2015). Es ist zudem möglich, Biosynthesewege *de novo* aus verschiedenen Organismen, welche auf Basis bioinformatischer Daten erstellt wurden, zu erzeugen, um darauf aufbauend völlig neue Substanzen biotechnologisch herstellen zu können (Gibson, 2014; Medema et al., 2012, 2011b).

Zur Herstellung von Produktionsstämmen müssen die biosynthetischen Gene oder Gencluster schließlich in einen geeigneten Produktionswirt übertragen werden. Dazu wird die betreffende DNA meist in ein Plasmid kloniert, welches die einfache Übertragung durch chemische Transformation, Elektroporation oder Konjugation in den Zielwirt ermöglicht.

Insbesondere die Konjugation bietet sich bei großen Genclustern an, da die erzeugten Plasmide selbst mit kleinen Genclustern wie dem Viocellin-Gencluster (*vio*-Gencluster) häufig Größen von deutlich über 10 Kb aufweisen (Domröse et al., 2017). Diese Methode bietet verschiedene Vorteile, da die zu transformierenden Rezipienten-Zellen nicht durch chemische Substanzen oder elektrische Spannung negativ beeinflusst werden. Zudem ist die Größe des zu übertragenden Plasmids nicht limitiert und es lassen sich viele verschiedene Gram-negative sowie auch Gram-positive bakterielle Wirte adressieren, da es sich um einen natürlichen Prozess handelt, welcher horizontalen Gentransfer ermöglicht (Brigulla & Wackernagel, 2010; Grohmann et al., 2003; Thomas & Nielsen, 2005).

Nach erfolgreicher Übertragung der rekombinanten DNA in einen heterologen Wirt muss gewährleistet sein, dass die übertragenen Gene repliziert und transkribiert werden. Beides kann durch eine Integration der Gene ins Genom erreicht werden. Dies hat den Vorteil, dass keine Antibiotika benötigt werden, um durch dauerhaften Selektionsdruck das Plasmid im Organismus stabil zu halten. Dabei entfällt sowohl die Replikation des Plasmids als auch die Notwendigkeit, die am entsprechenden Resistenzmechanismus beteiligten Enzyme zu exprimieren, was Stress und Energieverbrauch im Wirtsorganismus bedeuten und dazu führen kann, dass die Ausbeute der zu produzierenden Substanz verringert wird (Mairhofer et al., 2013; Tyo et al., 2009). Um eine Integration von Genen in das Genom des heterologen Wirts zu erreichen, stehen wiederum verschiedene Methoden zur Wahl. Eine natürliche Methode ist die homologe Rekombination (Wyman et al., 2004), welche jedoch vergleichsweise ineffizient ist (Fu et al., 2008). Aus diesem Grund gibt es inzwischen verschiedene Verbesserungen, die zwar auch auf dem Prinzip der homologen Rekombination beruhen, jedoch durch verschiedene zusätzlich eingebrachte genetische Elemente zur Selektion bzw. Gegenselektion eine deutlich höhere Effizienz erreichen (Martínez-García & de Lorenzo, 2011; Reyrat et al., 1998).

Eine weitere Methode ist die Transposition, welche in verschiedenen Varianten genutzt werden kann, um DNA-Sequenzen sowohl gerichtet als auch ungerichtet, sehr effizient zu integrieren. Beide Methoden bieten je nach Anwendung Vor- bzw. Nachteile. Eine gerichtete Insertion von DNA-Sequenzen lässt sich unkompliziert mit Hilfe des Tn7-Transposons realisieren, welches immer in die, meist nur einmal im bakteriellen Genom vorliegende, *attachment Tn7* (*attTn7*) Sequenz integriert. Das Transposon besteht in seiner gebräuchlichen Form aus den jeweils außen gelegenen *outer ends* (*OEs*), einer Integron Kasette und der durch vier Gene (*tnsA-D*, 6165 Kb) kodierten Transposase. Die *OEs* umfassen 150 Bp (Tn7-L) und 90 Bp (Tn7-R).

Da die Transposase hier von mehreren Genen kodiert wird, von denen das endständig liegende *tnsA* auch die Sequenz des *OEs* beinhaltet, ist das Konstrukt, welches zur gezielten Integration benötigt wird, relativ groß. Diese Größe bedeutet jedoch auch Sequenzspezifität, wodurch eine gezielte Integration am *attTn7* Locus erst möglich ist (Arciszewska et al., 1989; Choi et al., 2005; Peters & Craig, 2001; Tiso et al., 2020).

Um effektiv das gesamte Genom bezüglich eines geeigneten Integrationsortes zur Genclusterexpression zu durchmustern, kann z.B. das ungerichtet transponierende Tn5-Transposon genutzt werden, welches schon vielfach Anwendung fand (de Lorenzo et al., 1990; Domröse et al., 2015; Nazareno et al., 2021; Reznikoff, 2008, 1993). Im Tn5-Transposon ist die Transposase dabei durch nur ein Gen kodiert, welches 1400 Bp lang ist. Aufgrund dieser geringen Größe des Transposasegens, wird der verwendete Vektor also nicht wesentlich vergrößert. Zudem sind die das Transposon äußerlich begrenzenden *OEs* jeweils nur 19 Bp lang (Goryshin & Reznikoff, 1998). Die Zielsequenz des Tn5-Transposon ist eine variable, tendenziell GC-reiche 9 Bp lange Sequenz, die dementsprechend häufig vorhanden ist, wodurch diese Variante sich gut für eine ungerichtete stabile Integration, sowie auch für den Einsatz in verschiedenen Wirten eignet (de Lorenzo et al., 1990; Green et al., 2012; Reznikoff, 2008; Schulz & Reznikoff, 1991; Steiniger et al., 2006).

Konnte schließlich ein vielversprechendes Gencluster identifiziert und in einen Transfervektor mit einem passenden genomischen Integrationsmechanismus kloniert werden, muss zudem ein geeigneter heterologer Expressionswirt gewählt werden. Diese Auswahl kann von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der heterologen Expression sein, weshalb dabei dessen Eignung bezüglich der Transkription, Translation, aber auch der Biosynthese und ggf. Resistenz gegenüber der zu produzierenden Substanz berücksichtigt werden sollte. Die effektive Umsetzung all dieser Schritte muss dabei ausnahmslos gewährleistet sein, da eine heterologe Produktion sonst nicht möglich ist (Zhang et al., 2008). Im ersten Schritt muss dabei die Transkription der eingebrachten Gene erfolgen, was bedeutet, dass die nativen Promotoren der fremden Gene von der wirtseigenen RNA-Polymerase erkannt werden müssen (Stevens et al., 2013). Ist dies nicht der Fall, müssen entweder die Promotoren angepasst (Galm & Shen, 2006), alternative Promotor/RNA-Polymerase-Systeme gewählt oder ein anderer Wirt verwendet werden. Als alternatives Promotor/RNA-Polymerase-System wird häufig die T7-RNA-Polymerase zusammen mit dem spezifischen T7-Promotor verwendet. Dieses System, welches aus dem Bakteriophagen T7 stammt und seit den 1980er-Jahren Anwendung findet (Tabor & Richardson, 1985; Wang et al., 2018), hat den Vorteil, dass die meisten bakteriellen Terminatoren ignoriert werden und so eine Transkription der gesamten eingebrachten DNA gewährleistet werden kann. Ein Nachteil kann jedoch die sehr hohe Transkriptionsgeschwindigkeit der T7-RNA-Polymerase sein, was zu einer starken Überexpression und der Bildung von Proteineinschlusskörperchen und möglicherweise inaktiven Proteinaggregaten führen kann.

Wurde ein geeignetes System zur Transkription gewählt, ist die Translation der Proteine der nächste essenzielle Schritt. Dabei spielt die Anzahl der *transfer* RNAs (tRNA) und die Codonverwendung des Organismus eine entscheidende Rolle, welche idealerweise im heterologen Wirt ähnlich wie im nativen Organismus sein sollte (Bernaudat et al., 2011). Ist dies nicht der Fall, kann die DNA-Sequenz jedoch auch der Codonverwendung des heterologen Wirts angepasst werden.

Dazu kann die Sequenz unter Zuhilfenahme bioinformatischer Methoden passend zur Codonverwendung des Zielwirts optimiert werden (Chung & Lee, 2012; Fuglsang, 2003; Menzella, 2011). Dies bedeutet jedoch die Vollsynthese der gesamten zu integrierenden DNA-Sequenz vor der Klonierung des Integrationsvektors und somit entsprechende Kosten. Hierbei besteht mittlerweile die Möglichkeit der Codonharmonisierung, welche die Verteilung der Codons für häufige und seltene tRNAs im natürlichen Wirt berücksichtigt und diese auf den heterologen Wirt anwendet. Diese Methode kann gegebenenfalls zielführender sein als eine reine Optimierung hin zu den Codons mit den häufigsten tRNAs, da so die natürliche Translationsgeschwindigkeit besser imitiert und möglicherweise eine stärkerer Expression funktionaler Proteine gewährleistet werden kann (Angov, 2011; Mignon et al., 2018).

Grundsätzlich muss im gewählten heterologen Produktionswirt weiterhin das Vorhandensein der benötigten Vorstufen zur Biosynthese des Sekundärmetaboliten gewährleistet sein (Huo et al., 2019; Jiang et al., 2010; Zhang et al., 2008). Um dies möglichst einfach zu erreichen, kann versucht werden, einen heterologen Wirt zu wählen, welcher möglichst nah verwandt mit dem nativen Wirt ist und möglicherweise aus der gleichen Klasse von Bakterien stammt, wobei auch so nicht zwangsläufig eine Kompatibilität gegeben ist (Zhang et al., 2017). Ein weiterer essenzieller Punkt besteht darin, dass die zu produzierenden Sekundärmetabolite keine toxischen Effekte auf den Produktionswirt haben sollten. Dies ist jedoch gerade bei der Produktion von bioaktiven Substanzen nicht selbstverständlich, insbesondere wenn diese auch antibiotische Eigenschaften besitzen. Zudem sollte die Toleranz des heterologen Expressionswirts durch Ausschleusen oder einen anderen nicht degradierenden Prozess zustande kommen, um das Produkt in seiner natürlichen Form zu erhalten. Aufgrund aller genannten Herausforderungen ist die heterologe Expression und Produktion nach wie vor in vielen Fällen nicht trivial umzusetzen (Ongley et al., 2013). Nach der Feststellung der Eignung eines Wirts zur Produktion einer bestimmten Verbindung, kann dies der Ausgangspunkt für vertiefende Studien und möglicherweise erste Produktionsstämme sein.

1.3.1 *Pseudomonas putida* als robuster und vielseitiger heterologer Produktionswirt

Pseudomonas putida ist ein stäbchenförmiges, Gram-negatives Bodenbakterium, welches in der Natur verschiedenste und zum Teil auch extreme Habitate besetzt. So gehören z.B. stark mit Chemikalien kontaminierte Böden zu dessen Lebensraum (Eltoukhy et al., 2020; Raghavan & Vivekanandan, 1999).

Die Fähigkeit, dort zu überleben, verdankt es seiner natürlichen Resistenz gegen die verschiedensten Substanzen, welche meist effektiv aus der Zelle geschleust oder verstoffwechselt werden (Akkaya et al., 2018; Fernández et al., 2012, 2009; Roca et al., 2008). Neben dieser Eigenschaft hat *P. putida* eine ähnliche Teilungsrate wie *Escherichia coli*, kann dabei jedoch ein breiteres Spektrum an Kohlenstoff- und Stickstoffquellen nutzen (Timmis, 2002). Der intrinsische Metabolismus bietet zudem vielfältige Möglichkeiten zur heterologen Produktion (Abbildung 1-9) (Loeschcke & Thies, 2015).

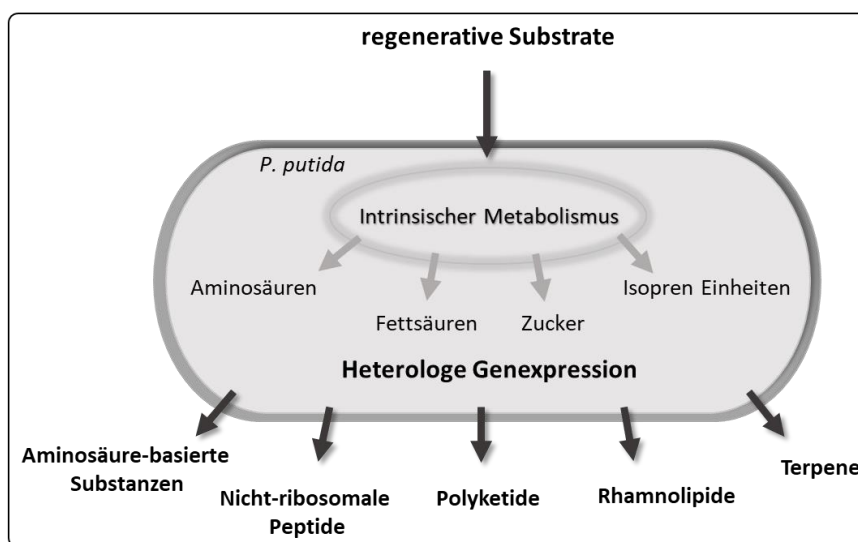


Abbildung 1-9: Biosynthetische Produktion diverser Naturstoffe durch heterologe Genexpression in *P. putida*

Der breit aufgestellte intrinsische Metabolismus von *P. putida* bietet vielfältige Möglichkeiten zur Produktion einer großen Anzahl verschiedener Substanzen durch heterologe Genexpression. Zudem ist *P. putida* sehr robust hinsichtlich verschiedener Xenobiotika, weshalb es sich gut zur Produktion dieser auf Basis regenerativer Substrate eignet. Modifiziert nach Loeschcke & Thies, 2015.

Das Bakterium ist dabei genetisch gut zugänglich und kann mit einer Vielzahl an genetischen Methoden zielgerichtet verändert werden (Bagdasarian et al., 1981). Das Genom wurde vor fast 20 Jahren sequenziert (Nelson et al., 2002) und die Funktion der meisten Gene ist aufgeklärt (Nogales et al., 2020; Ramos-Díaz & Ramos, 1998; Winsor et al., 2016). Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *P. putida* KT2440 besitzt zudem den HV1-Status (*host-vector (HV) system safety level 1*), was das Arbeiten mit diesem Stamm im Kontext der Laborsicherheit stark vereinfacht. Das bedeutet, dass der Stamm, genau wie *E. coli* K12, von der *US Food and Drug Administration* (FDA) als sicher zum Arbeiten in Laboratorien der biologischen Schutzstufe der Risikogruppe 1 eingestuft wurde. Diese Eigenschaften machen *P. putida* zu einem vielversprechenden Wirt für die heterologe Produktion bioaktiver oder toxischer natürlicher Substanzen, weshalb er in den letzten Jahren zunehmend Aufmerksamkeit auf sich zog (Domröse et al., 2017; Klein et al., 2017; Loeschcke & Thies, 2020; Martínez-García et al., 2014). *P. putida* wird dabei bereits vielfach zur Produktion von Rhamnolipiden (Tiso et al., 2020), Terpenoiden (Loeschcke et al., 2013; Mi et al., 2014), Polyketiden und nicht-ribosomalen Peptiden (Cook et al., 2021; Domröse et al., 2017; Loeschcke et al., 2013) und anderer aminosäurebasierter Substanzen genutzt (Loeschcke & Thies, 2020, 2015; Weimer et al., 2020).

1.4 Das Transfer- und Expressions-System

Das *transfer- and expression-system* (Transfer- und Expressions-System; kurz TREX-System), dient der heterologen Expression von Genclustern in verschiedenen Expressionswirten. Es wurde in der Arbeitsgruppe Drepper des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (IMET, HHUD) entwickelt und konnte schon mehrfach erfolgreich angewandt werden (Loeschcke et al., 2013). Die Hauptfunktion dieses Systems besteht darin, in kurzer Zeit verschiedene Expressionswirte auf deren Fähigkeit zur funktionellen Expression der eingebrachten Gencluster zu untersuchen. Zur Anwendung kommt dabei die Tn5-Transposition, welche es erlaubt, dass im klonierten rekombinanten Transposon vorhandene Gencluster an einem zufälligen Locus im Genom des heterologen Wirtsorganismus zu integrieren. Mit dieser Methodik kann aus der Menge der erhaltenen Klone ein geeigneter Produktionsstamm ausgewählt werden. Dieses Vorgehen ist zeit- und kosteneffizient und trotz der eigentlichen Konzeption des Systems zum Screening auch zur Erzeugung von Produktionsstämmen geeignet. Die Anwendung des Systems erfolgt dabei in vier Schritten. Dazu wird (I) das zu transferierende Gencluster mit den TREX-Kassetten in einen Vektor kloniert, (II) der erzeugte Vektor durch Konjugation in den Zielwirt übertragen, in welchem dann (III) die Transposition des Genclusters erfolgt. Schließlich erfolgt (IV) die Transkription. Sollte die Expression des Genclusters dabei nicht durch intrinsische Promotoren möglich sein, kann die Transkription der Gene auch durch die in den TREX-Kassetten enthaltenen und zum Gencluster orientierten T7-Promotoren (P_{T7}) initiiert werden, welche nicht von bakteriellen Terminatoren gestoppt werden (McAllister et al., 1981). So konnten die Prodigiosinbiosynthesegene aus *S. marcescens* erstmals in *P. putida* zur Expression gebracht werden (Loeschcke 2013). Das System wurde wie im Folgenden erläutert weiterentwickelt.

1.4.1 Limitierungen des TREX-Systems – Weiterentwicklung zum γ TREX-System

Das TREX-System wies einige Limitierungen auf, welche vor allem die Integration eines Genclusters in den TREX-Vektor betreffen. Die genutzten Gencluster sind meist mehrere tausend Basenpaare groß, was die Möglichkeiten der Verwendung klassischer Klonierungsmethoden aufgrund fehlender singulärer Restriktionsschnittstellen, stark einschränkt. Diese sind bei der klassischen Klonierung jedoch zur Unterteilung großer Gencluster notwendig, um die DNA in mehreren Schritten durch Restriktion und Ligation klonieren zu können.

Um dieses Problem zu lösen, wurde im Rahmen der Dissertation von Andreas Domröse das γ TREX-System entwickelt (Domröse, 2016; Domröse et al., 2017). Hier wurden alle genetischen Komponenten, welche die Funktion des Systems gewährleisten, in einen *shuttle*-Vektor kloniert, welcher neben *E. coli* auch Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* zur Replikation des γ TREX-Vektors befähigt. In diesem neuen Vektor konnte nun die homologe Rekombination in Hefe zur Klonierung genutzt werden.

Bei dieser Methode werden Hefezellen mit zwei oder mehreren Fragmenten mit zueinander homologen Enden transformiert, welche dann in einem Schritt zu einem Plasmid assembliert werden. Dies macht die Klonierungen unabhängig von Problemen, die bei der Klonierung durch Restriktion und Ligation auftreten können (Ma et al., 1987; Oldenburg, 1997; Van Leeuwen et al., 2015).

Mit dem γ TREX-System wurden bereits Prodigiosin, Violacein und Phenazine durch Expression der entsprechenden Gencluster aus *S. marcescens*, *Chromobacterium violaceum*, bzw. *Pseudomonas aeruginosa* in *P. putida* produziert (Domröse et al., 2017) sowie Teile des Physostigminbiosynthesewegs aus *Streptomyces griseofuscus* exprimiert (Gätgens 2020). Weiter wurde im Zuge der γ TREX-Anwendung das erste Mal eine β -Galactosidase als Transkriptionsreporter in diesem System eingesetzt. Die Expression des Enzyms kann in gängigen Assays evaluiert werden und ist bereits als Indikator der Transkription in *P. putida* etabliert (de Lorenzo et al., 1993; Domínguez-Cuevas et al., 2006; Kessler et al., 1992). Das *lacZ*-Gen, welches die β -Galactosidase kodiert, wurde dazu promotorlos, in Leserichtung, hinter das Genclusters kloniert. Somit zeigte die Funktion des Reporters auch die Transkription des Genclusters an. Nach einer randomisierten, genomischen Integration konnte so in den vielen erhaltenen Klonen unmittelbar ausgelesen werden, bei welchen zufälligerweise eine Expression der Zielgene durch einen chromosomalen Promotor erfolgte. Zwar kann aufgrund der Reporteraktivität noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die exprimierenden Klone tatsächlich das gewünschte Produkt bilden, allerdings wird der anschließende Screening-Aufwand nach der Produktbildung durch diese Vorauswahl erheblich reduziert (Domröse et al., 2017).

Die γ TREX-Kassetten stellen die essenziellen Bestandteile des Systems dar, da sie alle genetischen Elemente zur Anwendung beinhalten. Ihre Optimierung im Vergleich zum TREX-System bezieht sich dabei auf die Anzahl der im Zuge der Transposition übertragenen, genetischen Elemente, welche reduziert wurden, um das Transposon zu verkleinern (Abbildung 1-10). Die Benennung der Kassetten mit den Suffixen L- und R- erfolgte in Anlehnung an die graphische Darstellung im Sinne der linken und rechten Genkassette (oder auch *left/right cassette*), bezogen auf ein Zielgencluster, das zwischen diesen eingefügt wird. Die γ TREX-L-Kassette beinhaltet ein *mob*-Gen und den *origin of transfer* (*oriT*) (Simon et al., 1983). Dieser ermöglicht dabei den Transfer des Plasmids von *E. coli* zu einem weiten Wirtsspektrum. Zusätzlich befinden sich im γ TREX-System nur noch eines der *OEs* und der zum Gencluster gerichtete P_{T7} . Die γ TREX-R-Kassette umfasst den zum Gencluster gerichteten P_{T7} , sowie ein Tetracyclinresistenzgen, als Selektionsmarker einer erfolgten Transposition, vor dem das Transposon rückseitig begrenzenden *OE*. Das Tn5-Transposasegen liegt beim γ TREX-System außerhalb der *OEs*, um die Größe des Transposons weiter zu reduzieren und eine erneute Transposition auszuschließen. Die Größe der beiden γ TREX-Kassetten konnte so auf 1,4 Kb (γ TREX-L) und 3,0 Kb (γ TREX-R) reduziert werden.

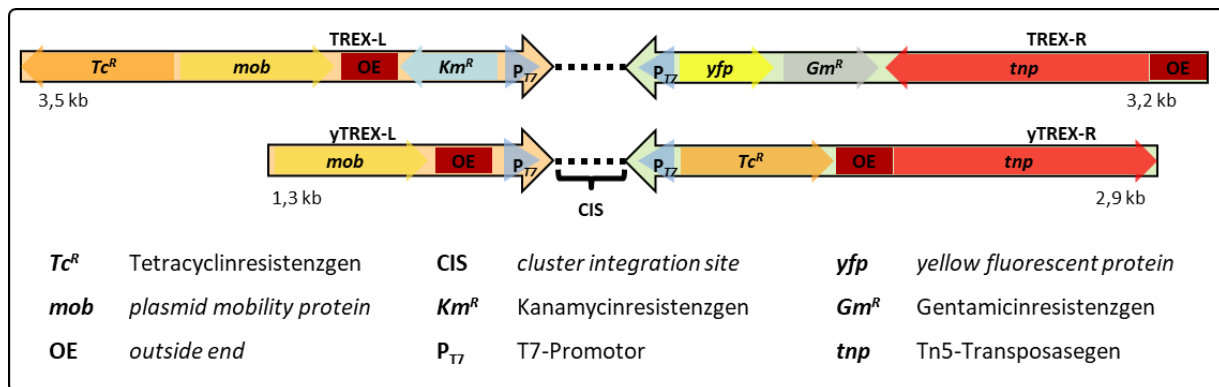


Abbildung 1-10: Vergleich des Aufbaus der TREX- und der yTRES-Kassetten

Oben werden die ursprünglichen TREX-Kassetten gezeigt, mit denen neben dem zu integrierenden Gencluster auch ein Kanamycinresistenzgen (*Km^R*), die kodierende Sequenz zur Expression eines gelb fluoreszierenden Proteins (*yfp*), sowie ein Gentamicinresistenzgen (*Gm^R*) und das Gen der Tn5-Transposase, in das Wirtsgenom integriert werden. Der Bereich, der das *plasmid mobilisation protein* kodiert (*mob*) in dessen Promotorsequenz der *origin of transfer* (*oriT*) liegt, sowie das Tetracyclinresistenzgen (*Tc^R*) des Vektors gehen bei Anwendung verloren, da sie nicht innerhalb der *outer ends* (*OE*) liegen. Im Vergleich dazu wurde die Anzahl der Gene, die die *cluster integration site* (*CIS*) in den yTRES-Kassetten umschließen, deutlich reduziert. In diesem System liegen zwischen den *OE* nur noch die zu integrierenden und zu exprimierenden Ziel-Gene, sowie ein Tetracyclinresistenzgen zur Selektion von transposontragenden Zellen. Sowohl der Bereich des *oriT* als auch das Transposasegen, gehen bei der Transposition verloren. Modifiziert nach (Domröse, 2016).

Um die Möglichkeit zu schaffen, die Klonierungsarbeiten mit Hilfe der homologen Rekombination in Hefe durchzuführen, wurden die beiden oben genannten yTRES-Kassetten in einen YCp50-poly Hefe shuttle-Vektor (Wang & Stillman, 1993) kloniert. Dieser Vektor trägt den *E. coli* spezifischen *ori* des Plasmids pMB1, eine *S. cerevisiae* Replikationseinheit bestehend aus dem Centromer des IV Chromosoms (*CEN4*) und der autonom replizierenden Sequenz (*ARS1*), sowie einem Selektionsmarker für *E. coli* und einem Auxotrophiemarker für *S. cerevisiae*. Diese genetischen Elemente ermöglichen die direkte Anwendung der yTRES-Plasmide in vielen Wirten, da die Vektoren nur in *E. coli* sowie *S. cerevisiae* replizierbar sind. *S. cerevisiae* wird dabei ausschließlich zur Klonierung der yTRES-Plasmide mittels homologer Rekombination verwendet, während *E. coli* zur Amplifikation des Vektors, sowie zur Übertragung der fertigen Vektoren *via* Konjugation genutzt werden kann (Andreas Domröse 2016). Aufgrund der Fähigkeit zur Replikation der yTRES-Vektoren scheidet *E. coli* damit jedoch als Wirt zur Anwendung des Systems aus, da zusätzlich zur genomischen Integration das Plasmid erhalten bleiben würde.

Die Anwendung des Systems erfolgt analog wie beim TREX-System in mehreren Schritten (Abbildung 1-11). Im ersten Schritt wird ein Gencluster mit den yTRES-Kassetten markiert. Dazu wird hier der yTRES-Vektor an der, zwischen den beiden Kassetten liegenden, I-SceI-Restriktionsschnittstelle linearisiert. Diese *homing*-Endonuklease, welche durch ein Intron der mitochondrialen DNA in *S. cerevisiae* kodiert wird, bietet wie alle *homing*-Endonuklease den Vorteil einer sehr langen Erkennungssequenz (18 Bp), weshalb das zufällige, natürliche Auftreten dieser Sequenz auch in langen DNA-Sequenzen nahezu ausgeschlossen werden kann (Monteilhet et al., 1990). Nach der Linearisierung des Vektors erfolgt die Integration der Zielgene oder eines Genclusters.

Dies kann durch homologe Rekombination nach dem PCR-vermittelte Anhängen homologer Überhänge zueinander bzw. zu den freien Enden des γ TREX-Vektors erfolgen. Vorteilhaft ist dabei die Fähigkeit von *S. cerevisiae*, bereits bei relativ kurzen Überhängen von nur 30 Bp homologe Rekombination durchführen zu können (Gibson et al., 2008; Van Leeuwen et al., 2015). Die eigentliche Klonierung erfolgt dabei nach der Transformation von auxotrophen *S. cerevisiae*-Zellen (etwa mit dem Stamm VL6-48, welcher uraciluxotroph ist), mit dem linearisierten γ TREX-Vektor und den Fragmenten des zu integrierenden Genclusters. Auf Nährmedien-Platten ohne Uracil können nach der Transformation schließlich diejenigen Zellen selektiv kultiviert werden, in denen ein γ TREX-Vektor vorliegt, da dieser das Gen der Orotidine 5'-Phosphat Decarboxylase trägt, welches die Zellen zur Uracilsynthese befähigt (Abbildung 1-11, A).

Die Plasmide können schließlich zur genomischen Integration in Zielstämme verwendet werden. Dazu kann im zweiten Schritt der γ TREX-Anwendung ein konjugationsfähiger *E. coli* Stamm mit dem γ TREX-Plasmid transformiert und dieses durch Konjugation in den heterologen Expressionswirt übertragen werden (Abbildung 1-11, B). In diesem erfolgt schließlich die Tn5-vermittelte, ungerichtete Integration des γ TREX-Transposons in das Wirtsgenom. Nach diesem Vorgang können wiederum durch das im Transposon kodierte Tetracyclinresistenzgen Stämme selektiert werden, welche diese Resistenz ausprägen und daher das Transposon genomisch integriert haben müssen. Handelte es sich beim integrierten Gencluster nun um eines mit unidirektional ausgerichteten Genen oder wurden die Gene im Zuge der Klonierung unidirektional arrangiert, ist es so bereits möglich, Stämme zu erhalten, welche das gewünschte Produkt produzieren (Abbildung 1-11, C). Ist dies nicht der Fall, kann wie bereits im TREX-System (Loeschcke et al., 2013) auf die in beiden γ TREX-Kassetten liegenden P_{T7} zurückgegriffen werden, von welchen ausgehend das Gencluster dann gegenläufig transkribiert und so ein Biosyntheseweg zur Expression gebracht werden kann (Abbildung 1-11, D).

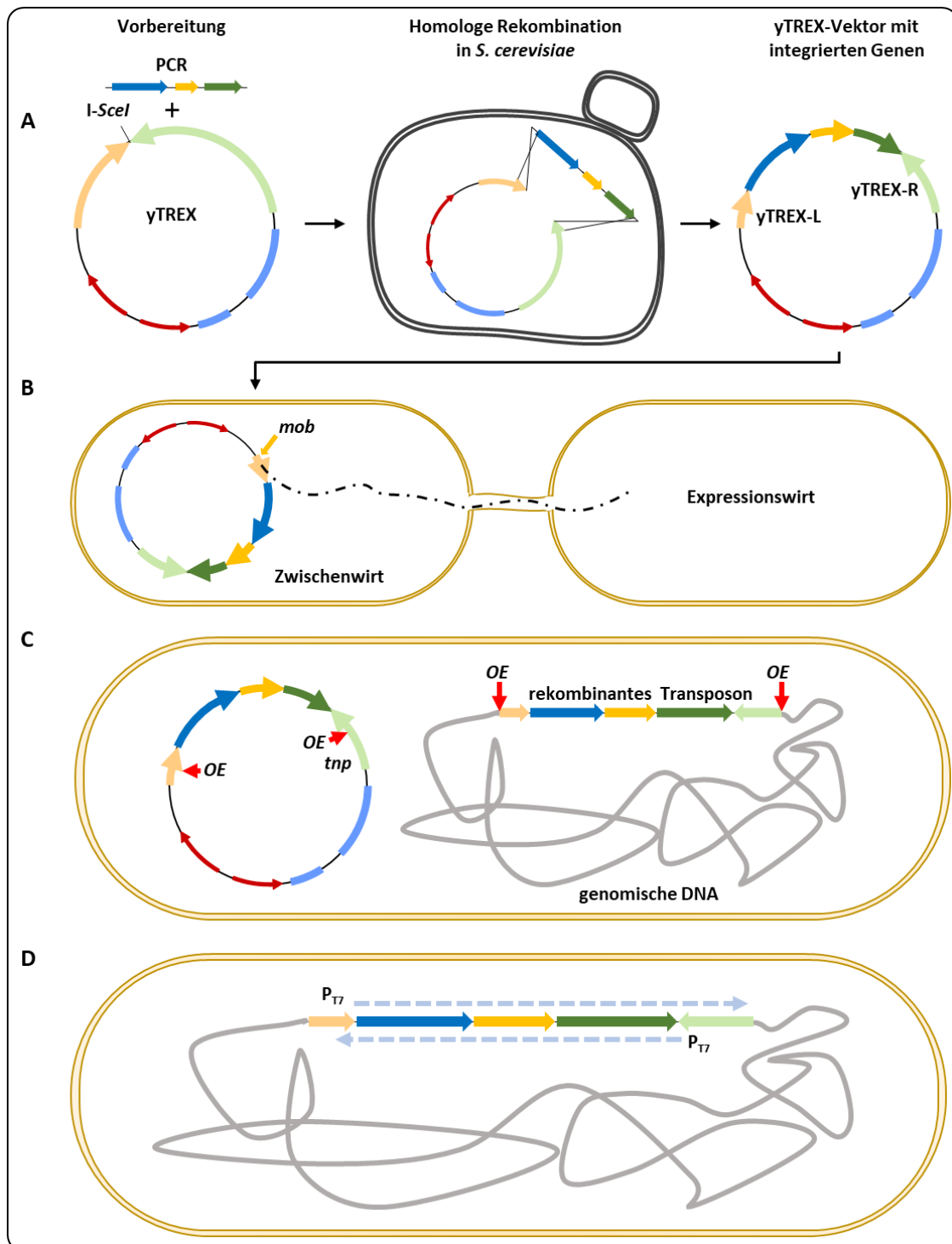


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der Anwendung des yTRES-Systems

(A) Im ersten Schritt erfolgt die Klonierung eines yTRES-Vektors mit der Integration heterologer Gene. In der Vorbereitung dazu wird der yTRES-Vektor zwischen den beiden yTRES-Kassetten durch die Endonuklease I-SceI linearisiert und die Ziel-Gene mittels PCR amplifiziert. Anschließend werden Hefezellen mit allen Bestandteilen des zu klonierenden Vektors transformiert, sodass die homologe Rekombination stattfinden kann. (B) Nach der Isolation des klonierten yTRES-Plasmids erfolgt der Transfer in den Expressionswirt durch Konjugation. (C) Im Expressionswirt wird das yTRES-Transposon schließlich durch Transposition an einer zufälligen Stelle im Genom integriert und kann je nach Integrationsort und Aufbau des Genclusters bereits zum Erhalt von konstitutiven Expressionsstämmen führen. (D) Trifft dies nicht zu, können die integrierten Gene auch durch die integrierten T7-Promotoren zur Expression gebracht werden. Die yTRES-Kassetten sind als orangefarbene (yTRES-L) und grüne Pfeile (yTRES-R) dargestellt. Das Beispiel-Gencluster wird durch einen blauen, einen gelben und einen grünen Pfeil dargestellt. I-SceI = Erkennungssequenz für die I-SceI Restriktionsendonuklease, *mob* = *plasmid mobilisation protein* welcher den *oriT* Bereich als Transferursprung enthält, *tnp* = Tn5-Transposasegen, *OE* = *outside end*, P_{T7} = T7-RNA-Polymerase-Promotor. Abbildung modifiziert nach Domröse et al., 2017; Loeschke et al., 2013.

1.4.2 Identifizierung vielversprechender genomischer Loci zur Genclusterexpression

Die zufällige, Tn5-basierte Integration von Genclustern in ein bakterielles Chromosom hat den Vorteil, dass unkompliziert und ungerichtet viele transgene Stämme erzeugt werden, aus denen dann die besten Produzenten ausgewählt werden können (Kapitel 1.4). Gleichzeitig wird so genomweit nach Loci gesucht, welche besonders günstig für die Genclusterexpression sind und sich potenziell auch für andere Gencluster als Locus zur heterologen Expression eignen. Um jedoch den Insertionsort eines guten Produzenten auch zur Expression anderer Gencluster nutzen zu können, muss dessen Locus identifiziert werden.

So wurden die ersten *P. putida*-Stämme pig-r1 und pig-r2, welche nach der TREX-vermittelten, randomisierten Integration der Prodigiosinbiosynthesegene, Prodigiosin konstitutiv bildeten (Domröse et al., 2015), mit Hilfe eines Plasmid-*rescue* Ansatzes (Perucho et al., 1980) auf den Insertionslocus des *pig*-Genclusters hin untersucht. So sollte auch der für die Expression verantwortliche Promotor (oder die Promotoren) identifiziert werden. Das Ergebnis dieser Untersuchung war, dass in beiden Fällen das Gencluster in eines der ribosomalen RNA (rRNA) kodierenden Operons (auch *rrn* Operons oder rDNA) von *P. putida* integriert wurde (Abbildung 1-12). Einer dieser Stämme, pig-r2, diente später auch als Basis für den Mutasynthesestamm *P. putida* pig-r2 Δ pigD, (Kapitel 1.2.1.4).

Ribosomen sind aus zwei Untereinheiten bestehende, sehr große RNA-Protein-Komplexe, die mit der mRNA durch zeitlich koordinierte, vorübergehende Wechselwirkungen mit den tRNAs, genetische Information in Proteine umwandeln (Kurylo et al., 2018). Der komplexe Vorgang unterliegt einem Regulationsnetzwerk, um die Energieaufwendung so gering wie möglich zu halten. In *E. coli* wird beispielsweise bis zu 40 % des gesamten Energieumsatzes der Zelle für die Bildung der Ribosomen und die Proteinsynthese aufgewendet. Die Regulation des Translationsapparats reagiert dabei flexibel auf externe Faktoren, von Nährstoffmangel bis hin zu chemischen (z.B. pH-Wert, Ionenstärke) und physikalischen (z.B. Temperatur) Schwankungen (Duan et al., 2014; Kurylo et al., 2018; Wilson & Nierhaus, 2007).

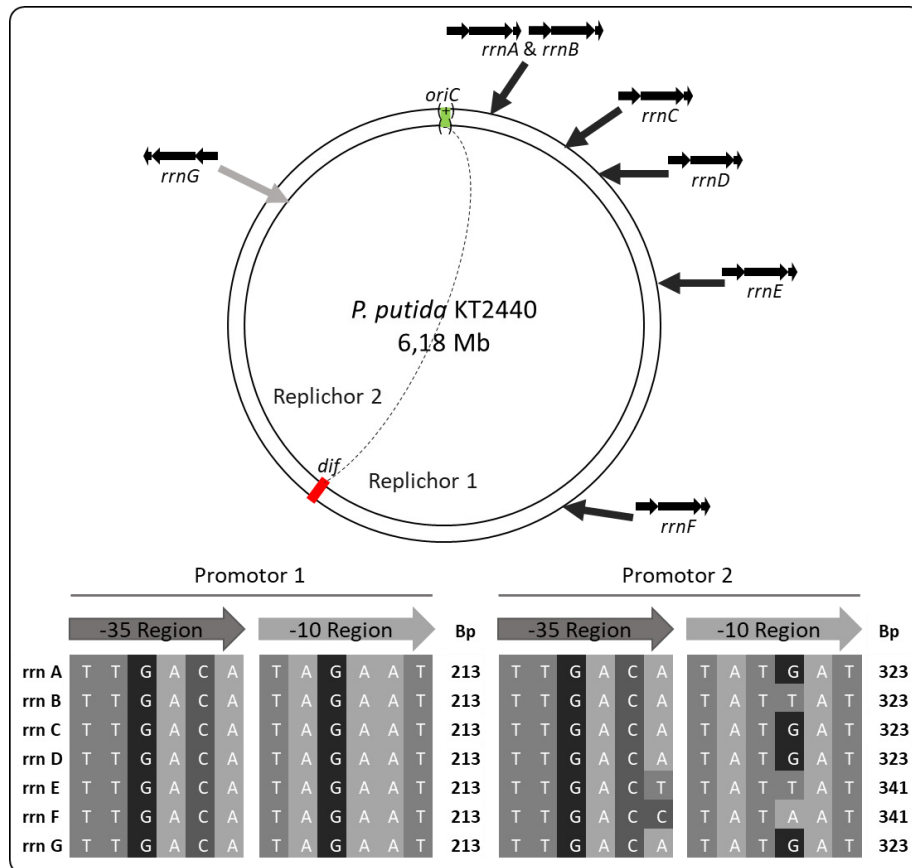


Abbildung 1-12: Schematische Darstellung des *P. putida* KT2440 Chromosoms mit den verschiedenen *rrn*-Operons

Durch die dunkelgrauen Pfeile ist jeweils die Lokalisation der auf dem (+)-Strang liegenden *rrn*-Operons (A-F) kenntlich gemacht, der hellgraue Pfeil zeigt die Lokalisation des als einziges auf dem (-)-Strang liegenden *rrn*-Operons G. In grün ist der Replikationsursprung (*oriC*), sowie in rot der Replikationsterminus (*dif*) des Chromosoms angegeben, welche das Chromosom in Replichor 1 und 2 unterteilen (gestrichelte Linie). Darunter ist ein Sequenz-Alignment der vorhergesagten rRNA-Operon-Promotorregionen dieser Loci gezeigt. Die verschiedenen rRNA-Operons (*rrnA-G*) sind links neben den Promotorsequenzen benannt. Für Promotor 1 und 2 sind jeweils die 6 Bp langen Sequenzen der -35 und -10 Region, sowie die zwischen den Promotoren liegenden Abstände angegeben. Rechts neben der -10 Region von Promotor 2 ist der Abstand dieser in Basenpaaren zum Gen der 16S-rRNA dargestellt. Durch unterschiedliche Graustufen sind die vier verschiedenen Basen kenntlich gemacht.

Die zwei Untereinheiten der Ribosomen prokaryotischer Zellen, die den Sedimentationskoeffizienten entsprechend mit 30S- und 50S-Untereinheit benannt werden und zusammen das 70S Ribosom mit der molaren Masse von ca. 2,5 MDa ergeben, setzen sich wiederum aus mehreren Proteinen und der rRNA zusammen (Abbildung 1-13). Die Ribosomen bestehen dabei zu zwei Dritteln aus rRNA und zu einem Drittel aus Proteinen. Die 50S-Untereinheit setzt sich aus der 23S- und der 5S-rRNA und Proteinen zusammen und die 30S-Untereinheit besteht aus der 16S-rRNA und weiteren Proteinen. Bei der Biosynthese der Ribosomen wird das Primärtranskript der prokaryotischen rDNA als 30S-prä-rRNA bezeichnet. Es beinhaltet die 16S-, 23S- und 5S-rRNA (Brosius et al., 1981; Kloepfer, 1973). Die entsprechend in Operons vorliegenden Gene kommen typischerweise in mehreren Kopien in Bakterien vor. Der Aufbau der 16S- und 23S-rDNA ist dabei, bis auf kleinere Abweichungen zwischen den verschiedenen *rrn*-Operons eines Organismus, in vielen Fällen auch organismusübergreifend hochkonserviert.

Trotz dieser übergreifenden Homologie kann die Expression der verschiedenen *rrn*-Operons jedoch in Reaktion auf verschiedene äußere Bedingungen unterschiedlich reguliert werden (Duan et al., 2014; Kurylo et al., 2018; Wilson & Nierhaus, 2007).

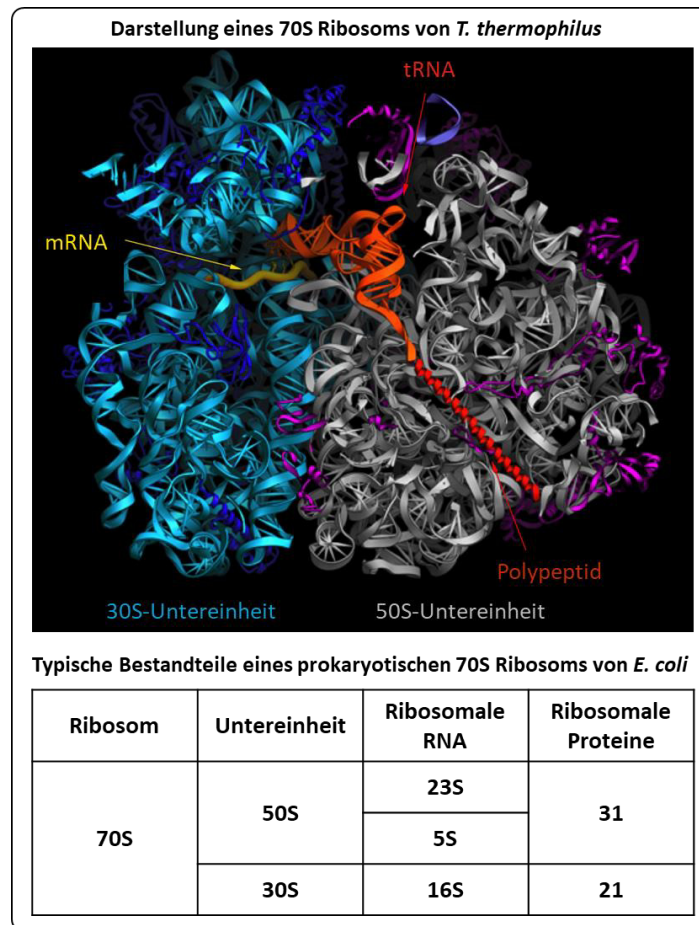


Abbildung 1-13: Schematische Darstellung eines Ribosoms bei der Proteinbiosynthese

Der Aufbau eines 70S Ribosoms aus *Thermus thermophilus* (Zhou et al. 2014, Abbildung verwendet mit freundlicher Genehmigung des Noller Lab, Santa Cruz, USA) bei der Proteinbiosynthese ist abgebildet. Einzeln dargestellt sind die kleine (30S) sowie die große (50S) Untereinheit des Ribosoms, sowie die umschlossene mRNA, die Aminosäure transferierende tRNA und das sich bildende Polypeptid. Tabellarisch sind die typischen Bestandteile eines prokaryotischen 70S Ribosoms aufgeführt (Garrett & Grisham, 2009).

Aufgrund der essentiellen Bedeutung der Ribosomen für die Zellen werden die sieben Kopien der *rrn*-Operons in *P. putida* ebenfalls stark exprimiert und eignen sich daher gut als Integrationsort zur Überexpression heterologer Gencluster (Domröse et al., 2015; Otto et al., 2019). Aufgrund der Genredundanz resultiert die Insertion nicht im Zelltod, während die starke Expression für die Transkription von größeren Genclustern günstig ist (Condon et al., 1993; Domröse et al., 2019, 2015). In einer Studie wurden nach der initialen Charakterisierung der *P. putida*-Stämme *pig-r1* und *-r2* ca. 50.000 weitere Stämme durch Integration des TREX-*pig* Transposons erzeugt (Domröse, 2016). Unter diesen fanden sich 0,1 % stark rot pigmentierte Stämme. So wurden insgesamt 50 Prodigiosinproduzenten erzeugt, welche mit *pig-r1* bis *-r52* benannt wurden. Auffällig war, dass diese sich in ihrer jeweiligen Prodigiosinproduktion deutlich unterschieden.

Da die Plasmid-*rescue* Methode zur Identifizierung des Transposon-Insertionslocus aufwendig ist, wurde für die neu erzeugten Stämme eine PCR-basierte Methode etabliert. Dabei wurde untersucht, ob auch weitere Stämme neben *pig-r1* und *-r2*, die eine starke Rotfärbung zeigten, das Transposon in der rDNA integriert trugen.

Aufgrund der starken Homologie zwischen den DNA-Sequenzen der sieben *rrn*-Operons war es möglich, Primer zu designen, welche in einem ersten Schritt in allen Stämmen zur Identifizierung einer Insertion in eines der sieben *rrn*-Operons genutzt werden konnten. Dabei wurde ein Primer eingesetzt, welcher immer spezifisch in der TREX-Kassette bindet und ein zweiter, welcher in einer stark konservierten Stelle der *rrn*-Operons bindet, sodass ein auftretendes PCR-Produkt unabhängig vom Operon, eine Integration in diese anzeigte. So wurde festgestellt, dass bei sämtlichen getesteten Stämmen das TREX-*pig* Transposon in die *rrn*-Operons integriert wurde. Im zweiten Schritt wurde dagegen ein spezifischer Primer für jedes Operon verwendet, sodass ein auftretendes PCR-Produkt bei einem Test aller sieben Primerpaare, das Operon anzeigte, in welchem die Integration stattgefunden hatte. So konnte zudem das Operon identifiziert werden, in welches das TREX-Transposon integriert wurde, sowie der ungefähre Abstand zum 16S-Promotor dieses Operons. In der folgenden Analyse aller Stämme mit rDNA-Integration und der Zuordnung der Stämme zum jeweiligen rDNA-Operon konnte ein Muster identifiziert werden, welches daraufhin wies, dass einige der *rrn*-Operons eine stärkere Aktivität zeigen als andere. Dieses Phänomen wurde auch für *Pseudomonas* sp. UW4 bereits beschrieben, wo je nach Änderung der physiologischen Bedingungen, verschiedene rDNA-Operons aktiv sind (Duan et al., 2014). Zusätzlich ist bekannt, dass ein *knockout* einzelner *rrn*-Operons sogar zu einer Hochregulation der Transkription der verbleibenden rDNA führen kann (Condon et al., 1993). Zusätzlich zeigte sich, dass eine stärkere Expressionsleistung auch mit dem Abstand zum jeweiligen Promotor zusammenzuhängen schien (Domröse et al., 2019).

1.4.3 Limitierungen des γ TREX-Systems

Durch die Möglichkeit bei γ TREX-Anwendung die Klonierung mit Hilfe der homologen Rekombination in Hefezellen durchzuführen, konnte der Klonierungsaufwand gegenüber dem TREX-System drastisch verringert und so eine große Zahl neuer Plasmide kloniert werden, welche in den meisten Fällen auch erfolgreich zur Erzeugung heterologer Produktionsstämme genutzt werden konnten (Domröse et al., 2017). In manchen Fällen zeigte sich jedoch auch hier Raum für weitere Verbesserungen. Insbesondere in Fällen, in denen ein Konstrukt nach Abschluss der Klonierung erneut verändert werden sollte, fehlte ein modulares, standardisiertes Klonierungskonzept. Ohnedies wurde mitunter die neue Klonierung des gesamten Konstrukts notwendig, was häufig auch die erneute Amplifikation von DNA mittels PCR mit adaptierten Primern erforderte. Beispielhaft für einen solchen Fall kann hier die nachträgliche Integration eines Reportergens zur Indikation einer über das vollständige Gencluster hinweg erfolgenden Transkription genannt werden. In gleicher Weise gilt dies, falls das Gen eines Reporterproteins ausgetauscht werden soll, um die Screening-Methode z.B. von manuellem Screening mittels gekoppelter *lacZ* Expression hin zu einem fluoreszenzreporterbasierten Hochdurchsatz-Screening-Ansatz ändern zu können. In solchen Fällen könnte ein standardisiertes Klonierungsverfahren die Klonierung neuer Konstrukte stark vereinfachen und Ressourcen sparen. Zudem bietet das γ TREX-System ausschließlich die Möglichkeit, das erzeugte Transposon an einem unbekanntem Locus *via* Tn5-Transposition zu integrieren. Diese Methode erlaubt zwar eine sehr effiziente Integration von Fremd-DNA, allerdings ist diese nicht für alle Fragestellungen geeignet. Sollen beispielsweise verschiedene Promotoren vergleichend getestet werden, ist eine Integration an einer immer gleichen Position im Genom des heterologen Wirts zwingend notwendig. Zudem wäre eine gezielte Integration eine interessante Neuerung, um zuvor durch zufällige Tn5-Transposition identifizierte, vielversprechende Loci, direkt adressieren zu können. So könnten sowohl bisher noch unbekannte Orte im Genom der heterologen Expression zugänglich gemacht werden als auch durch gezielte Integration starke Überproduzenten erzeugt werden.

1.5 Zielsetzung

Mikrobielle Sekundärmetabolite weisen eine hohe funktionelle Diversität auf und bieten daher eine nahezu unerschöpfliche Quelle potenziell pharmazeutisch wirksamer Naturstoffe. Unter diesen Substanzen ist das vielversprechende bioaktive Tripyrrol-Alkaloid Prodigiosin, das bereits heterolog im etablierten Wirt *Pseudomonas putida* KT2440 produziert werden konnte. Allerdings umfasst die Klasse der Prodiginine noch weitere Substanzen, von denen viele bereits beschrieben, jedoch noch nicht heterolog produziert wurden. Zudem sind Ansätze zur Derivatgewinnung mittels Mutasynthese etabliert worden, deren Produktivität allerdings noch limitiert ist. Häufig sind die Biosynthesewege solcher Sekundärmetabolite in Genclustern kodiert, weshalb es spezieller genetischer Methoden bedarf, diese funktional zu exprimieren und die Substanzen zu produzieren. Die Effektivität dieser Werkzeuge ist dabei maßgeblich für den Forschungsfortschritt und damit für den Einsatz dieser Wirkstoffe in der Industrie und Medizin.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind daher die Etablierung kombinatorischer Strategien zur Prodiginingewinnung und die Entwicklung eines vollmodularen Expressionssystems.

Es sollen dabei (I) Cycloprodigiosin und Norprodigiosin heterolog in *P. putida* produziert werden. Cycloprodigiosin soll in einem hybriden Biosyntheseweg aus *Serratia marcescens*- und *Pseudoalteromonas rubra*-Genen durch eine *in vivo* Umsetzung von heterolog produziertem Prodigiosin erzeugt werden. Zur Norprodigiosinproduktion soll ein speziell kloniertes Gencluster auf Basis des Prodigiosin-Genclusters aus *S. marcescens* heterolog exprimiert werden. Des Weiteren sollen (II) mit einem ebenfalls speziell zur MBC-Biosynthese klonierten Gencluster *P. putida*-Stämme erzeugt werden, welche größere Mengen der Bipyrrrolvorstufe produzieren als der bisher zur Mutasynthese verwendete Stamm *P. putida* pig-r2 Δ pigD. Die erzeugten Stämme sollen folgend zur Steigerung der Prodigininmutasynthese eingesetzt werden.

Aufgrund der Limitierungen, welche das yTREX-System aufweist, lag ein weiteres Hauptaugenmerk dieser Arbeit (III) auf der Weiterentwicklung des Systems zu einer breit anwendbaren *Toolbox*, welche die Handhabung und Anwendungsmöglichkeiten verbessert bzw. erweitert. Mit einer neu gestalteten yTREX-*Toolbox* soll es möglich sein, die bei der Stammerzeugung eingesetzten Selektionsmarker, Transkriptionsreporter sowie den eingesetzten Mechanismus der Integration, unabhängig voneinander im Vektor auszutauschen. Dazu werden die Vektoren so modifiziert und anhand eines Modell-Genclusters überprüft, dass frei zwischen einer genomischen Integration durch Tn5, Tn7 und einer gezielten Integration in die ribosomalen Operons von *P. putida* gewählt werden kann. Zusätzlich werden verschiedene Selektionsmarker sowie Transkriptionsreporter getestet, was parallel den Beginn des Aufbaus einer Vektorbibliothek darstellt, um den Klonierungsablauf der folgenden Anwendungen des Systems so schnell und einfach wie möglich zu gestalten.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Materialien, Verbrauchsmittel und Geräte entsprechen der Standardausstattung eines mikrobiologischen Laboratoriums. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden unter Einhaltung der jeweiligen Sicherheitsbestimmungen durchgeführt.

2.1 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden über VWR international GmbH (Darmstadt, Deutschland), Ratiolab GmbH (Dreieich, Deutschland), Sarstedt AG (Nümbrecht, Deutschland), BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) und Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bezogen. Andere, spezifische Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1: Auflistung verwendeter spezieller Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
AeraSeal	Excel Scientific, Victorville, USA
Celluloseacetat-Membran 0,2 µm, ø 25 mm, Whatman®	GE Healthcare, Maidstone, Großbritannien
FlowerPlate® MTP	m2p-labs GmbH, Baesweiler, Deutschland
RoundwellPlate® MTP	m2p-labs GmbH, Baesweiler, Deutschland
Kryoröhrchen, CryoTubes™	Nalge Nun International, Rochester, USA
Spitzenvorsatzfilter (steril), 0,2 µm	VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
Greiner Mikrotiterplatten, 96-well, flat bottom	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DC-Fertigfolien ALUGRAM SIL (10 x 20 cm, 0,20 mm Kieselgel 60)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

2.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2-2 gelistet und wurden in der jeweils angegebenen, benötigten Reinheit verwendet. Spezielle Chemikalien wie z.B. Bestandteile von HPLC-Laufmitteln sind zudem in der Beschreibung der jeweiligen Anwendung angegeben.

Tabelle 2-2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Pepton	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Chemikalie	Bezugsquelle
Agar-Agar Kobe	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dichlormethan (DCM)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (<i>p.a.</i>)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hefe-Stickstoff-Basismedium (YNB)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lithiumacetat (LiAc)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium (Luria/ Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Terrific-Broth</i> -Medium modifiziert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS Hydrochlorid (TRIS-HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaiser Mixture, SC -Ura (SC -URA)	Formedium Ltd., Norfolk, Großbritannien
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lachssperma Einzelstrang (SS) DNA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phenazin-1-Carboxylsäure	Apollo Scientific Ltd, Stockport, Großbritannien
Polyethylenglykol (PEG) 3350	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
M9-Minimalsalze, 5X	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MIDORI Green Advance	NIPPON Genetics Europe, Düren, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
dNTP Mix (je 10 mM)	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA

2.2.1 Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer wurden mit vollentsalztem (VE)-Wasser angesetzt. Puffer mit definiertem pH-Wert wurden unter Zuhilfenahme eines pH-Meters kontrolliert und gegebenenfalls mit zum Puffersystem passenden Säuren oder Basen auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen sind im jeweiligen Kapitel aufgeführt.

2.2.2 Enzyme

Die während dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der ThermoFisher Scientific GmbH (Waltham, USA) bezogen. Spezielle Enzyme anderer Hersteller sind in Tabelle 2-3 mit der jeweiligen Bezugsquelle aufgelistet.

Tabelle 2-3: Auflistung spezieller, verwendeter Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
<i>MauBI</i>	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
<i>SaII</i>	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
<i>I-SceI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
<i>I-PpoI</i>	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
T4 DNA Ligase	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
Phire Hot Start II DNA Polymerase	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
FastAP Alkaline Phosphatase	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Zymolyase	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

2.2.3 Molekularbiologische Kits

Molekularbiologische Standardmethoden, wie die Isolation von Plasmiden oder die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel wurden mit den in Tabelle 2-4 aufgeführten molekularbiologischen Kits durchgeführt.

Tabelle 2-4: Auflistung der verwendeten molekularbiologischen Kits

Bezeichnung	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
NucleoSpin Tissue	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
innuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
In-Fusion® HD Cloning	Takara Bio, Europe

2.3 Verwendete Geräte und Software

2.3.1 Geräte

Tabelle 2-5: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
expression Compact Mass Spectrometer (CMS)	Advion, Ithaca New York, USA
7900HT Fast Real-Time PCR-System	Applied Biosystems, Waltham, USA
BD FACS Aria™ III, Zellsortiersystem	BD Biosciences, San Jose, USA
Sonorex RH 100 H	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Tprofessional Basis Gradient Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
MicroPulser Electroporator	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
PowerPac™ Basic, Netzteil	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Wide Mini-Sub Cell GT, Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Rotavapor R-100	Büchi, Schweiz
Stuart Rotatorrad SB2	Cole Parmer, Staffordshire, Großbritannien
TH15, Inkubationshaube	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
TiMix, MTP-Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
VKS 75 control, Vielkolben Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ThermoMixer C, MTP-Inkubationsschüttler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ThermoStat Plus, Inkubationsschüttler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Gerät	Hersteller
Äkta protein purification systems (FPLC System)	GE Healthcare, Maidstone, Großbritannien (ehemals Amersham Pharmacia Biotech)
Mikro 200, Mikroliterzentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Mikro 200R, Mikroliterzentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Rotina 380R, Zentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Multitron Pro, Inkubationsschüttler	Infors AG, Basel, Schweiz
Multitron Standard, Inkubationsschüttler	Infors AG, Basel, Schweiz
Calimatic 766, Labor-pH-Meter	Knick GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
LC10-Ai LC System	Shimadzu, Kyōto, Japan
CAMAG Automatic TLC Sampler 4	CAMAG, Muttenz, Schweiz
CAMAG® TLC Visualizer 2	CAMAG, Muttenz, Schweiz
QPix Mikrobielle Kolonie Picker	Molecular Devices, San Jose, USA (ehemals Genetix)
Fast Gene® Blue/Green LED Transilluminator XL, Geldokumentationssystem	NIPPON Genetics Europe, Düren, Deutschland
Thriller, Inkubationsschüttler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Eagle Eye II-System, Geldokumentationssystem	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
Systec VX-55, Autoklav	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Infinite M1000 Pro fluorescence microplate reader	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
GENESYS™, UV-Vis Spektrophotometer	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
HeraSafe™ KS12 Typ II, Sicherheitswerkbank	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
NanoDrop 2000c, UV-Vis Spektrophotometer	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Sorvall® RC-6™ Plus, Zentrifuge	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA

2.3.2 Software

Die verwendete Software sowie die jeweiligen Hersteller sind in Tabelle 2-6 dargestellt. Die Nutzung der entsprechenden Software wird bei der jeweiligen Beschreibung der Anwendung genannt. Insbesondere die folgenden Programme standen in dieser Arbeit im Vordergrund. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden mit dem Softwareprogramm Clone Manager geplant, ebenso wurden die Schritte der Klonierungen virtuell durchgeführt und so die jeweiligen Plasmidkarten erstellt. Die Programme des Microsoft Office 365 Pakets wurde zur Datenauswertung (Excel), sowie zur Dokumentation (u.a. OneNote) und dem Erstellen des schriftlichen Teils dieser Arbeit (Word) genutzt. „Mendeley Desktop“ wurde zur Verwaltung und Zitation der für diese Arbeit verwendeten Literatur eingesetzt. Das Programm LabSolution/LCSolution diente als Benutzeroberfläche bei der Bedienung der HPLC Anlage.

Tabelle 2-6: Auflistung der während dieser Arbeit verwendeten PC Software

Software/Online-Tool	Hersteller/Referenz
UNICORN	Cytiva, Marlborough, USA
Mass Express	Advion, Ithaca New York, USA
CAMAG® HPTLC Software visionCATS	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Mendeley Desktop	Elsevier, Amsterdam, NL
Codon Usage Database	Kazusa DNA Research Institute, Kazusa-Kamatari, Japan
Mnova	Mestrelab Research, S.L., Santiago de Compostela, Spanien
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA
ARNold	(Naville et al., 2011)
Galaxy Codon Harmonizer	The Galaxy Project
Graphical Codon Usage Analyzer (GCUA)	Thomas Schoedl
Sequence Manipulation Suite	www.bioinformatics.org
BPROM	www.softberry.com
LabSolution/LCSolution Version 5.57 SP1	Shimadzu, Germany
Clone Manager 9.5	Scientific and Educational Software, Denver, USA

2.3.2.1 Design von randomisierten synthetischen DNA-Sequenzen

Um die im Rahmen dieser Arbeit zum Aufbau der *yTREX-Toolbox* verwendeten synthetischen DNA-Sequenzen zu erzeugen und deren zufällige Zusammensetzung zu gewährleisten, wurde die *Sequence Manipulation Suite* (www.bioinformatics.org) verwendet (Stothard, 2000). Der GC-Gehalt dieser Sequenzen wurde dabei auf 50 % festgesetzt. Nach der zufälligen Generierung der Sequenzen mittels des Online-Tools, wurden die Sequenzen manuell auf das Vorkommen verbreiteter Ribosombindestellen Sequenzen (RBS) sowie von Start- und Stopcodons untersucht. Alle diese Sequenzmotive innerhalb der zufällig generierten Sequenzen wurden entfernt. Dabei wurde wiederum darauf geachtet, die Basen möglichst zufällig auszutauschen und den GC-Gehalt bei 50 % zu belassen. Im Anschluss wurden alle Rekombinationssequenzen mit dem Online-Tool BPROM (www.softberry.com) auf das Vorhandensein oder auf Ähnlichkeiten zu bakteriellen Promotoren untersucht, sowie mit dem Online-Tool ARNold auf die Anwesenheit bakterieller Transkriptionsterminatoren durchsucht (Naville et al., 2011; Solovyev & Salamov, 2011). Abschließend wurden die erzeugten Sequenzen *via* BLASTN mit der gesamten NCBI Datenbank verglichen (Stand Juni 2017), um auch eine Ähnlichkeit mit ggf. in der Zukunft interessanten und zu klonierenden Genclustern ausschließen zu können.

2.4 Verwendete Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide

2.4.1 Verwendete Bakterien- und Hefestämme

Die in Tabelle 2-7 aufgeführten und in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen lagen in der Stammsammlung des IMET vor oder wurden während dieser Arbeit hergestellt.

Tabelle 2-7 Auflistung der verwendeten Bakterien- und Hefe-Stämme

Organismus	Stammname	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i>	DH5 α	<i>F-Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	(Grant et al., 1990; Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i>	S17-1	<i>recA, thi, pro, hsdR M⁺ [RP4 2-Tc^R::Mu::Km^RTn7] TpR Sm^R</i>	(Simon et al., 1983)
<i>E. coli</i>	S17-1 λ pir	<i>TpR Sm^R recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc^R::Mu: Km^R Tn7 λpir</i>	(Simon et al., 1983)
<i>E. coli</i>	Stellar	<i>F, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ(lacZYA-argF) U169, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔmcrA, λ-</i>	Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan
<i>P. putida</i>	KT2440	Wildtyp	(Bagdasarian et al., 1981; Nelson et al., 2002)
<i>P. putida</i>	pig-r2 Δ pigD	KT2400:: pig Cluster, TREX-LpigR Δ pigD Gm ^R , Sm ^R	(Klein et al., 2017)
<i>P. putida</i>	pig21, 22, 25	KT2400:: γ TREX-pigABCDEFGHIJKLMN, Tc ^R	(Domröse et al., 2017)
<i>P. putida</i>	PCA1, 2, 8	KT2400:: γ TREX-phzA1B1C1D1E1F1G1-lacZ, Tc ^R	(Domröse et al., 2017)
<i>P. putida</i>	PCA7, 10, 20	KT2400:: γ TREX-phzA1B1C1D1E1F1G1-lacZ, Tc ^R	Diese Arbeit
<i>S. cerevisiae</i>	VL6-48	<i>MATa, his3-Δ200, trp1-Δ1, ura3-52, lys2, ade2-101, met14</i>	ATCC [®] MYA-3666 [™] (Kouprina et al., 1998)
<i>P. putida</i>	HBC-pigC-lacZ 9, 10, 11, 12, 13, 14	KT2400:: γ TREX-pigCAGHIJKLM-lacZ, Tc ^R	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	MBC13, 17, 18	KT2400:: γ TREX-pigAFGHIJKLMN-lacZ, Tc ^R	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	Nor1, 2, 3, 5, 7, 8	KT2400:: γ TREX-pigABCDEFGHJKLM, Tc ^R	Diese Arbeit

Organismus	Stammname	Genotyp	Referenz
<i>P. putida</i>	RW19-1, -2, -3, -4, -5, -6	KT2400:: YT_core (<i>vioABCDE</i> , <i>Tc^R</i>)	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW16SA	KT2440:: 16S-pad-A, <i>Gm^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW16SB	KT2440:: 16S-pad-B, <i>Gm^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW16SC	KT2440:: 16S-pad-C, <i>Gm^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW16SD	KT2440:: 16S-pad-D, <i>Gm^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW16SE	KT2440:: 16S-pad-E, <i>Gm^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW16SF	KT2440:: 16S-pad-F, <i>Gm^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW16SG	KT2440:: 16S-pad-G, <i>Gm^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW25-A	KT2440:: 16S-pad-A- <i>vioABCDE</i> , <i>Tc^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW25-B	KT2440:: 16S-pad-A- <i>vioABCDE</i> , <i>Tc^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW25-C	KT2440:: 16S-pad-B- <i>vioABCDE</i> , <i>Tc^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW25-D	KT2440:: 16S-pad-C- <i>vioABCDE</i> , <i>Tc^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW25-E	KT2440:: 16S-pad-D- <i>vioABCDE</i> , <i>Tc^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW25-F	KT2440:: 16S-pad-E- <i>vioABCDE</i> , <i>Tc^R</i>	Diese Arbeit
<i>P. putida</i>	RW25-G	KT2440:: 16S-pad-F- <i>vioABCDE</i> , <i>Tc^R</i>	Diese Arbeit

2.4.2 Verwendete Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2-8 aufgeführt und lagen entweder in der Plasmidsammlung des IMET vor oder wurden während dieser Arbeit kloniert.

Tabelle 2-8: Auflistung der verwendeten Plasmide

Plasmide	Genotyp	Referenz
pUC19-pig	<i>lacZ</i> , <i>cue^R</i> , <i>pigA-N</i> , <i>P_{lac}</i> , <i>Amp^R</i>	(Loeschcke et al., 2013)
pK19-mobsacB	<i>lacZα</i> , <i>Km^R</i> , <i>sacB</i>	(Schäfer et al., 1994)
pVLT33 (Leervektor)	<i>Km^R</i> , <i>RSF1010-lacIq/P_{tac}</i>	(de Lorenzo et al., 1993)
pVLT33-Prub680	pVLT33 + <i>Prub680</i>	(Ibrahim, 2019)
pVLT33-pigC	pVLT33 + <i>pigC</i> (Codonoptimiert) (pVLT33:: <i>opt pigC</i>)	(Brands et al., 2021a)
pVLT33-I1	pVLT33 + adaptierte <i>pigC</i> -Variante I1	(Brands et al., 2021a)
pVLT33-pigC-pigB	pVLT33-pigC (Codon-optimiert) + <i>pigB</i>	Diese Arbeit
pAraVio	<i>pSBM2g</i> , <i>araC</i> , <i>Km^R</i> , <i>P_{BAD}-vioABCDE</i>	(Binder et al., 2016)
pRcExpII2-YF1-FixJ-PFixK2-LacZ	<i>pRcExpII-2-YF1-FixJ</i> , <i>P_{fixK2} lacZ</i> , <i>Km^R</i> , <i>Cm^R</i>	(Loeschcke, 2012)
yTREX (Leervektor)	YCp50-poly- <i>Km^R</i> , <i>oriT-mob</i> , OE-L, <i>P_{T7}</i> , CIS, <i>P_{T7}</i> , <i>Tc^R</i> , Tn5 <i>tnp</i> , OE-R	(Domröse et al., 2017)
yTREX-Norprodigiosin	yTREX- <i>pigABCDEFGHIJKLM</i>	Diese Arbeit
pMK-RQ-YT_core	<i>ColE1</i> ori, <i>Km^R</i> , Tn7-L, YT_core, Tn7-R (Gensynthese)	Diese Arbeit
pSEVA512S	R6K ori, I-SceI, <i>lacZα</i> , I-SceI, <i>Tc^R</i>	(Martínez-García & de Lorenzo, 2011)
pSEVA512S-16S-pad	16S-up-landing pad- PaacC1-aacC1-landing pad-16S-dwn	Diese Arbeit

Plasmide	Genotyp	Referenz
pYTRW010K_0x5	pYT-Rückgrat: <i>URA3, CEN4/ARS1, oriT-mob</i> , pMB1ori, <i>aphII (Km^R)</i> . YT_core, Tn5 <i>tnp</i> , OE-L, OE-R	Diese Arbeit
pYTRW007K_0G5	pYT-Rückgrat (pYTRW010K_0x5), YT_core (<i>Gm^R</i>)	Diese Arbeit
pYTRW008K_0C5	pYT-Rückgrat (pYTRW010K_0x5), YT_core (<i>Cm^R</i>)	Diese Arbeit
pYTRW009K_0T5	pYT-Rückgrat (pYTRW010K_0x5), YT_core (<i>Tc^R</i>)	Diese Arbeit
pYTRW016K_1G5	pYT-Rückgrat (pYTRW007K_0G5), YT_core (<i>Gm^R</i> , promotorloses <i>eYFP</i>)	Diese Arbeit
pYTRW013K_3G5	pYT-Rückgrat (pYTRW007K_0G5), YT_core (<i>Gm^R</i> , promotorloses <i>mCherry</i>)	Diese Arbeit
pYTRW014K_7G5	pYT-Rückgrat (pYTRW007K_0G5), YT_core (<i>Gm^R</i> , promotorloses <i>lacZ</i>)	Diese Arbeit
pYTRW017K_6G5	pYT-Rückgrat (pYTRW007K_0G5), YT_core (<i>Gm^R</i> , promotorlose <i>pe-h</i>)	Diese Arbeit
pYTRW019K_0T5	pYT-Rückgrat (pYTRW009K_0T5), YT_core (<i>vioABCDE, Tc^R</i>)	Diese Arbeit
pYTRW021K_1Ti1	pYT-Rückgrat (<i>URA3, CEN4/ARS1, oriT-mob</i> , pMB1ori, <i>aphII (Km^R)</i>), LP-L, YT_core (<i>Tc^R</i> , <i>eYFP</i>), LP-R	Diese Arbeit
pYTRW024K_1Ti1	pYT-Rückgrat (pYTRW021K_1Ti1), YT_core (<i>vioABCDE, Tc^R</i> , <i>eYFP</i>), LP_R	Diese Arbeit
pYTRW25K_1Ti1	pYT-Rückgrat (pYTRW021K_1Ti1), <i>sacB</i> , YT_core (<i>vioABCDE, Tc^R</i> , <i>eYFP</i>), LP_R	Diese Arbeit
yTRES-HBC-pigC	yTRES-pigACGHIJKLM - <i>lacZ</i>	Diese Arbeit
yTRES-MBC-lacZ	yTRES-pigAFGHIJKLMN-lacZ	Diese Arbeit
yTRES-PCA-lacZ	yTRES-phzA1B1C1D1E1F1G1-lacZ	Diese Arbeit

2.4.3 Verwendete Oligonukleotide

Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms Clone Manager 9.5 geplant und über Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2-9: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Aufgeführt sind die in dieser Arbeit zur Klonierung oder Sequenzierung verwendenden Oligonukleotide. Die homologen Bereiche zum angrenzenden Fragment welche zur Klonierung mittels In-Fusion oder Hefe-Klonierung notwendig waren, sind jeweils unterstrichen.

Für PCR verwendete Oligonukleotide		
Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Verwendung
AD106	TACGGTTGTCGGAGACGCCAGTGGAGTATC	Spezifische Bindung vor <i>rrn</i> -Operon A
AD107	CCCATCCCGAACTCAGTAGTGAACGATGC	Spezifische Bindung vor <i>rrn</i> -Operon B
AD108	AAGAAGTCGTTTGGCCGGGTTACCCTCAAG	Spezifische Bindung vor <i>rrn</i> -Operon C
AD109	CATGAAGCGTCGCAGTTTGCATTCCCTAGC	Spezifische Bindung vor <i>rrn</i> -Operon D
AD110	AGGATCACTGCAAGAAAGCCCGCACTGTAG	Spezifische Bindung vor <i>rrn</i> -Operon E

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Verwendung
AD111	AGCAGCATGATGATGCTGGCGAAGATCAGG	Spezifische Bindung vor <i>rrn</i> -Operon F
AD112	CTTGGGTTGGGCTTGTTCATTTCTGTGG	Spezifische Bindung vor <i>rrn</i> -Operon G
AD124	<u>CACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGGATTCACTGGCC</u> <u>GTCGTTTTAC</u>	<i>lacZ</i> Amplifikation
AD125	<u>GAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTAGCGCTTATTTTT</u> <u>GACACCAGACC</u>	
AD142	<u>AGAAATATTAGCTAATTTAATCTCTCAACCCGATGGCGGAGTTC</u> <u>GTCATGG</u>	Amplifikation von <i>pig</i> -Genen zur Klonierung artifizierlicher Prodiginin-Gencluster:
AD143	<u>CATCACCTCCGAGGCGTAACGGGCATTGCTCATGCGCTCCCC</u> <u>GCAGAC</u>	
AD144	<u>GTCTGCGGGGAGGCGCATGAGCAATGCCGTTACGCCTGCGG</u> <u>AGGTGATG</u>	
AD145	<u>TGCGAGCTCCCGTTGCTAACTGGTCTAGTTCTAGCCATCGGCAC</u> <u>GTTCTCCGCGTTG</u>	
AD146	<u>CGCGGAGAACGTGCCGATGGCTAGAACTAGACCAGTTAGCAA</u> <u>CGGGAGCTCG</u>	
AD148	<u>GAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAATCCTCAGCGGATTAG</u> <u>GGGAATCG</u>	HBC- <i>pigC</i> <i>pigA</i> : AD142+AD143 <i>pigC</i> : AD144+AD145
AD149	<u>CTTCGCCGGATGTGGTGCTGATCTAGTCTAGCCATCGGCACGTT</u> <u>CTC</u>	<i>pigGHIJKLM</i> : AD146+AD158
AD150	<u>GAGAACGTGCCGATGGCTAGACTAGATCAGCACCATCCGGC</u> <u>GAAG</u>	MBC:
AD151	<u>CGAGCTCCCGTTGCTAACTGGTCTAGTTCTAGTCTAAAAAGGTG</u> <u>GAGAGTTC</u>	<i>pigA</i> : AD142+171 <i>pigF-I</i> : AD172+162
AD152	<u>GAActCTCCACCTTTTTAGACTAGAACTAGACCAGTTAGCAACG</u> <u>GGAGCTC</u>	<i>pigJ-N</i> : AD163+164
AD158	<u>GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTCTCCTCAGCGGATTA</u> <u>GGGGGAATCG</u>	Norprodiginosin: <i>pigA-C</i> : AD142+149 <i>pigD-E</i> : AD150+151
AD162	<u>GTTGGACAGATCGATACGATCGATGCCGGGCGAGTGCAG</u>	<i>pigG-M</i> : AD152+148
AD163	<u>CTGCGCACTGCCGGCATCGATCGTATCGATCTGTCCAAC</u>	
AD164	<u>GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGTTACAGCACGAAAG</u> <u>GAATGAAACATTTAAC</u>	
AD171	<u>CATTGCTGGCTCCCTAGTCTAAAAAGGTGGAGAGTCATGCGCC</u> <u>TCCCCGCAGAC</u>	
AD172	<u>GTCTGCGGGGAGGCGCATGACTCTCCACCTTTTTAGACTAGGG</u> <u>AGCCAGCAATG</u>	
RW001	<u>ATTTCCCGAACTGACTCTTATACACAAGTTATCTGCAGCACTC</u> <u>AACAGATC</u>	YT_core Amplifikation zur pYTRW01K_OX5 Klonierung
RW002	<u>TTCAGGACGCTCTGACTCTTATACACAAGTCTAACTGATCGGT</u> <u>CAGAGCGCACCTC</u>	
RW138	GCGACTGCCCTGCTGCGTAACATC	Amplifikation eines Teils der 16S <i>landing site</i> in Kolonie PCRs (<i>rev</i> in <i>aacC1</i>)
RW144	CGGTTTACAAGCATAAAGCTTTCATGACATCACCTCCG	<i>pigB</i> Amplifikation
RW145	GTGCCGATGGCTAGCCTCTAGATCGCCCGCAAGCTGGGTC	
RW148	<u>TCCAGAACGACGGATCTTGACGCAATTTGGCGTGGCTCTCTTAA</u> <u>GGTAGCCCTCCGACCAATTGAGGTGCGCTCTGACCGATCAGTT</u> <u>TAGGGTGAGCCAACCCGGCCGATC</u>	LP_R Amplifikation
RW149	<u>AACCACTATATTGATCACCGATATATGGACTTCCACACCAGTTT</u> <u>ACCAGCGGCTAGTC</u>	

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Verwendung
RW156	ACGTTTCGATCGCGTGGCGTCTCATGATAATAATGGTTTCTTAGA CGTCAGG	pYTRW09K_OT5 Vektorrückgratamplifikation
RW157	CGGTGATCAATATAGTGGTTGACATGCTGGCTAGTCAACATTG	
RW158	GACGCCACGCGATCGAACG	LP_L Amplifikation
RW159	CACGACAGGGTGCCTGTACCTATCTGCAGCACTCAACAG	YT_core amplifikation pYTRW09K_OT5
RW160	TCAAGATCCGTCGTTCTGGATACACACCCATAATACCCATAATA G	
RW164	GGTACACGCACCCTGTCGTG	LP_L Amplifikation
RW170	GCAGATTCGACTACTAGGGGGGCTAACAGGAGGAATTAACC	Amplifikation des <i>Violacein</i> Genclusters
RW171	GATACCCAGAGATTACCCTGTTATCCCTACTAGCGCTTGCGGC GAAGAC	
RW174	CTTGCACCCTCTGTATTACC	Amplifikation der 16S <i>landing site</i> in <i>rrn</i> -Stämmen
RW194	ATTTATTGTCATATTACTAGCACGTGCCATCACATATACCTGCC GTTC	<i>sacB</i> Amplifikation
RW195	ATATGTGGACCCGGGACTAGTTTTATTTGTTAACTGTTAATTGTC CTTGTTCC	
RW217	CAGGCCGAACTCCTCGTCCAGGAAATG	PCRs zur Kontrolle der <i>Violacein</i> integration in <i>rrn</i> - Operons (<i>rev in vivo</i>)
Zur Sequenzierung verwendete Oligonukleotide		
Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Verwendung
RW003	AGGCCGCCGATCATCAAG	Sequenzierung CIS (fw)
RW004	ACACAGATTTAGCCCAAGTCG	Sequenzierung CIS (rev)
RW005	GGCTCGTTACCTCGTTCTTC	Sequenzierung Gencluster (fw)
RW006	CAGCACGTATTGAGGAAGTC	Sequenzierung Gencluster (rev)
RW007	CTCAATCTCGCGCTATTGTG	Sequenzierung Transkriptionsreporter (fw)
RW008	CCATGGACGCGTAGTCGTAG	Sequenzierung Transkriptionsreporter (rev)
RW009	CCTCAATACGTGCTGCAAC	Sequenzierung Selektionsmarker (fw)
RW010	GAACGTTACCATGTTAGGAG	Sequenzierung Selektionsmarker (rev)
RW196 (2)	CCGCGCTCATCAATC	Sequenzierung LP_L
RW197	TAACGCGCTTGCTGCTTG	Sequenzierung LP_R
RW220	CTTTACCCGCCGACATGG	Sequenzierung <i>vioD</i>
RW221	CAGATGAACCTGGTGTCCG	Sequenzierung <i>vioD</i>
RW223	CTTGCAGGGCGATATG	Sequenzierung <i>vioD</i>
RW232	GCTTGCGGCGAAGAC	Sequenzierung <i>vioD</i>
RW233	CGACCAGGGATTGAAC	Sequenzierung <i>vioD</i>

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Messung der optischen Dichte von Kulturen

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Flüssigkulturen wurden unterschiedliche Verfahren angewendet. Für Kulturen ab einem Gesamtvolumen von 10 ml wurde ein UV-VIS-Küvetten-Photometer (Genesys 10S, ThermoFisher Scientific), sowie dazu passende Halbmikroküvetten mit 1 cm Schichtdicke verwendet. Absorptionsmessungen erfolgten je nach Kultur und produziertem Metaboliten bei verschiedenen Wellenlängen. Zur OD-Messung von *E. coli* Kulturen wurde eine Wellenlänge (λ) von 580 nm gewählt, während für Kulturen des *P. putida* Wildtyps eine Wellenlänge von 600 nm genutzt wurde. In Expressionskulturen, welche die in dieser Arbeit beschriebenen Sekundärmatabolite produzierten, wurde die OD entweder bei 650 nm (Prodiginine), oder 750 nm (Violaceine) bestimmt, um die Messung der Absorption des Metaboliten zu vermeiden. Die OD-Messung von Phenazin-Produktionskulturen wurde auch bei 600 nm durchgeführt, da der in dieser Arbeit produzierte Metabolit Phenazin-1-Carboxylsäure (PCA), nicht in diesem Wellenlängenbereich absorbiert.

Proben, bei denen der Messwert außerhalb des linearen Messbereichs des Photometers lag, wurden in geeigneten Verdünnungen gemessen. Als Leerkontrolle wurde das verwendete Medium inklusive der entsprechenden Zusätze, wie etwa Antibiotika oder Vorläufer eingesetzt.

Bei Kultivierungen in *Flower-* oder *Roundwellplates*, bei welchen das Volumen 1 ml oder weniger betrug, wurde die OD im Plattenphotometer (Tecan Infinite M1000 Pro) gemessen. Auch hier wurden die Proben zur Messung, mit Medium inklusive verwendeter Zusätze bei Bedarf verdünnt. Von den verdünnten Proben wurden 150 μ l in eine Mikrotiterplatte (Greiner Microtiterplatte, 96-well, flat bottom) überführt und die Absorption ohne Deckel bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen. Nach Abzug des Referenzwerts (150 μ l Medium mit Zusätzen) wurden die Messwerte mit einem Faktor multipliziert, um eine Vergleichbarkeit zu den Messungen am Küvetten-Photometer herzustellen. Diese Korrelationsfaktoren (Tabelle 2-10) wurden zuvor experimentell bestimmt (Ibrahim, 2019).

Tabelle 2-10: Korrelationsfaktoren zur Vergleichbarkeit von Plattenphotometer und Photometermesswerten

Um die Messwerte des Plattenphotometers mit denen des Küvettenphotometers vergleichen zu können, wurden diese mit den aufgeführten Korrekturfaktoren multipliziert.

Wellenlänge [nm]	LB-Medium	TB-Medium
600	4,509	5,550
650	3,829	5,234
700	3,832	4,991
750	3,572	4,849

2.5.2 Allgemeine Kultivierung von Mikroorganismen

2.5.2.1 Nährmedien zur Anzucht von Bakterien

Zur Anzucht von Bakterien wurden Fertigmischungen der Medien *Lysogeny-Broth* (LB) (Bertani, 1951) und *Terrific-Broth* modifiziert (TB) (Tartoff & Hobbs, 1987) (Tabelle 2-11) verwendet sofern nicht anders angegeben. Diese wurden nach den Herstellerangaben mit VE-Wasser angesetzt. Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 2-11 angegeben. Zur Herstellung von LB Festmedium wurde dem angesetzten Medium 15 g/l Agar-Agar hinzugefügt. Folgend wird das Festmedium als LB-Agar bezeichnet. Die hergestellten Flüssig- und Festmedien wurden zur Sterilisierung in geeigneten Gefäßen für 20 min bei 200 kPa und 121 °C autoklaviert (Systec VX-55).

Tabelle 2-11: Auflistung der Inhaltsstoff der verwendeten Medien

Medium	Zusammensetzung	
LB-Medium (LB) (<i>Lysogeny-Broth</i> , Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
TB-Medium (TB) (<i>Terrific-Broth</i> -Medium modifiziert, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	Casein	12 g/l
	Hefeextrakt	24 g/l
	K ₂ HPO ₄	9,4 g/l
	KH ₂ PO ₄	2,2 g/l
M9 Minimalmedium, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	M9 Minimalsalze, 5x Lsg.	200 ml/l
	Glucose (1M) Lsg.	20 ml/l
	Magnesiumsulfat (1M) Lsg.	2 ml/l

2.5.2.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung verschiedener *E. coli*-Stämme erfolgte als Standardbedingungen bei 37 °C, unter Schütteln mit 120 Umdrehungen pro Minute (UpM) in zu maximal 10 % mit Medium gefüllten Erlenmeyerkolben. Die Inkubation auf Festmedium erfolgte auf LB-Agarplatten bei 37 °C. Zur Selektion wurde dem Medium bei Bedarf ein Antibiotikum in den in Tabelle 2-13 angegebenen Konzentrationen zugegeben. Kulturen von *E. coli* und anderen Mikroorganismen, die zur späteren Inokulation einer anderen Kultur genutzt wurden, werden folgend, als Vorkulturen bezeichnet. Vorkulturen wurden entweder mit einer Einzelkolonie von LB-Agarplatten oder aus einer Kryokultur inokuliert und unter Standardbedingungen für 16 h inkubiert.

2.5.2.3 Kultivierung von *P. putida*

Die Kultivierung von *P. putida* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 30 °C unter Schütteln mit 130 UpM in zu maximal 10 % mit Medium gefüllten Erlenmeyerkolben. Auf Festmedium erfolgte die Inkubation auf LB-Agar bei 30 °C. Dem Medium wurde, sofern erforderlich, entsprechend der in Tabelle 2-13 angegebenen Konzentrationen ein Antibiotikum (oder gegebenenfalls mehrere Antibiotika) zur Selektion zugegeben.

Vorkulturen wurden entweder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder aus einer Kryokultur inokuliert und unter Standardbedingungen für 16 h inkubiert.

2.5.2.4 Nährmedien zur Anzucht von *S. cerevisiae*

Für die Anzucht von *S. cerevisiae* wurden Nährmedien verwendet, die nach Sherman, 2002 modifiziert wurden. Ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 2-12 aufgeführt. Bei dem Hefe Pepton-Dextrose-Medium (YPD-Medium) handelt es sich um ein Vollmedium. Das synthetische Dextrose-Medium (SD-Medium) ist ein Minimalmedium, welches zur Selektion auxotropher Stämme eingesetzt wurde. Da in dieser Arbeit ausschließlich der für Uracil (Ura) auxotrophe Stamm VL6-48 (Tabelle 2-7) verwendet wurde, wurde dem SD-Medium zur Selektion ein synthetischer Medienzusatz ohne Uracil SC-Ura entsprechend der Kaiser-Mixtur (Kaiser, 1994) hinzugefügt (Tabelle 2-2). Die Bestandteile des Selektionsmediums, SC-Ura, ein Hefe Stickstoff-Basismedium (YNB) sowie Glukose, wurden in 10x Konzentration in VE-Wasser gelöst und zur Sterilisation in separaten Gefäßen für 20 min bei 200 kPa und 121 °C autoklaviert (Systec VX-55). Vor Gebrauch wurden die Komponenten mit autoklaviertem VE-Wasser gemischt und so zur gebrauchsfertigen Konzentration verdünnt. Zur Herstellung des YPD Mediums wurde eine Fertigmixtur verwendet und nach Herstellerangaben zubereitet. Zur Herstellung von YPD-Festmedium wurde dem angesetzten Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar-Agar zugefügt. Im Fall von SD-Ura-Selektionsagarplatten, wurde das gewünschte Volumen VE-Wasser, abzüglich der benötigten Volumina der 10x Lösungen mit 15 g/l Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Aufschmelzen des Agars erfolgte die Zugabe der entsprechenden Mengen YNB, SC-Ura 10x Lösung, sowie steriler Glukoselösung. Folgend werden Hefe Festmedien als YPD- oder SD-Ura-Agar bezeichnet.

Tabelle 2-12: Auflistung der Inhaltsstoffe von verwendeten Hefemedien

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

2.5.2.5 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte bei 30 °C, unter Schütteln mit 130 UpM und in zu maximal 10 % mit YPD-Medium gefüllten Erlenmeyerkolben. Bei der Kultivierung auf Festmedium erfolgte die Inkubation auf YPD-Agar bei 30 °C.

Zur Anzucht von plasmidtragenden *S. cerevisiae*-Zellen wurde SD-Ura Selektionsmedium (flüssig oder fest) unter gleichen Bedingungen verwendet. Vorkulturen wurden entweder aus einer Einzelkolonie von YPD-Agar oder aus einer Kryokultur inokuliert und unter Standardbedingungen für 24 h inkubiert.

2.5.2.6 Kultivierung von *S. cerevisiae* zur Plasmidisolierung

Zur Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*-Klone nach der Transformation (Kapitel 2.5.5.4) wurden die Zellen in Flowerplates (m2p-labs GmbH, Baesweiler, Deutschland) kultiviert. Dazu wurden diese mit 1 ml SD-Ura-Medium zur Selektion befüllt und mit einer Einzelkolonien der gewachsenen Transformanten inokuliert. Die Flowerplates wurden mit sterilen *AeraSeals* (Excel Scientific, Victorville, USA) abgedeckt. Die Kulturen wurden anschließend bei 30 °C und 1000 UpM Schüttelfrequenz für 16 - 24 h inkubiert.

2.5.2.7 Dauerhafte Lagerung von Bakterien und Hefen

Um *E. coli*, *P. putida* oder *S. cerevisiae* Stämme dauerhaft zu lagern, wurden Kryokulturen hergestellt. Dazu wurden 1 ml einer Vorkultur mit 1 ml Glycerol (100 %) gemischt und in 2 ml Kryoröhrchen (Tabelle 2-1) bei -80 °C gelagert (modifiziert nach Koh, 2013).

2.5.3 Selektion von Bakterien

2.5.3.1 Antibiotika

Die zur Selektion eingesetzten Antibiotika (AB) sind in Tabelle 2-13 zusammengefasst. Die Sterilisation der Antibiotika Vorratslösungen wurde nach dem Lösen der Feststoffe durch Sterilfiltration (Spitzenvorsatzfilter, 0,2 µm) erreicht. In flüssigem Nährmedium wurden sie nach dem Autoklavieren, unmittelbar vor der Verwendung hinzugefügt. Bei Festmedien erfolgte die Zugabe nach dem Aufschmelzen des Mediums direkt vor dem Gießen von Platten bei Temperaturen unter 50 °C.

Tabelle 2-13: Auflistung der in dieser Arbeit genutzte Antibiotika in Vorrats- und Endkonzentrationen

Antibiotikum	Konz. der Vorratslösung [mg/ml]	<i>E. coli</i> : verwendete Konz. [µg/ml]	<i>P. putida</i> : verwendete Konz. [µg/ml]
Ampicillin (Amp)	100 in VE-Wasser	100	-
Gentamicin (Gm)	25 in VE-Wasser	10	25
Irgasan (Irg)	25 in 70 % EtOH	-	25
Kanamycin (Kan)	50 in VE-Wasser	50	25
Streptomycin (Sm)	100 in VE-Wasser	50	50
Tetracyclin (Tc)	50 in 70 % EtOH	10	50

2.5.3.2 Selektion durch Saccharose

Zusätzlich zur antibiotikabasierten Selektion wurde nach dem Einbringen eines Vektors zur direkten Integration in eines der *rrn*-Operons von *P. putida*, zusätzlich durch 25 % Saccharose (w/v) im Kulturmedium selektiert. Durch die Expression des Gens *sacB* kann so die Persistenz eines *single-crossover* bei der homologen Rekombination verhindert werden (Huang & Wilks, 2017). Im Fall des Auftretens einer *single-crossover* wird dabei *sacB* genomisch integriert und die kodierte Levansucrase exprimiert. Dies führt aufgrund des Abbaus der Saccharose und der damit einhergehenden Synthese von Fructosepolymeren, zum Tod insbesondere Gram-negativer Bakterien (Gay et al., 1985), wodurch dementsprechend solchen Zellen mit *double-crossover* angereichert werden.

Die Methode wurde adaptiert von Huang & Wilks, 2017. Es wurden *P. putida*-Zellen, in die ein Plasmid zur *rrn*-Integration durch Konjugation eingebracht wurde, in 5 ml LB-Flüssigmedium, versetzt mit 25 % Saccharose (w/v), für 48h bei 30 °C und 130 UpM kultiviert. Anschließend wurden 2 ml der Kultur bei 25150 g für 2 min zentrifugiert, die pelletierten Zellen in 1 ml LB-Medium resuspendiert und schließlich je 100 µl der Zellsuspension auf LB-Festmedium, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika sowie 25 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 30 °C kultiviert, um Einzelklone zu erhalten. Das LB-Medium wurde dazu doppelt konzentriert und anschließend mit einer 50 %igen (w/v) Saccharoselösung zu einfach konzentriertem LB-Medium mit 25 % igen (w/v) Saccharosegehalt verdünnt. Zur Herstellung entsprechenden Agars wurde das doppelt konzentrierte LB-Medium vor dem Autoklavieren mit 20 g/l Agar versetzt. Die Medienbestandteile sind folgend aufgeführt (Tabelle 2-14).

Tabelle 2-14: Inhaltsstoffe des mit Saccharose versetzten LB-Mediums zur *double-crossover* Selektion

Medium	Vorratslösungen zur Herstellung von LB-Medium mit 25 % Saccharose	
LB-Medium + Saccharose	LB-Medium Fertigmixtur (2x Konz.)	50 g/l
	Agar	20 g/l
(Lysogeny-Broth, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	Nach dem Autoklavieren zugefügt:	
	Saccharoselösung (50 % w/v) (sterilfiltriert)	500 ml/l

2.5.4 Kulturen zur Produktion verschiedener Metabolite

2.5.4.1 *P. putida*-Vorkulturen

Vorkulturen wurden im Medium der entsprechenden Hauptkulturen angezogen. Dazu wurde entsprechend selektives Medium in Kolben oder Flowerplates, je nach Hauptkultur, durch Zugabe einer Einzelkolonie von einer Agarplatte inokuliert und für 16 h bei 30 °C und 130 UpM, schüttelnd inkubiert. Die Hauptkulturen wurden ausgehend von den Vorkulturen, wenn nicht anderes angegeben, auf eine OD von 0,05 einer geeigneten Wellenlänge (Kapitel 2.5.1) inokuliert.

2.5.4.2 Expressionskulturen von *P. putida* in Flowerplates unter Standardbedingungen

Zur Produktion von Sekundärmetaboliten wurden Expressionskulturen in Flowerplates® (m2p-labs GmbH, Baesweiler, Deutschland) kultiviert. Für die Hauptkulturen wurden 0,8 ml selektives TB-Medium mit einer Vorkultur auf eine $OD_{650\text{ nm}} = 0,05$ inokuliert. Anschließend wurden die Flowerplates mit sterilen AeraSeals (Excel Scientific, Victorville, USA) abgedeckt. Die Standardbedingungen für die Inkubation solcher Expressionskulturen waren 30 °C, 1400 UpM Schüttelfrequenz bei einer Inkubationsdauer von 24 h. Abweichende Vorgehensweisen sind im entsprechenden Ergebniskapitel angegeben. Nach der Inkubation wurden die produzierten Substanzen aus den Zellen oder dem Überstand extrahiert.

2.5.4.3 Flowerplate Expressionskulturen von *P. putida* zur Mutasynthese

Bei der Kultivierung von plasmidtragenden *P. putida*-Stämmen zur Mutasynthese wurde in einem finalen Volumen von 1 ml des angegebenen Mediums kultiviert. Die Zielgenexpression wurde nach vier Stunden Kultivierungsdauer (wenn nicht anders angegeben) durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Parallel dazu wurde das zur Mutasynthese benötigte Vorstufenmolekül MAP zugegeben, sodass eine Konzentration von 1 mM MAP erreicht wurde (Zugabe von 20 µl einer 50 mM Lösung in DMSO). Im Fall der Kultivierung des Stammes *P. putida* pig-r2 Δ pigD, welcher als Referenz zur Einordnung der Mutasyntheseeffizienz verwendet wurde, erfolgte keine Induktion mit IPTG, da in diesem Stamm alle zur Mutasynthese notwendigen Biosynthesegene, genomisch integriert vorlagen und konstitutiv exprimiert wurden. Die Kultivierung erfolgte je nach Experiment, bei 25 °C oder 30 °C über 24 h bei 1200 UpM.

2.5.4.4 *P. putida*-Expressionskulturen zur Cyclo- und Norprodigiosinproduktion in Kolben

Die Kultivierung von Expressionsstämmen zur Bildung von Cyclo- oder Norprodigiosin in größerem Maßstab erfolgte in Rundkolben mit 100, 500 oder 1000 ml Volumen, die zu 10 % mit dem angegebenen Medium (LB oder TB) befüllt und aus einer entsprechenden Vorkultur inokuliert wurden. Die Kultivierungen erfolgten je nach Experiment bei 20 °C, 25 °C oder 30 °C und mit Zusatz von 0,5 mM IPTG nach 4 h initialer Kultivierung über insgesamt 24, 48 oder 72 h bei 130 UpM. Im Fall der Produktion von Norprodigiosin war keine IPTG-Zugabe erforderlich, da das artifizielle Gencluster konstitutiv exprimiert wird.

2.5.5 Einbringen von DNA in Bakterien und Hefen

2.5.5.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Um chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen zu erzeugen, wurde eine modifizierte Variante der Calciumchlorid/Magnesiumchlorid-basierten Methode (Hanahan, 1983) angewandt. Aus einer *E. coli*-Vorkultur wurde eine Hauptkultur (50 ml LB) auf eine OD_{580 nm} von 0,05 inokuliert und unter Standardbedingungen bis zum Erreichen einer OD_{580 nm} von 0,5-0,7 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen der Kultur durch Zentrifugation (5 min, 2915 g, 4 °C) pelletiert und in 10 ml gekühltem MgCl₂ (100 mM) resuspendiert. In diesem wurden sie 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 2915 g, 4 °C) wurde das Pellet in 4 ml gekühltem CaCl₂ (100 mM) aufgenommen und mit 1 ml gekühltem Glycerol (80 %) gemischt. Die Suspension der chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen wurde in 100 µl Aliquots auf 1,5 ml **Reaktionsgefäße aufgeteilt und** bei -80 °C eingefroren.

2.5.5.2 Herstellung Lithiumacetat-kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen wurde ein modifiziertes Protokoll nach der LiAc/SS carrier DNA/PEG Methode (Gietz & Schiestl, 2007) angewandt. Aus einer Vorkultur wurde eine 50 ml Hauptkultur in YPD Medium auf eine OD_{600 nm} von 0,25 inokuliert und bis zum Erreichen einer OD_{600 nm} von 0,8-1,0 inkubiert (Kapitel 2.7.2). Die Zellen der Kultur wurden durch Zentrifugation (5 min, 2915 g, 4 °C) pelletiert und anschließend in 25 ml VE-Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 2915 g, 4 °C). Die Zellen wurden daraufhin in 1 ml 100 mM Lithiumacetat (LiAc) resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 25150 g) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 500 µl LiAc (100 mM) resuspendiert. Die LiAc-kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen wurden in Aliquots zu je 50 µl aufgeteilt und anschließend transformiert. Nicht unmittelbar verwendete Aliquots wurden maximal 2 Tage bei 4 °C bis zum Gebrauch gelagert.

2.5.5.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen wurde die Hitzeschock-Methode (Hanahan, 1983) verwendet. Zunächst wurde ein Aliquot von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen (Kapitel 2.5.5.1) auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden je nach Plasmidkonzentration (10 – 300 ng/μl), 1-10 μl einer Lösung mit isolierter Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes einer klassischen Klonierung zugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Ansatz einem Hitzeschock bei 42 °C für 60-120 s unterzogen, wobei größere Konstrukte länger inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Zellen mit 700 μl LB-Medium versetzt. Zur Expression des Plasmidresistenzgens wurde der Transformationsansatz bei 37 °C für 2 h am Rotatorrad inkubiert. Die Zellsuspension wurde folgend 1 min bei 13520 *g* zentrifugiert und 650 μl des Überstandes verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet im verbleibenden Überstand aufgenommen und auf selektiven LB-Agarplatten (Kapitel 2.5.3) ausplattiert. Es folgte eine Inkubation über 24 h bei 37 °C.

2.5.5.4 Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Zur Transformation von *S. cerevisiae* wurde ein modifiziertes Protokoll nach der LiAc/SS *carrier* DNA/PEG Methode (Gietz und Schiestl, 2007) angewandt. Zuerst wurden die Zellen eines Aliquots der LiAc-kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen (Kapitel 2.5.5.2) durch Zentrifugation (30 s, 13520 *g*) sedimentiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 36 μl LiAc (1 M) resuspendiert und mit 240 μl PEG 3350 (50 % *w/v*), 50 μl *carrier* DNA (2 mg/ml Lachssperma SS DNA in TE-Puffer (10 min bei 99 °C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt) sowie der zu transformierenden DNA, gelöst in 34 μl VE-Wasser, versetzt. Der Transformationsansatz wurde durch vorsichtiges Vortexen bei geringer Drehzahl gemischt. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 min im Thermomixer (Eppendorf ThermoMixer C). Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation pelletiert (30 s, 13520 *g*), der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml YPD Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 2 h bei 600 UpM und 30 °C im Thermomixer inkubiert. Zum Ausplattieren wurden die Zellen zuerst zentrifugiert (1 min, 25150 *g*) und das entstandene Pellet in 200 μl VE-Wasser resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 180 μl (90 %) und 20 μl (10 %) aufgeteilt und jeweils auf einer Platte SD_{-Ura}-Agar ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 2-4 Tage bei 30 °C.

2.5.5.5 Plasmidübertragung durch Konjugation von *E. coli* zu *P. putida*

Zur Übertragung von Plasmiden in *P. putida* wurde der natürliche Mechanismus der Konjugation genutzt. Dazu wurde der *E. coli* Stamm S17-1 (Simon et al., 1983) als Donorstamm verwendet. Chemisch-kompetente Zellen (Kapitel 2.5.5.1) dieses Stammes wurden mit dem zu übertragenden Plasmid transformiert. Der horizontale Gentransfer erfolgte nach einem modifizierten Protokoll (Simon et al., 1986, 1983).

Dazu wurden Vorkulturen des Donorstammes *E. coli* S17-1 und des Rezipientenstammes *P. putida* KT2440 angezogen. Es wurden 250 µl der Kultur des Donorstammes und 500 µl der Kultur des Rezipientenstammes in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengegeben. Durch Zentrifugation (1 min, 25150 g) wurden die Zellen sedimentiert, in 1 ml LB-Medium gewaschen und erneut sedimentiert (1 min, 25150 g). Anschließend wurden 850 µl des Überstands verworfen und die Zellen in den verbleibenden 150 µl LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine Celluloseacetat-Membran (Tabelle 2-1) gegeben, welche zuvor auf eine LB-Agarplatte gelegt wurde. Anschließend wurden die Zellen bei 30 °C für ca. 16 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium in einem 2 ml Reaktionsgefäß durch Vortexen von der Celluloseacetat-Membran gewaschen. Die resuspendierten Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (1 min, 25150 g) und das entstandene Pellet in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Daraufhin wurden 100 µl der Zellsuspension auf LB-Agarplatten, versetzt mit den für *P. putida* geeigneten Antibiotikakonzentrationen (Tabelle 2-13) und 25 µg/ml Irgasan, ausplattiert. Das erste Antibiotikum wurde dabei zur Selektion von *P. putida* auf den Erhalt des Plasmids bzw.-Transposons oder Interposons und Irgasan zur Verhinderung des Wachstums der *E. coli* S17-1 Donorzellen verwendet. Irgasan beeinflusst dabei das Wachstum von *P. putida* nicht. Die Inkubation erfolgte für 1-2 Tage bei 30 °C.

2.5.5.6 Elektroporation von *P. putida*

Zur Transformation von *P. putida* durch Elektroporation wurde ein modifiziertes Protokoll bei Raumtemperatur verwendet (Tu et al., 2016). Vorbereitend wurde eine Vorkultur der zu transformierenden *P. putida*-Stämme über 16 h in LB-Medium bei 30 °C inkubiert. Es wurde 1 ml dieser Kultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß übertragen und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (13520 g, 1 min). Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml VE Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert (13520 g, 1 min) um die Zellen zu waschen. Der Überstand wurde verworfen. Nach einem weiteren Waschschriff mit 1 ml VE Wasser, Zentrifugation (13520 g, 1 min) und dem Verwerfen des Überstands, wurden die Zellen in 80 µl VE Wasser resuspendiert und die Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben (max. 300 ng in ≤ 5 µl). Die Zellsuspension mit der DNA wurde in eine Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite) übertragen und in einem Elektroporator (MicroPulser Electroporator, Bio-Rad Laboratories) mit dem Programm EC1 (1 Puls mit 1,8 kV) elektroporiert. Anschließend wurden 700 µl LB-Medium in die Küvette gegeben, die Zellsuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 30 °C für 2,5 h schüttelnd inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 50 µl der Zellen auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und 16 h bei 30 °C inkubiert.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Angewendete Klonierungsmethoden

2.6.1.1 Rekombination von DNA in *S. cerevisiae*

Nach einer Transformation von Hefezellen (Kapitel 2.5.5.2) mit allen zur Rekombination eines γ TREX-Vektors notwendigen DNA-Fragmenten, wurden diese durch homologe Rekombination kombiniert. Dabei werden die homologen Bereiche aneinander gelagert und zu einem zirkulären DNA-Strang zusammengefügt (Heyer & Kanaar, 2004). Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Fragmente zur homologen Rekombination in *S. cerevisiae* wurden durch Restriktionsendonuklease-vermittelte Hydrolyse isoliert oder durch PCR amplifiziert (Kapitel 2.6.2.6). Die Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen erfolgte ausschließlich zum Linearisieren des γ TREX-Vektors. Alle weiteren DNA-Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und anhand der eingesetzten Primer mit den zur Rekombination der Fragmente erforderlichen homologen Bereichen versehen. Dazu wurden die Primer mit Hilfe des Clone Manager 9.5 mit homologen Überhängen gestaltet. Hierbei wurden ca. 30 Bp lange Überhänge angefügt. Es wurden je 0,1 - 1 μ g jedes DNA-Fragments transformiert. Die absoluten Mengen der Fragmente wurden dabei im äquimolaren Mengenverhältnis eingesetzt.

2.6.1.2 In-Fusion Klonierung

Zur ligationsunabhängigen *in vitro* Konstruktion von Vektoren aus mehreren DNA-Fragmenten in einem Schritt wurde das In-Fusion Kit von Takara Bio verwendet. Dieses Kit erlaubt die Einbringung von einem oder mehreren DNA-Fragmenten in einen linearisierten Vektor. Vor der Klonierung wurden die zu kombinierenden DNA-Fragmente mit primervermittelten Überhängen durch PCR erzeugt (Kapitel 2.6.2.6). Diese waren entweder homolog zu den Enden des linearisierten Vektors oder zu den Enden weiterer Inserts. So wurde die Klonierung aller Inserts in gewünschter Reihenfolge und Orientierung in den linearisierten Vektor ermöglicht. Sowohl das Primerdesign als auch die Durchführung der Klonierung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Alle benötigten DNA-Fragmente wurden dementsprechend in einem Klonierungsansatz mit dem In-Fusion Snap Assembly Mastermix in einem Gesamtvolumen von 10 μ l vereint. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 50 °C. Die erzeugten Klonierungsprodukte wurden entweder direkt für eine Transformation in *E. coli* Stellar-Zellen genutzt oder bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, in der alle zur Klonierung notwendigen Bestandteile außer dem In-Fusion Mastermix zusammengegeben wurden, um nach der Transformation die Klonierungseffizienz gegenüber möglicherweise vorhandener retransformierter Ausgangsvektoren abzuschätzen.

2.6.1.3 Rekombination von DNA-Fragmenten durch Ligation

Die Klonierung von DNA-Fragmenten durch Ligation erfolgte mit der T4 DNA Ligase (Weiss et al., 1968) nach Herstellerangaben bei 16 °C für 30 min oder unter alternativen Inkubationsbedingungen bei gleicher Temperatur über Nacht. Bei einer Ligation mit einem phosphorylierten Insert wurde das Vektorfragment mit der FastAP Alkaline Phosphatase nach Herstellerangaben dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern.

2.6.1.4 Überprüfung der erzeugten Plasmide

Aufgrund der Größe der erzeugten Plasmide von oftmals über 20 Kb wurden diese nicht immer vollständig sequenziert. Aus diesem Grund wurden nach der Klonierung Testrestriktionen mit mindestens zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen durchgeführt (Kapitel 2.6.2.3) und anhand der Analyse der Fragmente durch Agarosegelelektrophorese die korrekte Assemblierung überprüft (Kapitel 2.6.2.4). Da zudem meist, durch die Expression der klonierten Gene, spezifische Substanzen produziert oder umgewandelt wurden, erfolgte eine weitere indirekte Prüfung durch die Analyse der produzierten Metabolite (Kapitel 2.7).

2.6.2 Manipulation von DNA

2.6.2.1 Plasmidisolation aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem innuPREP Plasmid Mini Kit nach dem Herstellerprotokoll. Das Kit basiert auf der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit nukleasefreiem Wasser. Die isolierte Plasmid-DNA wurde entweder sofort verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.6.2.2 Plasmidisolation aus *S. cerevisiae*

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* Kulturen wurde mit einer Kombination der Kits Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II und innuPREP Plasmid Mini durchgeführt. Dazu erfolgte die Sedimentation der Zellen aus 1 ml Kultur (1 min, maximale UpM), welche zur Amplifikation der Plasmide in SD_{-Ura}-Medium kultiviert wurden (Kapitel 2.5.2.6). Das Pellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer aus dem innuPREP Plasmid Mini Kit resuspendiert, die Suspension wurde mit 2,5 µl Zymolyase (5 U/µl) aus dem Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II vermischt und für 2,5 h bei 37 °C am Rotatorrad inkubiert. Anschließend wurde nach dem Protokoll des innuPREP Plasmid Mini Kits weiter verfahren, indem zunächst die Zugabe der weiteren Puffer und schließlich die Bindung der DNA an die Säule erfolgten. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit nukleasefreiem Wasser. Zur Elution wurden 15 µl H₂O verwendet. *E. coli*-Zellen wurden entweder sofort mit der Plasmid-DNA transformiert (Kapitel 2.5.5.3) oder die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.6.2.3 DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen

Die DNA-Hydrolyse erfolgte durch Restriktionsendonukleasen. Diese wurden immer in den vom Hersteller beigelegten Puffern und unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Die Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde zur Analyse von Plasmiden sowie zur Gewinnung von hydrolysierten Plasmidfragmenten oder PCR-Produkten eingesetzt. Die zur Analyse des jeweiligen Plasmids geeigneten Restriktionsendonukleasen wurden mit der Software Clone Manager 9.5 auf Basis der Plasmidkarten ermittelt.

2.6.2.4 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die Agarosegelelektrophorese angewandt (modifiziert nach Green and Sambrook, 2012). Dazu wurden, in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente, Agarosegele mit einer Konzentration von 1-2 % (w/v) Agarose in 0,5x TBE-Puffer (Tabelle 2-15) verwendet. Zur Detektion der DNA-Fragmente unter Blau- und Grünlicht LEDs wurden 400 ml Agaroselösung mit 5 µl Midori Green Advance (Nippon Genetics) Lösung versetzt. DNA-Proben wie PCR- oder Restriktionsansätze wurden mit 20 % des Gesamtvolumens an 5x DNA-Probenpuffer (Tabelle 2-15) versetzt und in die Geltaschen überführt. Als Größenstandard wurde die GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (ThermoFisher) eingesetzt. Die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgte in Wide Mini-Sub Cell GT Elektrophorese-Kammern (Bio-Rad) in 0,5x TBE-Puffer bei einer Spannung von 110 V für 30-60 min. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde ein FastGene Blue/Green LED Transilluminator XL (Wellenlänge 480 – 530 nm) verwendet. Mit einem Eagle Eye II-System (Stratagene) wurden währenddessen die Gele durch digitale Fotografien dokumentiert.

Tabelle 2-15: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung	
5x DNA-Probenpuffer	EDTA	100 mM
	Glycerin	40 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
TBE Puffer (0,5x)	Tris	45 mM
	Borsäure	45 mM
	EDTA	1 mM

2.6.2.5 Sequenzüberprüfung von Plasmiden

Zur Sequenzierung von klonierten Plasmiden oder PCR-Fragmenten wurde die Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) oder die Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Deutschland) beauftragt. Zum Abgleich der Sequenzen wurde die im Clone Manager 9.5 implementierte Alignment Funktion genutzt.

2.6.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* wurde die PCR (modifiziert nach Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) eingesetzt. Dabei wurde die Phusion® High-Fidelity, die Phire Hot Start II oder die Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase eingesetzt. Die zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2-9 aufgeführt. Die Reaktionsansätze wurden auf Basis eines Standardprotokolls hergestellt (Tabelle 2-16), welches bei Bedarf angepasst wurde. Als *Template* für PCRs wurde entweder Plasmid-DNA oder genomische DNA (20-100 ng/μl) eingesetzt.

Tabelle 2-16: Beispielhafte Ansatzzusammensetzung von 20 und 50 μl PCR-Reaktionen

Komponente	20 μl Ansatz	50 μl Ansatz
HF-/GC-Puffer (5x)	4 μl	10 μl
dNTP Mix (10 mM)	0,4 μl	1 μl
Primermix (10 pmol)	0,4 μl	1 μl
<i>Template</i> -DNA (20-100 ng)	X μl	X μl
Polymerase	0,4 U	1 U
H ₂ O	Auf 20 μl auffüllen	Auf 50 μl auffüllen
Optionale Komponenten		
DMSO (max. 10 %)	0-2 μl	0-5 μl
5x Q5 High GC Enhancer	0-4 μl	0-10 μl

Die verwendeten PCR-Programme gingen von einem Basis-Programm (Tabelle 2-17) aus. Dieses wurde passend zu den jeweils verwendeten DNA-Polymerasen, *Templates*, den Oligonukleotiden und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst. Die Hybridisierungstemperatur wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide (T_m) nach Angaben des Polymeraseherstellers gewählt. Aufgrund der Länge der hier verwendeten Primer und der damit einhergehenden hohen Schmelztemperatur wurde meist ein sogenanntes *2-Step* Protokoll durchgeführt, bei dem ein separater Hybridisierungsschritt entfällt. Alternativ wurde das gebräuchlichere *3-Step* Protokoll (bei dem die Hybridisierung einen einzelnen Schritt darstellt) verwendet.

Tabelle 2-17: PCR-Programme von 2-Step und 3-Step PCR, die nach Bedarf angepasst wurden

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	2-Step	3-Step
1.	Initiale Denaturierung	98 °C	1-5 min	1-5 min
2.	25-45 Zyklen	Denaturierung	98 °C	10-30 s
3.		Hybridisierung	T _m	10-30 s
4.		Elongation	72 °C	15-45 s pro Kb
5.	Finale Elongation	72 °C	10 min	10 min

2.6.2.7 Reinigung von DNA-Fragmenten

In einigen Fällen war es notwendig DNA-Fragmente zu reinigen, da sie aus einem Agarosegel ausgeschnitten wurden oder nach der PCR von Puffern und Salzen befreit werden mussten. In beiden Fällen wurde das innuPREP DOUBLEpure Kit für die Reinigung verwendet. Die Funktion dieses Kits basiert auf der von Vogelstein & Gillespie 1979 entwickelten Methodik. Die Durchführung erfolgte jeweils nach dem Herstellerprotokoll. Die gereinigten Fragmente wurden in beiden Fällen mit nukleasefreiem Wasser eluiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.6.2.8 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration jeglicher isolierter DNA wurde photometrisch über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm im NanoDrop 2000c Spektralphotometer bestimmt. Der Quotient aus der Absorption bei $\lambda = 260/280$ nm zeigte Proteinverunreinigungen (Herstellerangaben: ca. 1,8 für reine DNA) an, während der Absorptionsquotient von $\lambda = 260/230$ nm als ein Maß für die Verunreinigung mit Salzen oder Lösungsmitteln diente (Herstellerangaben: 1,8 - 2,2 für reine DNA).

2.7 Biochemische Analytik

2.7.1 LacZ basiertes Screening auf X-Gal-Agarplatten

Zur Selektion von *P. putida*-Klonen anhand der Expression von *lacZ* wurden Selektionsagarplatten zusätzlich zum geeigneten Antibiotikum mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) versetzt (0,3 mM Vorratslösung: 50 mM in DMSO/Ethanol (30/70 %)) (Horwitz et al., 1964). Die β -Galactosidase kann dabei das X-Gal hydrolysieren, wodurch das freigewordene 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol mit dem Luftsauerstoff zum tiefblauen Indigofarbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo reagiert (Horwitz et al., 1964; Juers et al., 2012). Transkonjuganten wurden nach der Übertragung eines γ TREX- bzw. pYT-Plasmids auf solchen Platten ausplattiert und mindestens 16 h bei 30 °C inkubiert (Domröse et al., 2017). Klone, bei denen eine Transkription des promotorlosen *lacZ* Reportergens stattfand, zeigten somit eine Transkription des gesamten Genclusters an und färbten sich auf den Platten blau.

2.7.2 Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität (ONPG-Test)

Die Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität wurde in Abwandlung nach Miller, 1972 mit dem Substrat *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) durchgeführt. Zuerst wurde die OD der Expressionskulturen bei einer geeigneten Wellenlänge (Kapitel 2.5.1) bestimmt. Um die Aktivität der β -Galactosidase zu bestimmen, wurden den Expressionskulturen 10 μ l entnommen. Zu einer solchen Probe wurden 390 μ l 1x Z-Puffer, 25 μ l Chloroform und 25 μ l 4x Z-Puffer gegeben und durch Vortexen gemischt (Tabelle 2-18). Der Ansatz wurde 3 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 μ l ONPG-Substrat-Lösung gestartet. Nach 2 min wurde die β -Galactosidase durch Zugabe von 400 μ l Stopplösung inaktiviert, wobei das Reaktionsprodukt *o*-Nitrophenol durch einen pH-*shift* vollständig in seine anionische, gelbe Form überführt wird. Durch Zentrifugation wurden die Zelltrümmer sedimentiert (1 min, 25150 g) und die Absorption des Überstandes bei $\lambda = 420$ nm photometrisch in einem Plattenphotometer bestimmt. Als Leerprobe (*blank*) für diese Messung wurde die folgende Mischung verwendet: 400 μ l Substrat-Lösung, 450 μ l 1x Z-Puffer, 400 μ l Stopplösung.

Tabelle 2-18: Puffer und Lösungen zur Durchführung des ONPG-Tests

Puffer	Zusammensetzung	
4x Z Puffer (pH 7)	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ KCl β -Mercaptoethanol, (jeweils zur Anwendung frisch zugegeben).	60 mM 40 mM 10 mM 50 mM
Substrat-Lösung	ONPG in 1x Z-Puffer (jeweils zur Anwendung frisch angesetzt)	0,8 mg/ml
Stopplösung	Na ₂ CO ₃	1 M

Miller-Units wurden folgendermaßen berechnet:

$$\left(\frac{A_{420}}{OD_{600}} \right) \times \frac{(V_{ges} \times 1000)}{V_{Probe} \times t} = \beta - \text{Galactosidaseaktivität [Miller - Units]}$$

A₄₂₀ = im Assay gemessene Absorption bei 420 nm

OD_{600 nm} = Zelldichte

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

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

t = Zeit (2 Min)

Da in dieser Arbeit das Gen *lacZ*, welches die β -Galactosidase kodiert, als Reporter gen promotorlos hinter verschiedene Gencluster kloniert wurde, war dessen Expressionsstärke unbekannt. Um eine valide Quantifizierung gewährleisten zu können, musste das Substrat ONPG jedoch über die Dauer der Inkubation im Überschuss im Ansatz vorliegen. Wäre dies nicht der Fall, müsste die Inkubationszeit oder die enzymhaltige Lysatmenge verringert werden.

Es wurden 10 μ l Flüssigkultur zur Herstellung des Lysats gewählt. Um zu gewährleisten, dass die im Reaktionsansatz vorhandene Menge des Substrats ONPG während der Dauer der Reaktion im Überschuss vorhanden ist, wurde dies mit Hilfe eines starken (PCA1) und eines schwachen (PCA10) produzierenden *P. putida*-Stammes getestet. Diese Stämme tragen das *lacZ* Gen als Transkriptionsreporter stromabwärts des PCA-Genclusters und dienten so der Validierung dieser Methode über verschiedene Inkubationszeiten (Kapitel 2.8.1.3). Dazu wurden Kulturen der PCA Produktionsstämme PCA1 und PCA10 aus Vorkulturen auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,05 inokuliert und jeweils in 1 ml TB-Medium, über 24 h, bei 30 °C und 900 UpM in Roundwell Platten kultiviert. Anschließend wurde die OD der Kulturen bei $\lambda = 600\text{ nm}$ bestimmt und 10 μ l der Kulturen zur Durchführung der ONPG-Tests verwendet.

In Abbildung 2-1 ist die Aktivität der β -Galactosidase bei variierteter Dauer der Reaktionszeit (von 0,5 – 10 min) dargestellt. Nach der Inkubation wurde das Substrat durch Zugabe der Stopplösung vollständig in seine anionische gelbe Form, *o*-Nitrophenol umgesetzt. Dargestellt ist, dass sowohl beim schwachen Produzenten PCA10 als auch beim starken Produzenten PCA1 ab einer Inkubationszeit von 2 min der Wert der bestimmten Miller Units bei zunehmenden Inkubationszeiten nicht signifikant abfällt, was bedeutet, dass auch nach 10-minütiger Inkubation noch genug Substrat vorhanden ist und das Signal noch korrekt gemessen werden kann. Unterhalb von 2 min wurden größere Schwankungen festgestellt. Nachdem sichergestellt wurde, dass das im ONPG-Test produzierte Signal ab einer Inkubationsdauer von 2 min korrekt gemessen werden kann, wurde die Inkubationszeit der Tests auf 2 min festgelegt.

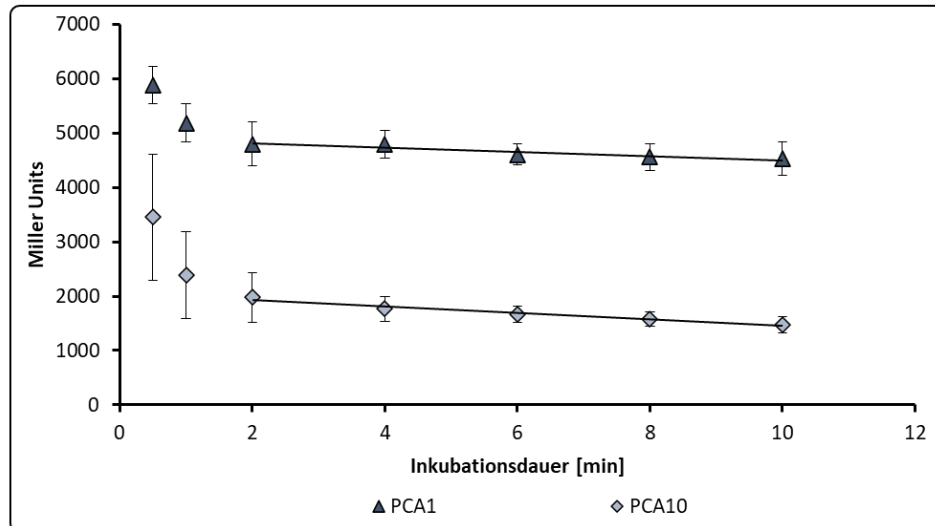


Abbildung 2-1: Verifizierung des Substratüberschusses bei der Durchführung eines ONPG-Tests

Dargestellt sind die Werte der Miller Units, die nach den unterschiedlichen angegebenen Inkubationsdauern des ONPG Substrats mit den Proben für zwei *P. putida*-Expressionsstämme (PCA1 und PCA10) bestimmt wurden. Werte unter 2 min weisen eine hohe Varianz auf, stabilisieren sich jedoch ab dieser Inkubationszeit, wodurch sich ein nahezu konstanter Wert über die evaluierte Inkubationsdauer von max. 10 min einstellt. Das fehlende Abfallen der Werte zeigt, dass auch nach 10-minütiger Inkubation noch ausreichend ONPG als Substrat vorhanden ist und somit die Aktivität der β -Galactosidase korrekt bestimmt werden kann. Gezeigt sind die Mittelwerte von mehreren Einzelmessungen ($n \geq 3$). Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angegeben. Die Werte, welche die geeignete verifizierte Dauer der Inkubation angeben, sind durch eine Ausgleichsline verbunden.

2.7.3 Manuelles Screening nach fluoreszierenden Kolonien auf Agarplatten

Um *eYFP*- und *mCherry*-exprimierende *P. putida*-Klone auf LB-Agarplatten zu identifizieren, wurden Transkonjuganten nach der Übertragung eines entsprechenden pYT-Plasmids, das eines der Gene kodiert, auf Agarplatten ausplattiert und 16 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien unter dem Fast Gene® Blue/Green LED Transilluminator XL Geldokumentationssystem beleuchtet. Da die LEDs mit Licht im Wellenlängenbereich von 480 bis 530 nm strahlen, regten sie sowohl *eYFP* als auch *mCherry* an, sodass die Fluoreszenz von Klonen, die diese Proteine exprimierten, unter dieser Beleuchtung photodokumentiert und markiert werden konnte um diese zu selektieren (Kofler, 2019).

2.7.4 Isolierung fluoreszierender Zellen mittels FACS

Zur Detektion einzelner Zellen von *P. putida*-Expressionsstämmen mit Fluoreszenzreportern wurde das FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-Gerät BD FACSAria III (BD Biosciences, San Jose, USA) verwendet. Dieses ermöglichte die automatisierte Isolierung fluoreszierender Zellen aus Zellgemischen.

Vorbereitend wurden die Zellen eines Konjugationsansatzes (Kapitel 2.5.5.5) zur Inokulation von Vorkulturen verwendet. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Kulturen zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in 1x PBS-Puffer (Tabelle 2-19) resuspendiert. Dabei wurde eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,5 eingestellt. Zur FACS-Messung wurde die Suspension anschließend mit Saline (0,9 % NaCl-Lösung) verdünnt um eine event-Rate von 8000-12000 Ereignissen/s zu erreichen.

Die Gates (manuell wählbare Bereiche in den vom FACS-Gerät erstellten Graphen) in den Auftragungen des FSC-H (*forward scatter height*) gegen den SSC-H (*side scatter*) wurden so gewählt, dass eine Population aus einzelnen Zellen für die Fluoreszenzmessung erkennbar war. Mit der Auftragung des FSC-H gegen den FSC-W (*forward scatter width*) und entsprechendem *gating* wurden Zellaggregate ausgeschlossen. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten bei verschiedenen Anregungswellenlängen gemessen und gegen den FSC-H aufgetragen. Die Anregung von mCherry erfolgte bei 561 nm und die Detektion unter Verwendung des 610/20 nm-Filters. Für die Anregung von eYFP wurde mit 488 nm angeregt und die eYFP-Emission unter Verwendung des Filters 530/30 nm detektiert. Für die Einzelzellensortierung wurden die Fluoreszenzintensitäten der Transkonjuganten mit der Negativkontrolle wildtypischer *P. putida*-Zellen verglichen und Zellen mit einer höheren Fluoreszenzintensität auf eine selektive LB-Agarplatte sortiert (Kofler, 2019).

Tabelle 2-19: Zusammensetzung von 1x PBS-Puffer

Inhaltsstoff	Endkonzentration
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

2.8 Analytik von synthetisierten Sekundärmetaboliten

2.8.1 Extraktion der produzierten Sekundärmetabolite aus *P. putida*

2.8.1.1 Kleinskalige Extraktion von Violaceinen und Prodigininen aus Zellpellets

Zur Extraktion von Prodigiosin aus *P. putida*-Zellen aus Kulturen im ml-Maßstab wurden 500 µl Kultur aus den Expressionskulturen (Kapitel 2.5.4) entnommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (2 min, 13520 g) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 25 µl H₂O (VE) gelöst und zum Zellaufschluss in 1 ml angesäuertem Ethanol (96%igem Ethanol (p.a.) + 4%iger 1 M HCl (v/v)) resuspendiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation sedimentiert (2 min, 25150 g) und der Überstand zur Analyse weiterverwendet. Der Zellaufschluss von violaceinbildenden Kulturen erfolgte mit Ethanol (100 %, p.a.). Bei der kleinskaligen Extraktion von Zellen aus abweichenden Volumina der Expressionskulturen im ml-Maßstab, wurden die Volumina der in den folgenden Schritten eingesetzten Lösungen entsprechend angepasst.

2.8.1.2 2-Phasen Extraktion zur Isolation und Konzentration von Prodigininen

Zur Extraktion und Konzentrierung von Prodigininen aus Kulturvolumina von 10 ml (Kapitel 2.5.4.4) wurde eine Extraktion in Ethanol mit anschließender 2-Phasen Extraktion angewendet. Dazu wurden die Zellen der gesamten Kultur durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 2915 g bei 4 °C).

Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 1 ml H₂O (VE) resuspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und erneut pelletiert (25150 g, 5 min bei 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, 100 µl H₂O zugegeben und das Zellpellet durch Vortexen suspendiert. Zum Zellaufschluss wurde der Zellsuspension 1 ml Ethanol (*p.a.*) zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Während einer Inkubationszeit von 10 min bei 45 °C erfolgte 2x eine Durchmischung durch Vortexen. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugieren pelletiert (25150 g, 5 min bei 4 °C), der ethanolische Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301) bei 45 °C bis auf ca. 100 µl Volumen konzentriert. Um das Wasser und die wasserlöslichen Bestandteile in den Proben zu entfernen, wurden 500 µl gesättigte NaCl-Lösung (in H₂O VE) sowie 500 µl Ethylacetat zugegeben und durch Vortexen gemischt. Zur Phasentrennung wurde 1 min bei 25150 g zentrifugiert, sodass die organische Phase abgenommen werden konnte. Die Extraktion wurde durch die Zugabe von 500 µl Ethylacetat wiederholt, die obere Phase abgenommen und mit der ersten vereint. Die Ethylacetat-Proben wurden anschließend getrocknet (Concentrator 5301 bei 45 °C). Die extrahierten Substanzen wurden schließlich in definierten Volumina Methanol bzw., Ethanol oder Ethanol + 4%iger HCl gelöst und 150 µl der Proben zur weiteren Analyse in HPLC-Vials überführt.

2.8.1.2.1 Extraktion aus größeren Kulturvolumina

Zur Extraktion der Zellen aus 50-100 ml Kulturen aus Rundkolben (Kapitel 2.5.4.4) wurde das gesamte Verfahren im größeren Maßstab durchgeführt. Abweichend zur Extraktion im kleinen Maßstab (Kapitel 2.8.1.2) wurde dem Ethanolextrakt hier eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugesetzt, um eine starke Polarität zu erzeugen, parallel die Proteine auszufällen und so im nächsten Schritt den Übergang des unpolaren Prodiginins in die organische Phase zu begünstigen. Gleichzeitig konnten so die in der Lösung enthaltenen Proteine gefällt werden. Diese wurden vor dem Ausschütteln durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde in einen Scheidetrichter überführt und zweimal mit 15 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Anschließend wurde das Ethylacetat mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (Rotavapor® R-100) entfernt, der Extrakt getrocknet und anschließend zur weiteren Analyse in einem definierten Volumen Methanol bzw., Ethanol *p.a.* oder Ethanol + 4%iger HCl gelöst.

2.8.1.3 Kleinskalige Extraktion von Phenazin-1-Carboxylsäure (PCA) aus Kulturüberständen

Die Extraktion von PCA wurde in Anlehnung an Bonsall et al., 1997; Ge et al., 2004 mit Ethylacetat (EtAc) aus angesäuerten Kulturüberständen durchgeführt. Dazu wurden 750 µl der Expressionskulturen (Kapitel 2.7.2) entnommen und die Zellen durch Zentrifugation (2 min, 25150 g) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden dem Überstand 100 µl 6 M HCl zugegeben und durch Vortexen gemischt. Die Extraktion des PCA erfolgte anschließend durch 2-faches Ausschütteln mit 500 µl Ethylacetat.

Dazu wurde die Suspension 15 s gevortext und das Gemisch zentrifugiert (1 min, 25150 g), um eine bessere Phasentrennung zu erreichen. Die organische Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Verfahren wurde anschließend ein weiteres Mal wiederholt und die zweite organische Phase nach dem Abnehmen mit der ersten vereint. Das Ethylacetat wurde anschließend in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301) bei 30 °C getrocknet (Herstellereinstellungen für Lösungen mit hohem Dampfdruck). Das PCA wurde anschließend, abhängig von der Menge, zur weiteren Analyse in 1-10 ml Ethanol (p.a.) vollständig gelöst.

2.8.1.4 Kleinskalige Extraktion von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd (MBC)

Die Extraktion von MBC erfolgte nach der von Schinya Ibrahim beschriebenen Methode (Ibrahim, 2019). Zur Vorbereitung dieser Proben wurden die *P. putida*-Stämme MBC13, 17 und 18 in 1 ml TB-Medium in Flowerplates, bei 30 °C und 1400 UpM über 24 h kultiviert, nachdem sie auf eine OD_{650 nm} von 0,05 inokuliert wurden. Anschließend wurden 700 µl der Zellkultur entnommen und die Zellen durch Zentrifugation (25150 g, 5 min) sedimentiert. Das Pellet wurde in 300 µl Methanol resuspendiert und im Ultraschallbad (Sonorex RH 100 H) 10 min aufgeschlossen, um das produzierte MBC aus den Zellen zu extrahieren. Um die unlöslichen Zellbestandteile abzutrennen, wurden die Probe zentrifugiert (25150 g, 5 min). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 45 °C im Concentrator 5301 getrocknet. Anschließend wurde das MBC mit Dichlormethan (DCM) aus der wässrigen Phase extrahiert. Dazu wurden 300 µl DCM und 300 µl MilliQ-Wasser zu der Probe gegeben. Diese wurde gevortext und daraufhin zentrifugiert (25150 g, 3 min). Die organische Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde für eine erhöhte Ausbeute wiederholt, indem erneut 300 µl DCM zur verbliebenen wässrigen Phase gegeben und nach erneutem Vortexen sowie Zentrifugieren wieder abgenommen wurden. Die Proben wurden bei 45 °C in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301) getrocknet. Anschließend wurden 200 µl Methanol zugegeben, um den Rückstand zu resuspendieren. Um mögliche nicht lösliche Verunreinigungen zu sedimentieren, erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (25150 g, 1 min). Anschließend wurden 150 µl der Methanollösung zur weiteren Analyse in HPLC-Vials überführt.

2.8.2 Analyse und Quantifizierung der produzierten Sekundärmetabolite

2.8.2.1 Qualitative spektrophotometrische Analyse von Pigmenten

Zur Aufnahme von UV-Vis-Spektren der produzierten Substanzen wurden die Kulturextrakte spektrophotometrisch mit einem GENESYS™ Photometer im Hinblick auf produzierte Pigmente untersucht. Anschließend wurden die erhaltenen Spektren und Absorptionsmaxima mit bekannten Werten verglichen. Spektren von Prodigininextrakten in angesäuertem Ethanol (96%igem Ethanol (p.a.) + 4%iger 1 M HCl (v/v)) und Spektren von Violaceinextrakten in Ethanol (p.a.) wurden bei einer Wellenlänge von 300 – 700 nm aufgenommen.

2.8.2.2 Photometrische Quantifizierung von Prodigininen

Zur Quantifizierung von produzierten Prodigininen wurden diese aus den Zellen extrahiert (Kapitel 2.8.1.1). Die Absorption des Überstandes wurde photometrisch im GENESYS™ Spektrophotometer bei $\lambda = 535$ nm (A535, Prodigiosin) bzw. 526 nm (A526, Norprodigiosin) bestimmt. Unter Zuhilfenahme des molaren Extinktionskoeffizienten in angesäuertem Ethanol (96%igem Ethanol (p.a.) + 4%iger 1 M HCl (v/v)) $\epsilon_{535} = 139800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Prodigiosin) (Domröse et al., 2015) bzw. $\epsilon_{528} = 9250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Norprodigiosin) (Medina-Castro, 1969) sowie der molaren Masse von Prodigiosin $\text{MW} = 323,4 \text{ g mol}^{-1}$ bzw. Norprodigiosin $\text{MW} = 309,4 \text{ g mol}^{-1}$ wurde anhand der folgenden Formel der Prodiginingehalt im Extrakt bestimmt.

$$\text{Produktgehalt [mg/ml]} = \frac{A}{\epsilon[\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]} \times \text{MW [g mol}^{-1}\text{]}$$

Mit diesem Wert wurde unter Berücksichtigung des extrahierten Kulturvolumens und etwaiger Verdünnungen, der Prodigiosintiter in der Kultur [mg/l] bestimmt. Lag der gemessene Absorptionswert über 1 wurde mit dem entsprechenden Lösungsmittel verdünnt.

2.8.2.3 Photometrische Quantifizierung von Violacein und Deoxyviolacein

Zur Quantifizierung von durch *P. putida* produzierten Violaceinen wurden Proben, die aus den Zellen extrahiert wurden (Kapitel 2.8.1.1), verwendet. Die Absorption des Überstandes wurde photometrisch im GENESYS™ Spektrophotometer bei $\lambda = 575$ nm (A575) bestimmt. Durch Zuhilfenahme des molaren Extinktionskoeffizienten von Violacein in Ethanol $\epsilon_{575} = 25400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Rodrigues et al., 2012) sowie der aus den molaren Massen von Violacein und Deoxyviolacein errechneten molaren Masse einer Mischung (50:50 %) beider Substanzen $\text{MW} = 335,3 \text{ g mol}^{-1}$ wurde anhand der folgenden Formel der Gehalt einer Mischung der beiden Metabolite, die im Wesentlichen Violacein beinhaltet, pro Extrakt bestimmt.

$$\text{Produktgehalt [mg/ ml Extrakt]} = \frac{A}{\epsilon[\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]} \times \text{MW [g mol}^{-1}\text{]}$$

Mit diesem Wert wurde unter Berücksichtigung des extrahierten Kulturvolumens und etwaiger Verdünnungen der Produkttiter der jeweiligen Substanz(en) in der Kultur [mg/l] bestimmt. Lag der gemessene Absorptionswert über 1 wurde mit dem entsprechenden Lösungsmittel verdünnt. Im Fall der überwiegenden Produktion von Deoxyviolacein wurde mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{575} = 15700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ sowie $\text{MW} = 327,3 \text{ g mol}^{-1}$ gerechnet. Welche Werte jeweils zur Anwendung kamen, ist jeweils angegeben und wurde durch eine qualitative Überprüfung der Extrakte *via* HPLC-PDA-Analyse (Kapitel 2.8.3.1) ermittelt.

2.8.3 Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit angeschlossener Photodiodenzeile (PDA)

Die HPLC-PDA-Analyse wurde mit einem LC10-Ai LC System (Shimadzu, Deutschland) zur qualitativen Analyse von einigen hergestellten Substanzen durchgeführt. Zudem konnte anhand der Signalflächen der Messungen von Substanzen, die aufgrund des Fehlens eines Extinktionskoeffizienten nicht photometrisch quantifiziert werden konnten, eine relative Mengenbestimmung vorgenommen werden.

Für Substanzen, welche kommerziell erhältlich waren, wurden anhand der vergleichenden Auswertung dieser Referenzen und zu analysierenden Proben im Hinblick auf die Retentionszeit und die am PDA-Detektor detektierten Absorptionsspektren Rückschlüsse darauf gezogen, ob es sich um die postulierte Substanz handelt. Alternativ wurden zu diesem Zweck PDA-Spektren im Vergleich mit publizierten Spektren evaluiert. Für alle HPLC Anwendungen wurden Lösungsmittel mit entsprechendem Reinheitsgrad verwendet. Als Benutzeroberfläche diente die Software LabSolution/LCSolution Version 5.57 SP1 (Shimadzu, Deutschland). Die jeweiligen HPLC-Analysen werden in den folgenden Abschnitten genauer erläutert.

2.8.3.1 HPLC-PDA-Analyse von Violaceinen und Prodigininen

Die HPLC-PDA-Analyse wurde unter Verwendung einer *reversed phase* Accucore™ C18 LC-Säule (50 mm x 4,6 mm, 2,6 µm Partikelgröße, 80 Å Porengröße, Thermo Scientific) nach der folgenden Methode, die auf Basis der angegebenen Literatur entwickelt wurde, durchgeführt. Es wurden als Lösungsmittel A 0,1 % Ameisensäure (FA) in H₂O und als Lösungsmittel B 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril verwendet (Lee et al., 2013). Die Flussrate betrug 1 ml/min. Es wurde zur Analyse von Violaceinen der folgende Chromatographie-Gradient durchgeführt:

Gestartet wurde mit 5 % Lösungsmittel B, dies wurde für 1,5 min gehalten, bis die Konzentration von Lösungsmittel B in 5,5 min von 5 % auf 98 % angestiegen war. Dies wurde für 2 min gehalten und anschließend die Konzentration von Lösungsmittel B in 0,5 min wieder auf 5 % abgesenkt. Dies wurde anschließend für 2 min gehalten, um die Säule zu reäquilibrieren. Die Säulenofentemperatur betrug 30 °C und das Injektionsvolumen waren 10 µl für Violacein und 25 µl für Deoxyviolacein. Injiziert wurden die aus Flowerplatekulturen hergestellten Ethanolextrakte (Kapitel 2.8.1.1). Die Absorption wurde mit einer Photodiodenzeile (SPD-M20A D2&W, *photodiode array detector*, PDA) über einen Wellenlängenbereich von 190 – 800 nm gemessen.

Reine Substanzen als Referenz waren nicht verfügbar. Die in dieser Arbeit biologisch produzierten Substanzen wurden mit Hilfe der relativen Elutionszeit und der maximalen Absorptionswellenlänge identifiziert (Violacein 5.95 min/ 573 nm, Deoxyviolacein 6.32 min/ 563 nm, Prodeoxyviolacein 5.60 min/ 610 nm). Die Ergebnisse von Lee et al., 2013; Momen et al., 1998; Sánchez et al., 2006 wurde als Referenz herangezogen.

Zur Analyse von Gemischen aus Prodigiosin, Cycloprodigosin oder Norprodigosin wurde die oben beschriebene Methode als Basis genutzt und dieselben Lösemittel verwendet: Die Flussrate betrug ebenfalls 1 ml/min. Zur Analyse wurde der folgende Chromatographie-Gradient durchgeführt: Gestartet wurde mit 5 % Lösungsmittel B, dies wurde für 2,5 min gehalten, bis die Konzentration von Lösungsmittel B in 16,5 min von 5 % auf 98 % angestiegen war. Dies wurde für 5 min gehalten und anschließend die Konzentration von Lösungsmittel B in 1 min wieder auf 5 % abgesenkt. Dies wurde anschließend für 9 min gehalten, um die Säule zu reäquilibrieren. Die Säulenofentemperatur betrug 30 °C. Es wurden 10 µl verdünnter Proben (aus *P. putida* pig21 + Prub680) bzw. 20 µl unverdünnte (aus *P. putida* Nor2) im Vergleich mit jeweils analog konzentrierten Extrakten aus Wildtyp-Zellen analysiert. Das Signal von Cycloprodigosin wurde anhand der Elutionsreihenfolge relativ zu Prodigiosin und Absorptionsmaxima, die bei ähnlichen *reversed-phase* Chromatographie-Verfahren beschrieben wurden (de Rond et al., 2017; Setiyono et al., 2020), potentiell zugeordnet (min 11,8/ 537 nm). Ein dem Norprodigosin entsprechendes Signal wurde mit Hilfe weiterer Analysen im Bereich einer Retentionszeit von 12 und 13 min mit einem Absorptionsmaximum um 526 nm zugeordnet.

Zur weiteren Massenanalyse (Kapitel 2.8.6) wurden die aufgetrennten Substanzen mit einem angeschlossenen Fraktionssammler aufgefangen. Dazu wurden 10 - 50 µl unterschiedlich verdünnter Proben injiziert. Es wurden Fraktionen des Eluates à 100 µl zwischen Minute 10,7 und 13,2 (Cycloprodigosin-Analyse) bzw. à 50 µl zwischen Minute 11,5 und 13,5 (Norprodigosin-Analyse) gesammelt. Diese Fraktionen wurden wiederum mittels einer entsprechend skalierten 2-Phasen Extraktion mit Ethylacetat und gesättigte Ammoniumsulfatlösung (Kapitel 2.8.1.2.1) im kleinen Maßstab extrahiert, getrocknet, wiederum in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und anschließend zur Massenanalyse eingesetzt.

2.8.3.2 Quantifizierung von MBC durch Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS)

Die Quantifizierung von MBC wurde im Zuge der dieser Arbeit angegliederten Bachelorarbeit von Schinya Ibrahim (2019) durchgeführt. Die dazu notwendigen LC-MS-Messungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Bioorganische Chemie (IBOC, HHUD) von Frau Birgit Henßen durchgeführt. Hierzu wurde die Anlage HP 1100 Series LC/MSD der Firma Agilent Analytical Instruments und eine Atlantis T3 Säule (3 µm, 3*100 mm) von Waters verwendet.

Als Laufmittel dienten Wasser (A) und Methanol (B), die beide mit 0,1 % Ameisensäure versetzt wurden. Das Probeninjektionsvolumen betrug 10 µl. Die Proben wurden in einer Gradientenelution bei einer Flussrate von 0,6 ml/min in Analysen von 10 min Dauer aufgetrennt: Ausgehend von 90 % Eluent A und 10 % Eluent B wurde in 4 min zu 60 % Eluent B erhöht und in weiteren 2 min auf 100 % Eluent B, was über 4 min gehalten wurde. Daraufhin wurden die Startbedingungen wiederhergestellt (10 % Eluent B) und über 1 min gehalten. Die Detektion erfolgte mit einem G1315A DA-Detektor. Außerdem erfolgte eine Analyse mit einem G1946A Massenspektrometer (Quelle: API-ES, *positive ion mode*, Detektor: Single Quadrupole mit einem m/z -Bereich von 100-2000). Die MS-Daten wurden im Hinblick auf $[m/z]$ -Signale folgender Massen überprüft: $[M+H]^+$, $[M+H+H_2O]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+H+HCOOH]^+$. Nachdem ein dem Protonenaddukt entsprechendes erwartetes Signal bei 6,7 min verifiziert wurde, wurde die Quantifizierung anhand des UV-Signals (365 nm) vorgenommen. Die Kalkulation, der von *P. putida*-Stämmen produzierten, MBC-Mengen erfolgte anhand einer Kalibriergeraden, welche mit den Messdaten von chemisch synthetisiertem MBC erstellt wurde (Abbildung 2-2). Das MBC, welches als Referenz verwendet wurde, wurde von Jan Gebauer (IBOC, HHUD) bereitgestellt (Ibrahim, 2019).

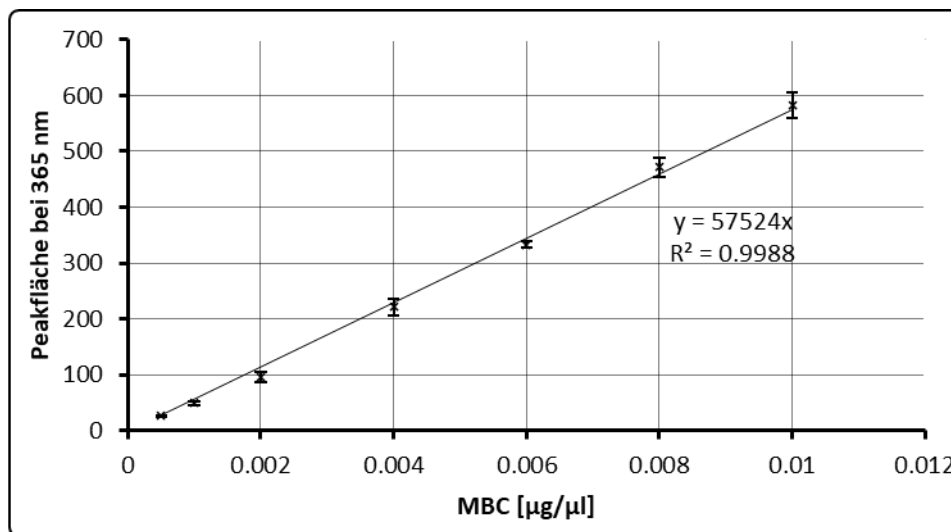


Abbildung 2-2: Kalibrierung durch Korrelation der Signalfäche bei LC-UV-Detektion von MBC mit der Probenkonzentration
Die 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd (MBC)-Kalibriergerade wurde durch LC-UV Messung in 3-facher Bestimmung erstellt, indem die UV-Signale (bei einer Wellenlänge von 365 nm) gegen die Konzentration unterschiedlich verdünnter Referenzproben aufgetragen wurden.

2.8.3.3 HPLC-PDA-Analyse von Phenazine-1-Carboxylsäure

Die HPLC-PDA-Analyse wurde unter Verwendung einer *reversed phase* YMC C30 HPLC-Säule (250 mm x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße, YMC Europe, Deutschland) in Anlehnung an (Fernández & Pizarro, 1997) nach der folgenden Methode durchgeführt. Als Eluent A wurden 0,1 % Ameisensäure in H₂O und als Eluent B 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril verwendet. Die Durchflussrate betrug 1 ml/min. Eine Gradientenelution wurde mit 5 % Eluent B gestartet, dies wurde für 2,5 min gehalten, bis die Konzentration von Eluent B in 16,5 min von 5 % auf 98 % angehoben wurde.

Dies wurde für 5 min gehalten und anschließend die Konzentration von Eluent B in 1 min wieder auf 5 % abgesenkt. Dies wurde anschließend für 5 min gehalten, um die Säule zu reäquilibrieren. Die Säule wurde während der Messung bei einer Temperatur von 30 °C gehalten. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl. Injiziert wurde der in Ethanol gelöste Extrakt (Kapitel 2.8.1.2). Die Absorption des Eluats wurde mit einem PDA-Detektor gemessen. Messungen mit einer kommerziellen PCA-Referenz (HPLC Reinheit: 95,5 %) (Apollo Scientific Ltd) zeigten eine spezifische Elutionszeit und spezifische maximale Absorptionswellenlängen für Phenazin-1-Carboxylsäure (18.07 min/ 249 | 370 nm). Diese Messungen wurden als Vergleich zu Messungen von in dieser Arbeit hergestellten Proben aus biologischem Material herangezogen. Zur Quantifizierung von PCA wurde die kommerzielle Referenzsubstanz verwendet, um anhand der ermittelten Signalflächen der eingesetzten Substanzmengen eine Kalibrierung vorzunehmen. Hierzu wurden Lösungen im Konzentrationsbereich von 0,008 - 0,25mg/ml hergestellt. Diese wurden anhand der beschriebenen Methode analysiert. Die entsprechenden am PDA detektierten Signale bei einer Wellenlänge von 370 nm wurden mit den eingesetzten Konzentrationen korreliert und konnten so zur näherungsweisen Bestimmung von PCA-Mengen in Extrakten von *P. putida*-Kulturen verwendet werden (Domröse et al., 2017).

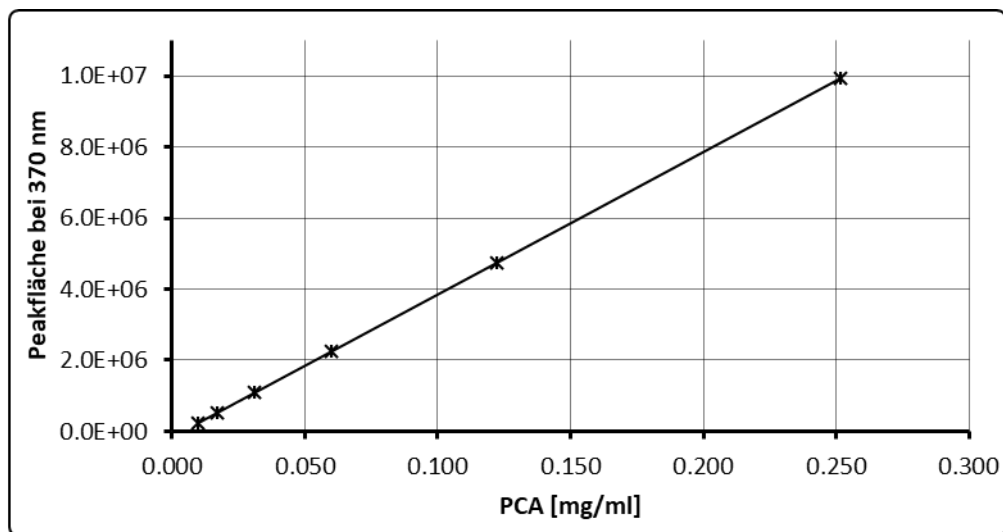


Abbildung 2-3: Kalibrierung durch Korrelation der Signalfläche bei HPLC-PDA-Detektion der PCA-Referenz mit der Probenkonzentration

Die PCA-Kalibriergerade wurde durch HPLC-PDA-Messung erstellt, indem die UV-Signale (Wellenlänge von 370 nm) gegen die Konzentration unterschiedlich verdünnter Referenzproben aufgetragen wurden.

2.8.4 Dünnschichtchromatographie (DC) mit Hilfe eines *Automatic TLC Sampler*

Zur Überprüfung produzierter Stoffgemische aus violaceinbildenden *P. putida*-Stämmen wurde die Dünnschichtchromatographie angewendet. Um die Methode zu standardisieren und so reproduzierbar zu machen, wurde für den Probenauftrag, sowie zur Dokumentation der entwickelten Platten, ein DC-Chromatographiesystem (CAMAG) verwendet.

Probenauftragung

Das Auftragen der ethanolischen Violaceinproben erfolgte durch das CAMAG Automatic TLC Sampler 4, mit dem 10 µl der Probe automatisiert und gleichmäßig in einem 1 cm breiten Strich auf eine Kieselgel DC Platte (ALUGRAM SIL G) aufgetragen wurden. Dazu wurde die Probe in einem Stickstoffstrom auf die Platte aufgesprüht.

Vorbereitung der Kammer

Das Fließmittel stellte eine Mischung von Petrolether (PE) und Ethylacetat (EtAc) im Verhältnis 1:3 (9 ml PE, 27 ml EtAc) dar. Es wurden 36 ml in die Laufkammer gefüllt und der Deckel geschlossen, um die Atmosphäre in der Kammer mit dem Lösungsmittel abzusättigen.

Probenlauf und Dokumentation

Die Kammer wurde nur kurz geöffnet, um die Platte vorsichtig senkrecht hineinzustellen. Der Lauf dauerte etwa 10 - 15 min. Nach Ablauf der Zeit wurde die Platte entnommen, in die DC-Dokumentationsstation (TLC Visualizer 2) gelegt und dort mit dem integrierten Kamerasystem fotografiert. Anschließend wurden die Banden der aufgetrennten *P. putida*-Extrakte mit einer Referenzmischung aus Violacein und Deoxyviolacein (Hilgers, 2016) verglichen.

2.8.5 Isolierung von Prodigininen mit einem Äkta-Chromatographiesystem

Die Isolierung der Metabolite Cycloprodigiosin und Norprodigiosin aus Zellextrakten wurde mit einem Chromatographiesystem, Äkta FPLC System, (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Nach einigen Vortests, die teils durch die Firma Isera durchgeführt wurden (Kapitel 7.2), wurde mit einer ISAspher 100-5 C18 AQ Säule (150 x 20 mm; 5 µm Partikel, mit einer Vorsäule desselben Materials), bei 35 °C Temperatur des Säulenofens gearbeitet. Als flüssige Phase kam ein Laufmittel bestehend aus 60 % H₂O und 40 % Acetonitril (beide mit 0,1 % Ameisensäure versetzt) für die Trennung von Prodigiosin und Cycloprodigiosin, bzw. 50 % beider Laufmittelmittel für Norprodigiosinextrakte zum Einsatz. Die Flussrate betrug 15 ml/min und es wurden 60-minütige Chromatographien durchgeführt. Die Substanzen wurden in mehreren Läufen bei Injektionen von je 1 ml Proben getrennt. Dabei wurden Chromatogramme bei Wellenlängen von 536 nm (Prodigiosin/Cycloprodigiosin) oder 526 nm (Norprodigiosin) aufgenommen und mittels eines angeschlossenen Fraktionssammlers die zu den Signalpeaks gehörenden Fraktionen in 10 ml Aliquots gesammelt. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend vereinigt und mittels einer 2-Phase Extraktion aus der wässrigen Lösung isoliert (Kapitel 2.8.5.1).

2.8.5.1 Extraktion aus Äkta-Fractionen

Die zu den Substanzsignalen gehörenden Fraktionen wurden gesammelt und in einem Scheidetrichter vereinigt. Zu der Lösung wurden 20 ml Ethylacetat und 15 ml gesättigte NaCl-Lösung gegeben und ausgeschüttelt, sodass sich die gesammelten Prodiginine in der organischen Phase konzentrierten. Anschließend wurde die wässrige Phase entfernt, die organische Phase in einen Rundkolben überführt und die isolierten Prodiginine durch Evaporation des Lösungsmittels (Rotavapor® R-100) getrocknet. Durch Zugabe von 5 ml Diethylether wurden die getrockneten Substanzen erneut gelöst und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Erneut wurden 5 ml gesättigte NaCl-Lösung zugeben, ausgeschüttelt und die organische Phase in mehrere 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend erfolgte die Trocknung in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301). Zur weiteren Analyse wurden die Proben in einem definierten Volumen Methanol bzw., Ethanol oder Ethanol + 4 % HCl gelöst und vereint.

2.8.6 Massenspektrometrische Prodiginin-Analyse

Zur massenspektrometrischen Analyse der produzierten Prodiginine wurde ein *expression Compact Mass Spectrometer* (CMS, Advion) eingesetzt. Die Proben der analysierten Substanzen wurden zuvor mit Hilfe eines Äkta-Chromatographiesystems isoliert (Kapitel 2.8.5). Die Probe wurde mit einer Analysensonde (ASAP®, Atmospheric Solids Analysis Probe) aufgenommen und in das CMS eingebracht. Dazu wurde das geschlossene Ende einer Glaskapillare in die zu untersuchende, als Lösung vorliegende Probe eingetaucht und die Kapillare anschließend zur Analyse in das CMS eingesetzt. Die Ionisierung erfolgte mit Hilfe einer APCI-Quelle (*atmospheric pressure chemical ionization*). Die ionisierten Verbindungen ergaben $[m/z]$ -Signale, die insbesondere im Hinblick auf Protonaddukte $[M+H]^+$ der erwarteten Verbindungen untersucht wurden. Als Benutzeroberfläche zur Messung diente die Advion Mass Express Software. Zur Auswertung der Daten wurde die Software Mnova (Mestrelab Research, S.L.) verwendet.

3 Ergebnisse und Diskussion

Viele Naturstoffe, insbesondere Sekundärmetabolite, haben vielversprechende biologische Eigenschaften welche beispielsweise in der pharmazeutischen Industrie genutzt werden können. Bei diesen Verbindungen handelt es sich in der Mehrheit um komplexe Substanzen, welche von einem Organismus produziert werden, jedoch nicht direkt zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels notwendig sind (Kapitel 1.1). Sie dienen häufig der Verteidigung des eigenen Habitats, werden jedoch meist nur in sehr geringen Mengen produziert, was ihre Gewinnung und Analyse erschwert. Da die Substanzen jedoch häufig Eigenschaften wie z.B. antibiotische oder antitumorale Wirkung zeigen, sind sie besonders bei der Identifizierung neuer pharmakologisch einsetzbarer Substanzen vielversprechend. Aus diesen Gründen ist es sinnvoll, die Naturstoffe in mikrobiellen Wirten mit biologischen Expressionssystemen heterolog zu produzieren. So können die Substanzen häufig in größeren Mengen als im natürlichen Produzenten und zudem in einem Bakterienstamm mit wählbaren Eigenschaften produziert werden.

Eine aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften besonders interessante Klasse von Sekundärmetaboliten sind die Prodiginine (Kapitel 1.2.1). Hervorzuheben ist besonders das auffällig rote Tripyrrol Prodigiosin mit seinen antimikrobiellen und antitumoralen Eigenschaften (Darshan & Manonmani, 2016; Williamson et al., 2007), welches bereits erfolgreich in *P. putida* produziert werden konnte (Domröse et al., 2015). Darüber hinaus konnte durch das Einschleusen synthetischer Monopyrrole im Zuge einer Mutasynthese die Produktvielfalt erweitert werden (Klein et al. 2017; 2018).

Mit Hilfe des (y)TREX-Systems wurde ein System zur Genexpression entwickelt, mit dem Wirtsbakterien auf ihre Fähigkeit zur Expression von Genclustern, welche die Enzyme zur Produktion entsprechender Substanzen kodieren, getestet werden können (Domröse et al., 2017; Loeschke et al., 2013) (Kapitel 1.4). Mit Hilfe dieser Systeme konnten so, neben Prodigiosin, bereits verschiedene Sekundärmetabolite wie Phenazine und Violaceine in *P. putida* produziert werden. Zur vereinfachten Detektion exprimierender Klone konnte in diesem System die β -Galactosidase verwendet werden, was den Screening-Aufwand zum Nachweis der Produktbildung erheblich reduzieren kann (Domröse et al., 2017, 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die bestehenden Methoden gezielt zur Naturstoffproduktion genutzt und zudem weiterentwickelt. Dabei stand zunächst die Etablierung von Biosynthesewegen zur Produktion weiterer Prodiginine in *P. putida* sowie einer verbesserten Mutasyntheseplattform im Vordergrund (Kapitel 3.1 und 3.2). Darüber hinaus sollte das yTREX-Expressionssystem zu einer modularen *Toolbox* weiterentwickelt (Kapitel 0) und schließlich zur Anwendung gebracht werden (Kapitel 3.4).

3.1 Rekombinante Biosynthese natürlicher Prodiginine in *P. putida*

Mit Hilfe des (y)TREX-Systems war es bereits möglich, durch Tn5-Transposition eine Vielzahl an Stämmen zu erzeugen, die das *pig*-Gencluster, welches die Enzyme der Prodigiosinbiosynthese kodiert, im Genom tragen und Prodigiosin heterolog produzieren (Domröse et al. 2015; Domröse et al. 2017). Da *P. putida* sich dabei in bisherigen Experimenten sehr gut für die Biosynthese von Prodigiosin durch die heterologe Expression der Biosynthesegene aus *S. marcescens* eignete, wurde im ersten Teil dieser Arbeit die Fähigkeit dieses Wirtes bezüglich der Produktion weiterer Verbindungen der Prodiginin-Familie untersucht.

3.1.1 Umsetzung von Prodigiosin zu Cycloprodigiosin

Da einige Untersuchungen Cycloprodigiosin interessante Wirksamkeiten bescheinigen, welche je nach Anwendung besser sind als die von nicht-zyklischen Prodigininen, wurde dieses als Zielverbindung gewählt. Zum Beispiel scheint die antibiotische Wirksamkeit von Cycloprodigiosin besser als die von Prodigiosin zu sein (Lee et al., 2011). Zudem zeigt es eine höhere Wirksamkeit gegen das Malaria verursachenden Protozoon *Plasmodium berghei*, als Chloroquine und dessen Derivate (Kim et al., 1999) und wirkt apoptotisch auf verschiedene Krebszelllinien (Darshan & Manonmani, 2015). Zunächst wurde daher geprüft, ob die Umsetzung von Prodigiosin zu Cycloprodigiosin, die natürlicherweise in Bakterien wie z.B. *Pseudoalteromonas rubra* erfolgt, auch im heterologen Wirt *P. putida* möglich ist. Dabei sollte Cycloprodigiosin, welches in *Pseudoalteromonas rubra* ATCC 29570 (DSM 6842) aus Prodigiosin durch eine von der di-Eisen Oxygenase Prub680 katalysierten Reaktion gebildet wird, durch die Expression dieser Zykase in bereits vorliegenden prodigiosinproduzierenden *P. putida*-Stämmen erzeugt werden. In *P. rubra* wird mit diesem zusätzlichen Enzym die freie C5-Kette an der 2-Position des C-Rings, welcher vom Monopyrrol MAP stammt, mit der 3-Position verbunden und so zyklisiert. Der dabei entstehende C6-Ring erhält dabei eine Methylgruppe an der 5-Position (de Rond et al., 2017). In den Prodigiosinproduktionsstämmen sollte daher, plasmidbasiert, die Zykase Prub680 exprimiert werden, welche dann den Ringschluss der C5-Kette katalysieren sollte.

Dazu wurde im Rahmen einer im Zuge dieser Arbeit betreuten Bachelorarbeit von Schinya Ibrahim das Plasmid pVLT33-Prub680 kloniert (Ibrahim, 2019), indem die Zykase Prub680 in den *broad host range* Vektor pVTL33 (de Lorenzo et al., 1993) integriert wurde. In diesem Plasmid steht das Gen der Zykase unter Kontrolle des P_{tac} -Promotors, was aufgrund des zusätzlich kodierten LacI-Repressors eine gesteuerte Induktion der Expression mit Lactose oder IPTG ermöglichte. Weiterführende LC-MS-Analysen (Flüssigchromatographiemessungen mit angeschlossener Massenspektrometriedetektion) von Extrakten aus einem prodigiosinbildenden *P. putida*-Stamm, der das Plasmid trug und in dem die Genexpression induziert wurde, lieferten vielversprechende Ergebnisse, indem ein Signal dem Cycloprodigiosin zugeordnet werden konnte (Ibrahim, 2019).

Die notwendigen LC-MS-Messungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Bioorganische Chemie (HHUD) durchgeführt.

Aufgrund dieser vielversprechenden ersten Ergebnisse wurde der prodigiosinproduzierende *P. putida*-Stamm pig21, der das *pig*-Gencluster aus *S. marcescens* im Chromosom trägt (Domröse et al., 2017), im Rahmen dieser Arbeit, durch Elektroporation mit diesem Plasmid pVLT33-Prub680 transformiert (Kapitel 2.5.5.6) und zunächst unter Standardbedingungen für die Kultivierung von *P. putida* (Kapitel 2.5.4.4) analysiert (Abbildung 3-1, A). Dazu wurde in 10 ml TB-Medium, in 100 ml Rundkolben über 24 h, bei 30 °C und 130 UpM kultiviert und die Expression der Zykase Prub680 durch IPTG Zugabe induziert. Vergleichend wurden Kulturen von *P. putida* pig21 sowie des *P. putida* KT2440 Wildtyp ohne das Plasmid angezogen. Nach der Extraktion der Sekundärmetabolite aus den Zellen des gesamten Kulturvolumens in angesäuertem Ethanol und anschließender 2-Phasen Extraktion (Kapitel 2.8.1.2), wurden diese mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC-Analyse) mit gekoppeltem PDA-Detektor aufgetrennt und die Substanzen anhand der Retentionszeiten der Signale bei einer Wellenlänge von 535 nm sowie der UV/VIS-Spektren analysiert (Kapitel 2.8.3.1) (Abbildung 3-1, B). Dabei wurde in den Proben der *P. putida* pig21 Kulturen ein Signal bei einer Retentionszeit von 12,3 min mit einem prodigiosintypischen Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 534 nm detektiert, welcher auch in den Proben der *P. putida* pig21-Prub680 Kulturen auftrat (Abbildung 3-1, B). In diesen konnte jedoch zusätzlich ein Signal bei 11,8 min und mit einem Absorptions-Maximum bei 537 nm detektiert werden. In den Proben des *P. putida* KT2440 Wildtyps konnte dagegen keines dieser Signale detektiert werden. Die Elutionsreihenfolge deutet darauf hin, dass es sich bei dem neuen Signal um Cycloprodigiosin handelt, da bei ähnlichen *reversed-phase* Chromatographieverfahren dieselbe Reihenfolge beschrieben wurde (de Rond et al., 2017; Setiyono et al., 2020). Zudem entspricht das Absorptionsmaximum bei 537 nm vormals beschriebenen Ergebnissen (Setiyono et al., 2020).

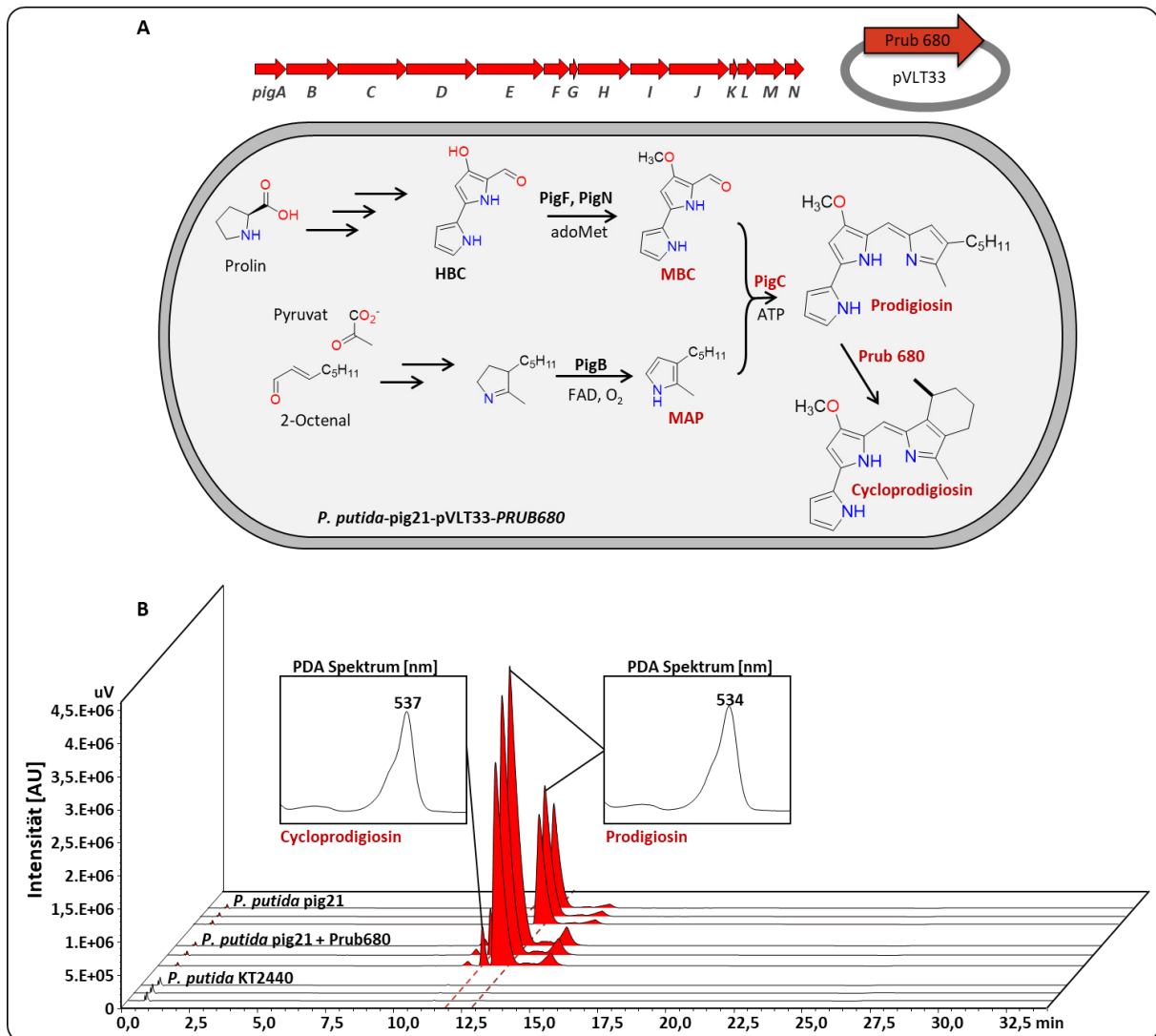


Abbildung 3-1: Etablierung der Biosynthese von Cycloprodigiosin in *P. putida*

(A) Schematische Darstellung des genetischen Set-ups: Es erfolgte die *in vivo* Umsetzung von Prodigiosin zu Cycloprodigiosin durch Expression eines Enzyms zur Zyklisierung der freien C-Kette in einem prodigiosinbildenden Stamm. Der Stamm *pig21*, der die *pig* Gene aus *S. marcescens* im Genom trägt, wurde dazu mit dem Plasmid *pVLT33-Prub680* transformiert, um die Zyklyse *Prub680* aus *P. rubra* zu produzieren (Gene nicht Maßstabsgetreu dargestellt). (B) HPLC-PDA-Analyse von Ganzzellextrakten. Es wurden Chromatogramme bei einer Wellenlänge von 535 nm aufgenommen. Im Bereich von ~12,3 min wurde in den Proben des Stamms *P. putida pig21* ein Signal detektiert, das in den Proben des Wildtyps nicht auftrat und das prodigiosintypische UV/Vis-Spektrum mit einem Maximum bei 534 nm zeigte. In den Proben der *pig21* Kulturen mit der Zyklyse *Prub680* konnte dasselbe Signal mit höherer Intensität sowie ein weiteres Signal bei ~11,8 min und mit einem UV/Vis-Spektrum mit leicht erhöhtem Maximum bei 537 nm detektiert werden. Es sind die Chromatogramme von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Repräsentative, zu den Signalen im Chromatogramm aufgenommenen Absorptionsspektren sind jeweils dargestellt ($\lambda = 300 - 650$ nm). Eine massenspektrometrische Analyse bestätigte, dass das Cycloprodigiosinsignal ausschließlich bei Expression der Zyklyse auftrat (Kapitel 7.1, Abbildung 7-3).

Auf Basis dieser Erkenntnisse, die auf eine erfolgreiche Umwandlung von Prodigiosin zu Cycloprodigiosin hindeuteten, wurde ein Aliquot des zuvor per HPLC analysierten Extrakts einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Dazu wurden die Proben mit einem Massenspektrometer (*expression* CMS, Advion) des Instituts für Bioorganische Chemie in Kooperation mit Jan Gebauer (HHUD) analysiert (Kapitel 2.8.6). In der Probe des Stammes *P. putida pig21* konnte dabei die Masse von Prodigiosin nachgewiesen werden (m/z 324), was dem Protonaddukt $[M+H]^+$ entspricht.

In der Probe des gleichen Stammes mit co-exprimierter Zyklase wurden dagegen zusätzlich Massensignale von Cycloprodigosin (m/z 322, Protonaddukt $[M+H]^+$) detektiert. Mit diesem Experiment konnte somit die teilweise Umsetzung des produzierten Prodigiosins durch die Zyklase Prub680 nachgewiesen und erstmals ein Prodigiosinderivat in *P. putida* KT2440 biosynthetisch produziert werden.

Da sich die Signale von Prodigiosin und Cycloprodigosin bei der HPLC-Analyse in ihren Retentionszeiten ausreichend unterschieden, konnte diese Analyse genutzt werden um folgend die Umwandlungseffizienz durch die Identifizierung der besten Kultivierungsbedingungen zu verbessern. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in dieser Arbeit größere Kulturen unter optimierten Bedingungen kultiviert und das Cycloprodigosin durch eine Separation vom Prodigiosin mittels ÄKTA™ gereinigt, was im folgenden Abschnitt genauer beschrieben ist.

3.1.1.1 Cycloprodigosinproduktion unter verschiedenen Bedingungen

Da im Stamm *P. putida* pig21 mit pVLT33-Prub680 im ersten Test (Kapitel 3.1.1) noch ein deutliches Prodigiosinsignal zu detektieren war, wurde nun untersucht, ob die Ausbeute oder das Verhältnis beider Substanzen durch die Wahl eines Stammes mit geringerer Prodigiosinproduktion oder durch bestimmte Kultivierungsbedingungen günstig beeinflusst werden kann. Ein Ziel bestand darin, äußere Einflüsse wie die des Kulturmediums sowie der Temperatur zu untersuchen. Dazu wurden vormals erzeugte *P. putida* pig Stämme ausgewählt, deren unterschiedliche Produktionsleistungen bereits bekannt waren (Domröse et al., 2017). Die Stämme *P. putida* pig25 (~25 mg/l) und pig22 (~84 mg/l) zeigten dabei eine geringe bzw. mittlere Prodigiosinproduktion im Vergleich zum Stamm pig21 (~150 mg/l). Die jeweiligen Produktionsleistungen wurden zuvor bei Kultivierungen in TB-Medium bei 30 °C, in 0,8 ml Kulturvolumen und bei 1400 UpM über 24h ermittelt (Domröse et al. 2017). In diese Stämme wurde jeweils das Plasmid pVLT33-Prub680 mittels Elektroporation eingebracht und die erzeugten Transformanten unter den gleichen Bedingungen, jedoch zusätzlich auch bei 20 °C und 25 °C kultiviert. Zudem wurde dem Medium nach 4 h zur Induktion der Zyklaseexpression 0,5 mM IPTG zugegeben. Nach der Kultivierung wurden die Sekundärmetabolite in angesäuertem Ethanol extrahiert und mittels HPLC-PDA-Messungen analysiert. Aus den erhaltenen Chromatogrammen wurden die unter den Kurven liegenden Flächen des Prodigiosin- und des Cycloprodigosinsignals als Hinweis auf die Menge der gebildeten Substanzen betrachtet. Um näherungsweise den Anteil des Cycloprodigosin an der Menge der insgesamt produzierten Prodiginine zu evaluieren (Abbildung 3-2), wurde die bestimmte Signalfläche des Cycloprodigosinsignals mit der Signalfläche des Prodigiosinsignals addiert und anschließend die Cycloprodigosinsignalfläche durch diesen Wert geteilt. In allen Fällen konnten beide Signale detektiert werden, jedoch jeweils in sehr unterschiedlichen Verhältnissen und Intensitäten.

So führte die Kultivierung bei 30 °C generell zu einer geringeren Umwandlung des produzierten Prodigiosins zu Cycloprodigosin (1-4 % der Signalstärke der produzierten Prodiginine), während bei dieser Temperatur insbesondere in TB-Medium vormals besonders hohe Prodigiosintiter gemessen wurden (Domröse *et al.* 2017). Bei einer Kultivierungstemperatur von 25 °C stieg die relative Menge des produzierten Cycloprodigosins dagegen deutlich an (8 bis max. 24 % Signalstärke). Die höchste Konzentration an Cycloprodigosin wurde jedoch bei 20 °C beobachtet. bei 20 °C (18-36 % Signalstärke). Sowohl der höchste als auch der niedrigste Wert wurden im Stamm *P. putida* pig25 ermittelt. Der niedrigste Wert konnte dabei in LB-Medium und der höchste in TB-Medium detektiert werden.

Es ist jedoch wichtig, dass für die Auswahl eines Stammes zur *in vivo* Produktion von Cycloprodigosin durch Koexpression der Zykase Prub680 nicht nur das Verhältnis der Umwandlung, sondern auch die absoluten Intensitäten des Signals des produzierten Cycloprodigosins und Prodigiosins mit einbezogen werden. Wird nämlich nicht nur die Zyklisierung betrachtet, zeigt sich, dass trotz der geringeren Umwandlung bei 25 °C in TB-Medium mehr Cycloprodigosin produziert wurde als bei 20 °C. Auffällig ist auch, dass die Intensitäten der Cycloprodigosinsignale innerhalb einer Bedingung ungefähr vergleichbar blieben, obwohl die der Prodigiosinsignale stark variierten (Abbildung 3-2, 25°C, TB).

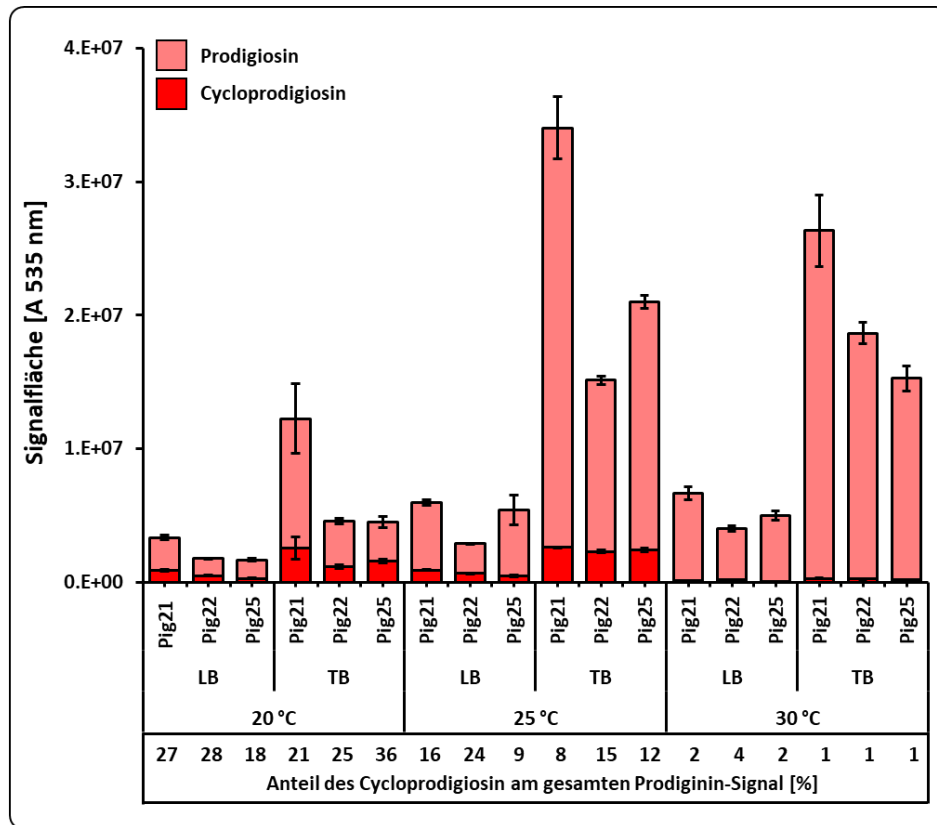


Abbildung 3-2: Prodigiosin- und Cycloprodigiosinproduktion von *P. putida*-Stämmen unter verschiedenen Bedingungen

Zur *in vivo* Produktion von Cycloprodigiosin wurde in *P. putida*-Stämmen mit geringer (pig25), mittlerer (pig 22) und hoher (pig 21) Prodigiosinproduktionsleistung die Zyklase Prub680 plasmidbasiert exprimiert und in verschiedenen Medien und bei verschiedenen Temperaturen für 24 h in Flowerplates bei 1400 UpM kultiviert. Anschließend wurde die produzierte Mixtur beider Stoffe mit angesäuertem Ethanol extrahiert und die Substanzen per HPLC-PDA analysiert. Dabei wurden Chromatogramme bei einer Wellenlänge von 535 nm aufgenommen und die jeweils produzierte Prodigiosinmenge, sowie die Menge des Cycloprodigiosins anhand der Signalflächen evaluiert. Beide Werte einer Probe wurden kumulativ aufgetragen, um die Gesamtmenge der produzierten Pigmente abzubilden. Weiter wurde für jede Kombination die prozentuale Umwandlung betrachtet, indem der Anteil der Signalfläche des Cycloprodigiosinsignals am gesamten Prodigiosinsignal (Prodigiosinsignalfläche und Cycloprodigiosinsignalfläche addiert) bestimmt wurde. Gezeigt sind Mittelwerte basierend auf einer biologischen Mehrfachbestimmung ($n \geq 3$). Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Temperatur und das Nährmedium einen großen Einfluss auf die Cycloprodigiosinbildung haben. Es zeigte sich, dass sich bezogen auf die Prodigiosinproduktion und auch auf den von Prodigiosin zu Cycloprodigiosin umgewandelten Anteil, eine Kultivierung des Stammes pig25 bei 20 °C in TB-Medium anbietet. Bei diesen Bedingungen war sowohl die höchste Umwandlung zu beobachten als auch eine hohe absolute Menge Cycloprodigiosin zu erwarten. Durch den relativ hohen Anteil von Cycloprodigiosin im Verhältnis zum produzierten Prodigiosin kann vermutet werden, dass bei diesem Ansatz auch die Trennung der beiden Substanzen in einem größeren Maßstab begünstigt würde.

Um eine größere Menge Cycloprodigiosin zu produzieren, sollten diese, im kleinen Maßstab optimierten Bedingungen im Anschluss für eine Kultivierung im größeren Maßstab genutzt und eine präparative chromatographische Trennung etabliert werden. Dafür wurde eine Kultur des Stammes *P. putida* pig25 genutzt, welcher zuvor mit dem Plasmid pVLT33-Prub680 transformiert wurde.

Die Kultivierung erfolgte dabei nach den zuvor identifizierten besten Parametern in drei 1 Liter Rundkolben in jeweils 100 ml TB-Medium mit 0,5 mM IPTG bei 20 °C und schüttelnd bei 130 UpM. Um die bei 20 °C typischerweise geringeren Wachstumsraten auszugleichen, wurde die Kultivierungsdauer auf 72 h erhöht (Kapitel 2.5.4.4). Für die Isolation der Prodiginine wurden die Zellen des gesamten Kulturvolumens im ersten Schritt durch Zentrifugation geerntet. Der Zellaufschluss und die Extraktion der Pigmente wurden mit Ethanol und mit einer anschließenden 2-Phasen-Extraktion durchgeführt (Kapitel 2.8.1.2). Die Pigmente wurden daraufhin durch Evaporation des organischen Lösungsmittels getrocknet und wiederum in Ethanol gelöst.

Um das Cycloprodigosin vom Prodigiosin im kleinen präparativen Maßstab zu trennen, wurde eine Umkehrphasen-Chromatographie mit C18-Säulenmaterial gewählt, da dieses Verfahren mehrfach zur Prodiginitrennung und -analyse beschrieben wurde und somit geeignet scheint die beiden Verbindungen voneinander zu separieren (Chávez-Castilla & Aguilar, 2016; Johnson et al., 2015; Song et al., 2006). Zumeist wurde dies bisher mit einem Wasser/Methanol-Gemisch als Eluent kombiniert. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Wasser/Acetonitril-Gemisch eingesetzt, um durch die geringere Viskosität des Lösemittels geringere Drücke im verwendeten ÄKTA Basic Chromatographiesystems beibehalten zu können. Nach Vortests mit verschiedenen Laufmittelzusammensetzungen wurde ein Wasser/Acetonitril-Gemisch (60:40 %) zur Chromatographie mit einer ISAspher 100-5 C18 AQ Säule (20 x 150 mm) und eine Flußrate von 15 ml/min gewählt (Anhang Kapitel 7). Die Mischung beider Substanzen wurde in mehreren Läufen aufgegeben (Kapitel 2.8.5). Dabei wurden Chromatogramme bei 536 nm aufgezeichnet (Abbildung 3-3 A) und mittels eines angeschlossenen Fraktionssammlers Fraktionen von 10 ml gesammelt. Die zu einem Signal gehörenden Fraktionen wurden anschließend vereinigt, die Substanzen extrahiert und anschließend durch Evaporation des Lösungsmittels getrocknet.

Das erhaltene Prodigiosin und Cycloprodigosin wurden daraufhin erneut mittels HPLC-PDA analysiert, um die Trennung zu evaluieren (Abbildung 3-3, B).

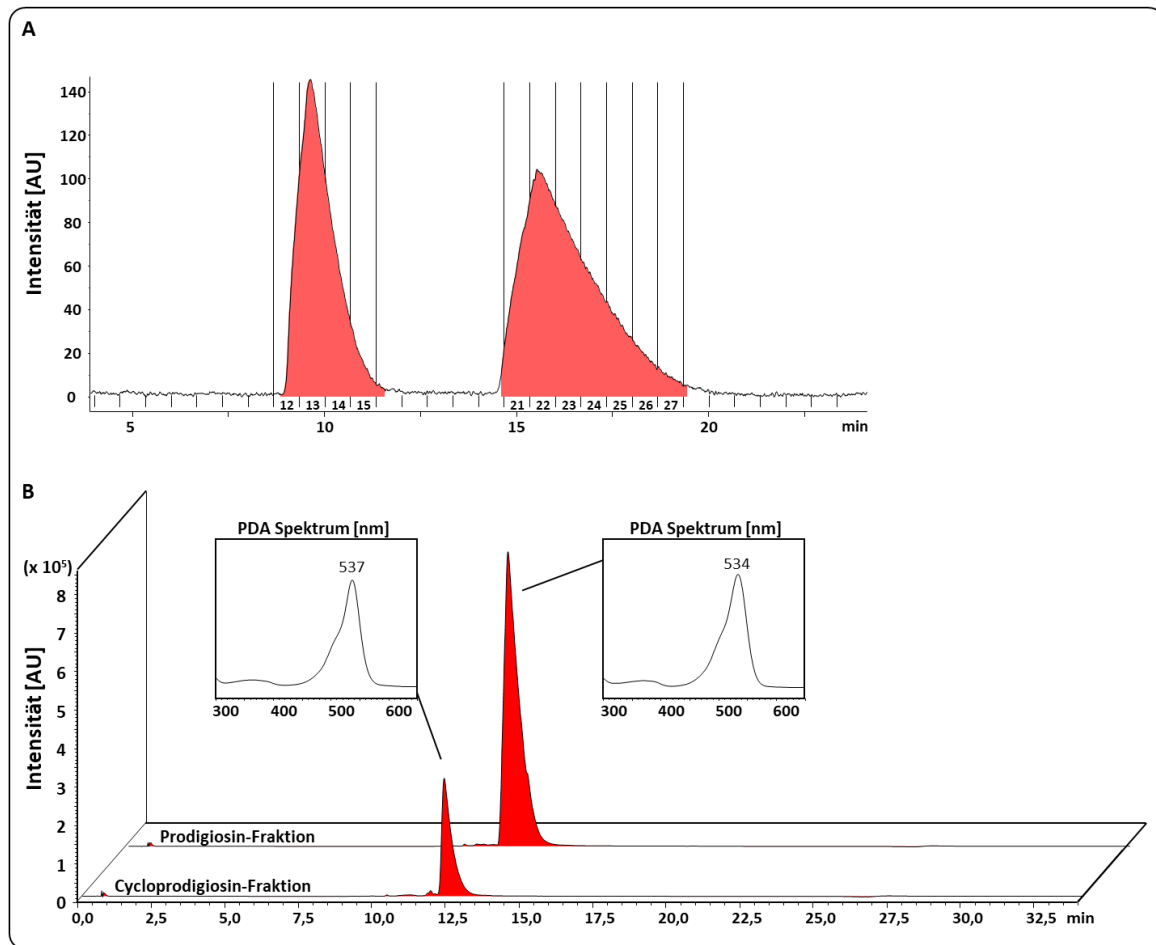


Abbildung 3-3: ÄKTA-Chromatographie-basierte Trennung des Cycloprodigiosin vom Prodigiousin nach *in vivo* Umsetzung
(A) ÄKTA-Chromatographie-basierte Trennung und Fraktionierung von Cycloprodigiosin und Prodigiousin aus Ganzzellextrakten des Stammes *P. putida* KT2440-pig25 bei Expression der Zyklase Prub680. Ein ÄKTA-Chromatographielauf von der Injektion bis zum Ende der Fraktionierung dauerte ca. 20 min und wurde bei einer Wellenlänge von 536 nm aufgezeichnet. Anschließend wurde die Säule ca. 20 min mit dem Laufmittel (60:40, Acetonitril/Wasser, je + 0,1 % Formiat) gespült. Gesammelt und vereinigt wurden jeweils die Fraktionen 12-15 des ersten Signals (Cycloprodigiosin) sowie die Fraktionen 21-27 des zweiten Signals (Prodigiousin). **(B)** HPLC-PDA-Analyse der isolierten Fraktionen. Chromatogramme wurden bei 535 nm aufgenommen; PDA-Spektren ($\lambda = 300 - 650$ nm) sind als Inset gezeigt. In der gesammelten Prodigiousinfraktion konnte im Bereich von $\sim 13,5$ min ein Signal mit dem prodigiousintypischen UV/Vis-Spektrum mit einem Maximum bei 534 nm detektiert werden, während im Bereich um 12,3 min das cycloprodigiosintypische Signal mit UV/Vis-Spektrum mit einem Maximum bei 537 nm in der Cycloprodigiosinfraktion detektiert werden konnte. In beiden Proben trat das jeweilige Signal isoliert auf. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von $n \geq 3$ Versuchen.

Hier konnte festgestellt werden, dass die Proben jeweils ausschließlich das Signal von Prodigiousin bzw. Cycloprodigiosin aufwiesen. Während für die Quantifizierung von Prodigiousin die Messung der spezifischen Absorption und die Konzentrationsbestimmung anhand des bekannten Extinktionskoeffizienten (Domröse et al., 2015) weithin etabliert ist, ist dieser Koeffizient für Cycloprodigiosin bisher nicht beschrieben. Unter der Annahme, dass Cycloprodigiosin einen aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit in der Größenordnung vergleichbaren Extinktionskoeffizienten wie Prodigiousin aufweist, konnte auf Basis einer photometrischen Analyse lediglich auf eine Cycloprodigiosinausbeute im Bereich von unter 1 mg/l geschlossen werden (Kapitel 2.5.1).

Somit konnte die heterologe Biosynthese von Cycloprodigiosin in *P. putida* erstmalig gezeigt werden, was schließlich die Etablierung einer präparativen, chromatographischen Isolation des Produkts ermöglichte. Die Konversionseffizienz in dem hier gezeigten System (Abbildung 3-2) lässt jedoch noch viel Raum für weitere Verbesserungen.

Damit ist die heterologe Cycloprodigiosinproduktion in *P. putidas* KT2440 aktuell noch nicht konkurrenzfähig zu einer Produktion in den nativen Produzenten (Gerber, 1983; Lee et al., 2011). Für den natürlichen Produzentenstamm *Zooshikella marina* JC333T wird dabei ein Titer von 54 mg/l Prodiginosin und 13,5 mg/l Cycloprodigiosin angegeben (Ramaprasad et al., 2015). Diese Mengenangaben entsprechen einem Verhältnis von ~20 % Cycloprodigiosin an der Prodiginosin Gesamtmenge und liegen damit im oberen Drittel der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse (Abbildung 3-2), auch wenn die reale Ausbeute im natürlichen Produzenten deutlich höher ausfällt. Auch für *Zooshikella rubidus* S1-1 konnte gezeigt werden, dass dieses marine Bakterium eine Mischung aus Prodiginosin und Cycloprodigiosin produziert (Lee et al., 2011). Hier wurde allerdings nur der Titer des produzierten Prodiginosins mit 47,8 mg/l bestimmt. Anhand der relativen Absorption der beiden Stoffe in den, in der entsprechenden Publikation gezeigten, Chromatogrammen der Flüssigchromatographie ist jedoch abzulesen, dass der Anteil des Cycloprodigiosins im Verhältnis zum Prodiginosin im Bereich von etwa 1/3 liegen könnte. Jedenfalls war es möglich, dass die Autoren das produzierte Cycloprodigiosin extrahieren und biologische Aktivitätstests mit diesem durchführen konnten. Im Vergleich mit diesen in der Literatur beschriebenen, relativ hohen absoluten Cycloprodigiosinausbeuten, scheint die in dieser Arbeit durch heterologe Produktion erzielte reale Ausbeute von unter 1 mg/l zwar gering, jedoch scheint das erreichte Verhältnis von Cycloprodigiosin zum produzierten Prodiginosin mit max. 36 %, im Vergleich vielversprechend. Bei vormaliger Verwendung der Zyklastase Prub680 und der Beschreibung ihrer Aktivität in *P. rubra*, dem nativen Produzenten der Zyklastase, wurde keine quantitative Analyse durchgeführt (de Rond et al., 2017). In der Publikation zeigte um mehrere Größenordnungen geringere Signale der massenspektrometrischen Analyse lassen daher keinen direkten Schluss auf den Anteil von Cycloprodigiosin im Verhältnis zum produzierten Prodiginosin zu. Der direkte Vergleich der Cycloprodigiosinproduktionsleistung zwischen den nativen Produzenten der beiden *Zooshikella* Arten und *P. rubra* oder auch weiterer Arten, sowie die vergleichende Verwendung verschiedener Zyklastasen im heterologen System, könnte in Zukunft Aufschluss geben, welches Enzym den Ringschluss der C-Kette besonders effektiv katalysiert.

Die Cycloprodigiosinproduktion in *P. putida* bietet zum ersten Mal die Möglichkeit, einen sicheren Laborstamm zur heterologen Produktion zu verwenden. So können die klassischen Probleme einer Produktion im nativen Wirt, wie eine schlechte Handhabung, keine Zulassung zur industriellen Produktion und eine typischerweise geringe Produktion von Sekundärmetaboliten umgangen werden.

Eine gezielte und vermehrte Produktion von Cycloprodigosin wäre dabei zur weiteren Analyse der bisher gezeigten, verglichen mit Prodigiosin, besseren Wirksamkeit gegen bakterielle Erreger und inflammatorische Prozesse, wünschenswert (Krishna et al., 2013; Lee et al., 2011).

Der Umstand, dass sich die Biosynthese zyklischer Prodiginine mindestens zweimal unabhängig voneinander entwickelt hat (Kapitel 1.2.1.2), deutet auf einen starken Selektionsdruck in Richtung dieser zyklischen Sekundärmetabolite hin (de Rond et al., 2017). Eine mögliche Erklärung könnte dabei deren stärkere Wirksamkeit gegen Bakterien im Vergleich mit den nicht-zyklischen Prodigininen sein (Lee et al., 2011). Diese erhöhte Wirksamkeit könnte auch herangezogen werden, um die niedrigen Produkttiter zyklischer Prodigininvarianten in den nativen Produzenten zu erklären, da eine zu hohe Produktionsleistung ab einer kritischen Konzentration auch für die produzierende Zelle toxisch sein könnte.

Eine weitere Erklärung könnten die Temperaturen bei der Kultivierung im Labor sein. Der Stamm *Z. marina* JC333T welcher, aus einer Sandprobe in Shivrajpur–Kachigad *beach* in Gujarat, Indien stammt, wurde bei 30 °C kultiviert (Ramaprasad et al., 2015), was möglicherweise nicht der optimalen Temperatur für die Aktivität der Zyklase entspricht. Auch an den Daten der hier vorliegenden Arbeit ist anhand der durchgeführten Kultivierung bei verschiedenen Temperaturen zu erkennen, dass die optimale Kultivierungstemperatur von *P. putida* KT2440, mit ca. 30 °C, offenbar nicht der optimalen Temperatur der verwendeten Zyklase Prub680 entspricht (vgl. Abbildung 3-2). Diese Beobachtung war insofern zu erwarten, als dass Prub680 aus dem Stamm *P. rubra* ATCC 29570 stammt, welcher aus einer Seewasserprobe an der Küste vor Nizza in Frankreich stammt (Gauthier, 1976), wo die Wassertemperatur im Jahresverlauf zwischen 13 °C und 22 °C schwankt. Zu diesen Temperaturen passen dabei auch die erhobenen Daten, welche zeigen, dass die Umwandlung von Prodigiosin zu Cycloprodigosin bei 20 °C und 25 °C effektiver als bei 30 °C ist (Abbildung 3-2). Zudem konnte beobachtet werden, dass insbesondere eine Kultivierung in TB-Medium die Cycloprodigosinproduktion begünstigt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine ausreichende Versorgung der Zyklase mit Kofaktoren wie FeSO₄ einer Umwandlung förderlich sind, da diese in beschriebenen *in vitro* Versuchen zu einem gesteigerten Umsatz führten (de Rond et al., 2017). Aufgrund der deutlich höheren Konzentration von Hefeextrakt in TB-Medium könnte dementsprechend auch die Menge verschiedener Komponenten, welche als Kofaktoren dienen können, gegenüber LB-Medium erhöht sein, was einer gesteigerten Umsatzrate zugutekommen könnte.

Um also die Produktion zyklischer Prodigininvarianten effektiver und konkurrenzfähig zur Produktion in den nativen Produzenten zu machen, sollten verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Eine Möglichkeit wäre, eine genomische Integration und starke Expression der kodierenden Sequenz einer Zyklase (z.B. Prub680) in Kombination mit den *pig*-Genen aus *S. marcescens* in einem artifiziellen Operon. Dieses künstlich erstellte Operon könnte dann in einem heterologen Produktionswirt stark exprimiert und zur Produktion von Cycloprodigosin genutzt werden. Als weitere bzw. aufbauende Verbesserung könnte das zyklisierende Enzym zusätzlich optimiert werden, um es im Sinne einer biotechnologischen Produktion auf eine maximale Effizienz hin zu einem gezielten Produkt auszurichten. Im Zuge einer solchen Optimierung kann es sinnvoll sein, das gewünschte Enzym durch gerichtete Mutagenese effizienter für die gewünschte Reaktion zu machen.

Zusätzlich könnte eine Ko-Integration des kodierenden Gens der Zyklase mit den *pig*-Biosynthesegenen dabei erstens dafür sorgen, dass alle notwendigen Gene zur kompletten Biosynthese zum gleichen Zeitpunkt exprimiert werden und zweitens möglicherweise eine Produktion der Enzyme in räumlicher Nähe ermöglichen, was wiederum zu einem höheren Umsatz führen könnte. Dieses Prinzip kommt natürlicherweise beispielsweise durch die Kompartimentierung von Zellen und die Unterteilung von Organen in verschiedene Gewebe zum Tragen. Auch in der Biotechnologie wird das Prinzip schon vielfach angewendet, indem Enzyme, die aufeinander folgende Reaktionen katalysieren, mit verschiedenen Methoden, wie der Fusion von Proteinen, einem Gerüst aus Nukleinsäuren oder Proteinen oder dem Einschluss in Vesikel in räumliche Nähe gebracht und dort gehalten werden (Ngo et al., 2016; Quin et al., 2017). Eine fehlende räumliche Nähe zwischen beiden Enzymen könnte dabei eine der Hauptursachen für die verbesserungswürdige Umwandlungseffizienz von Prodigiosin zu Cycloprodigosin sein, da Prodigiosin nach der Kondensation seiner beiden Vorstufen vermutlich direkt – möglicherweise über Membranvesikel (Bitzenhofer et al., 2021; Tan et al., 2020) – aus der Zelle transportiert wird. Insbesondere da Prub680, ähnlich wie PigC, offenbar membranassoziiert ist, da das Enzym vermutlich mehrere Transmembranhelices besitzt (Brands et al., 2020; Chawrai et al., 2012; de Rond et al., 2017), wäre eine Integration dieser Enzyme in relativer räumlicher Nähe im Setup der Ko-Integration von *pig*-Genen und *Prub680* wahrscheinlicher. Dies könnte die Umsetzung begünstigen, indem ein geringerer Anteil des produzierten Prodigiosins direkt aus der Zelle geschleust wird und ein größerer Anteil im Zuge der Diffusion, auf ein zyklisierendes Enzym trifft und von diesem zu Cycloprodigosin umgewandelt wird. Ein weiterer Vorteil einer Genomintegration aller Gene wäre zudem, dass der Wirtsorganismus nicht durch Antibiotika belastet werden müsste, welche zum Erhalt eines Plasmids nötig sind.

Abschließend betrachtet, zeigen die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass die Konversion von Prodigiosin, welches durch Expression des *pig*-Genclusters aus *S. marcescens* in *P. putida* heterolog produziert wurde, durch die gleichzeitige plasmidbasiert exprimierte di-Eisen Oxygenase Prub680, bereits möglich ist. Auf Basis dieser Erkenntnis können nun weitere Schritte unternommen werden, um die Herstellung, möglicherweise anhand der diskutierten Punkte, zu optimieren. So könnten in Zukunft größere Mengen Cycloprodigosin erzeugt, isoliert und dessen biologische Aktivität weiter untersucht werden. Schließlich ist jedoch nicht nur das Cycloprodigosin als Produkt interessant, sondern auch das Enzym Prub680 als biologischer Katalysator, dessen Mechanismus zur Aktivierung von [C-H] -Verbindungen auch zur Erzeugung anderer zyklischer Prodiginine hilfreich sein könnte.

Umsetzung von Prodigiosin zu Cycloprodigosin:

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Expression eines weiteren Gens in einem Prodigiosin produzierenden *P. putida*-Stamm die Umwandlung zu Cycloprodigosin möglich ist. Dieses Produkt kommt natürlicherweise in *P. rubra* vor, aus welchem auch die genetische Information der hier heterolog exprimierten Zyklase Prub680 stammt. Somit konnte nicht nur Prodigiosin heterolog produziert, sondern auch die *in vivo* Umwandlung dieses Produkts zu Cycloprodigosin erstmals in einem heterologen Wirt gezeigt werden. Zudem konnte die Trennung beider Verbindungen erzielt werden.

3.1.2 Produktion von Norprodigiosin mit Hilfe eines artifiziellen Genclusters

Die Produktion und Evaluation der Aktivität von Norprodigiosin wurde bislang wenig erforscht und könnte mit einem heterologen System möglicherweise ermöglicht werden. Aufgrund der Möglichkeit, durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* zu klonieren, war es mit Hilfe des γ TREX-Systems bereits mit wenig Aufwand möglich, das Violacein- oder Phenazin-Gencluster gezielt zu verändern (Domröse et al., 2017). Mit Hilfe dieser Methode sollte im Zuge dieser Arbeit ein artifizielles Gencluster auf Basis des Prodigiosin-Gencluster zur heterologen Biosynthese von Norprodigiosin in den γ TREX-Vektor kloniert werden. Dieses sollte schließlich in das Genom des heterologen Produktionswirts *P. putida* KT2440 integriert werden. Durch die Integration *via* Tn5-Transposition sollten so verschiedene Stämme erzeugt werden, die aufgrund der zufälligen Lokalisation der Gene im Wirtsgenom unterschiedliche Mengen Norprodigiosin produzieren.

3.1.2.1 Klonierung eines artifiziellen Norprodigiosin-Genclusters in den γ TREX-Vektor

Im nativen Prodigiosinbiosyntheseweg in *S. marcescens* wird das Dipyrrol HBC durch PigF und PigN zu MBC umgewandelt, indem eine Methylgruppe angefügt wird (Abbildung 1-4, B). Sind diese beiden Proteine jedoch nicht vorhanden, erfolgt keine Methylierung des HBC, welches von der Ligase PigC dennoch zusammen mit dem Monopyrrol MAP zu Norprodigiosin kondensiert werden kann (Hearn et al., 1964; Mody et al., 1990; Williamson et al., 2005). Anstatt in einem vorhandenen Prodigiosinproduktionsstamm die entsprechenden beiden Gene zu mutieren und so deren Funktion zu unterbinden, wurde die Strategie gewählt, diese schon bei der Klonierung des γ TREX-Vektors vollständig aus dem Gencluster zu entfernen. So sollte ein artifizielles Gencluster, bestehend aus den Genen *pigABCDEFGHIJKLM* erzeugt und in das Wirtsgenom integriert werden. Um dies zu ermöglichen, sollten die benötigten Gene zuerst mittels PCR amplifiziert werden (Kapitel 2.6.2.6).

Da alle notwendigen Enzyme innerhalb des *pig*-Genclusters kodiert sind, wurde dieses, vorliegend auf dem Vektor pUC19-*pig*, als *Template* zur Amplifikation der DNA-Fragmente verwendet. Zur Planung der Primer wurde das artifizielle Gencluster dabei zuerst *in silico* mit Hilfe der Software Clone Manager designt und die entsprechenden Gene in der gewünschten Reihenfolge angeordnet. Aufgrund der Größe des Konstrukts wurde das Gencluster in drei Teile aufgeteilt, welche die Gene *pigA-C* (Primer AD142+149, 5907 Bp), *pigD-E* (Primer AD150+151, 5386 Bp) sowie die Gene *pigG-M* (Primer AD152+148, 8079 Bp) umfassten (Tabelle 2-9). Sämtliche Gene wurden dabei inklusive der 5'-gelegenen untranslatierten Region (UTR) mit der jeweiligen Ribosombindestele (RBS) amplifiziert. Um bei dieser Klonierung das Prinzip der homologen Rekombination zu nutzen, wurden den Primern homologe Sequenzen zu den jeweiligen benachbarten Fragmenten angefügt.

Diese wurden somit den bei den PCRs entstehenden DNA-Fragmente angefügt und ermöglichten die Rekombination zwischen den einzelnen Fragmenten bzw. den endständigen Nukleotid-Sequenzen des linearisierten γ TREX-Vektors (Weihmann et al., 2020). Gleichzeitig wurde durch die Individualität der DNA-Sequenzen gewährleistet, dass die Fragmente in der vorgesehenen Reihenfolge rekombiniert werden. Parallel wurde der γ TREX-Vektor (Domröse et al., 2017) durch die *homing*-Endonuklease I-SceI linearisiert. Anschließend wurden kompetente Hefezellen mit den drei Fragmenten des Genclusters, sowie dem linearisierten γ TREX-Vektor transformiert und dort in einem Schritt durch hefebasierte homologe Rekombination (Kapitel 2.6.1.1) zum fertigen Vektor γ TREX-Norprodigiosin zusammengefügt.

3.1.2.2 Integration des artifiziellen Norprodigiosin-Genclusters ins *P. putida*-Genom

Um das erzeugte, artifizielle Gencluster in das Wirtsgenom von *P. putida* KT2440 zu integrieren (Abbildung 3-4 A), wurde der Vektor γ TREX-Norprodigiosin durch Konjugation (Kapitel 2.5.5.5) in Zellen des Bakteriums übertragen. In den Zellen wurde das Gencluster dabei durch die Aktivität der Tn5-Transposase an einer zufälligen Stelle ins Wirtsgenom integriert (Reznikoff, 2008). Durch diese Methode der Integration lassen sich in kurzer Zeit viele genetisch verschiedene Produktionsstämme erzeugen, die in vielen Fällen unterschiedliche Produktionskapazitäten aufweisen, welche vermutlich durch den Integrationsort im Genom und die dort liegenden intrinsischen Promotoren definiert werden (Kapitel 1.4) (Domröse et al., 2017). Nach der Konjugation und der Kultivierung der Transkonjugantenklone wurden von diesen verschiedene ausgewählt, die eine geringe, orange Färbung aufwiesen. Dieser Phänotyp wurde für norprodigiosinbildende *Serratia* und *Hahella*-Mutanten bereits beschrieben (Alihosseini et al., 2009; Mody et al., 1990; Williams & Green, 1956; Williamson et al., 2005) und daher als Kriterium eines visuellen Screening herangezogen, da sich einige Klone so von der wildtypischen Färbung anderer Transkonjuganten unterschieden. Anhand dieser Methode wurden die Stämme Nor1, 2, 3, 5, 7 und 8 als das auf Norprodigiosinproduktion zu testende Set von Stämmen zusammengestellt (Abbildung 3-4, B).

Im Rahmen der im Laufe der vorliegenden Dissertation betreuten Bachelorarbeit von Schinya Ibrahim, wurden diese anschließend weiter untersucht, um eine mögliche Norprodigiosinproduktion zu validieren. Dazu wurden Extrakte von Zellen der *P. putida*-Stämme Nor1, 2, 3, 5, 7 und 8 sowie des KT2440 Wildtyps in Zusammenarbeit mit Birgit Henßen aus dem Institut für Bioorganische Chemie (IBOC, HHUD) mittels LC-MS analysiert. Besonders die in den Proben der Stämme Nor1, 2, 3, 5, 7 erhaltenen Signale von $310\ m/z\ [M+H]^+$ passten dabei zu Norprodigiosin und wurden nicht in Extrakten der wildtypischen Zellen detektiert (Ibrahim, 2019). In Stamm Nor8, der die geringste Pigmentierung zeigte, wurde das Signal ebenfalls nicht festgestellt.

Da die stärksten Signale im Stamm *P. putida* Nor1 und Nor2 gemessen werden konnten und da diese gleichzeitig die stärkste Pigmentierung aufwiesen, wurden diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Nor2 zeigte dabei ein noch stärkeres Signal als Nor1.

Zur Analyse der Pigmente dieses Stammes wurden zunächst 10 ml Kulturen in LB-Medium über 24 h angezogen (Kapitel 2.5.4.4), welche zum Ende der Kultivierung bereits die erwartete orange Färbung zeigten. Im Anschluss erfolgte eine Extraktion der Pigmente mit Ethanol (Kapitel 2.8.1.1). Von dem erhaltenen Extrakt wurde ein UV/VIS-Spektrum einer Wellenlänge von 300-700 nm aufgenommen (Abbildung 3-4 C).

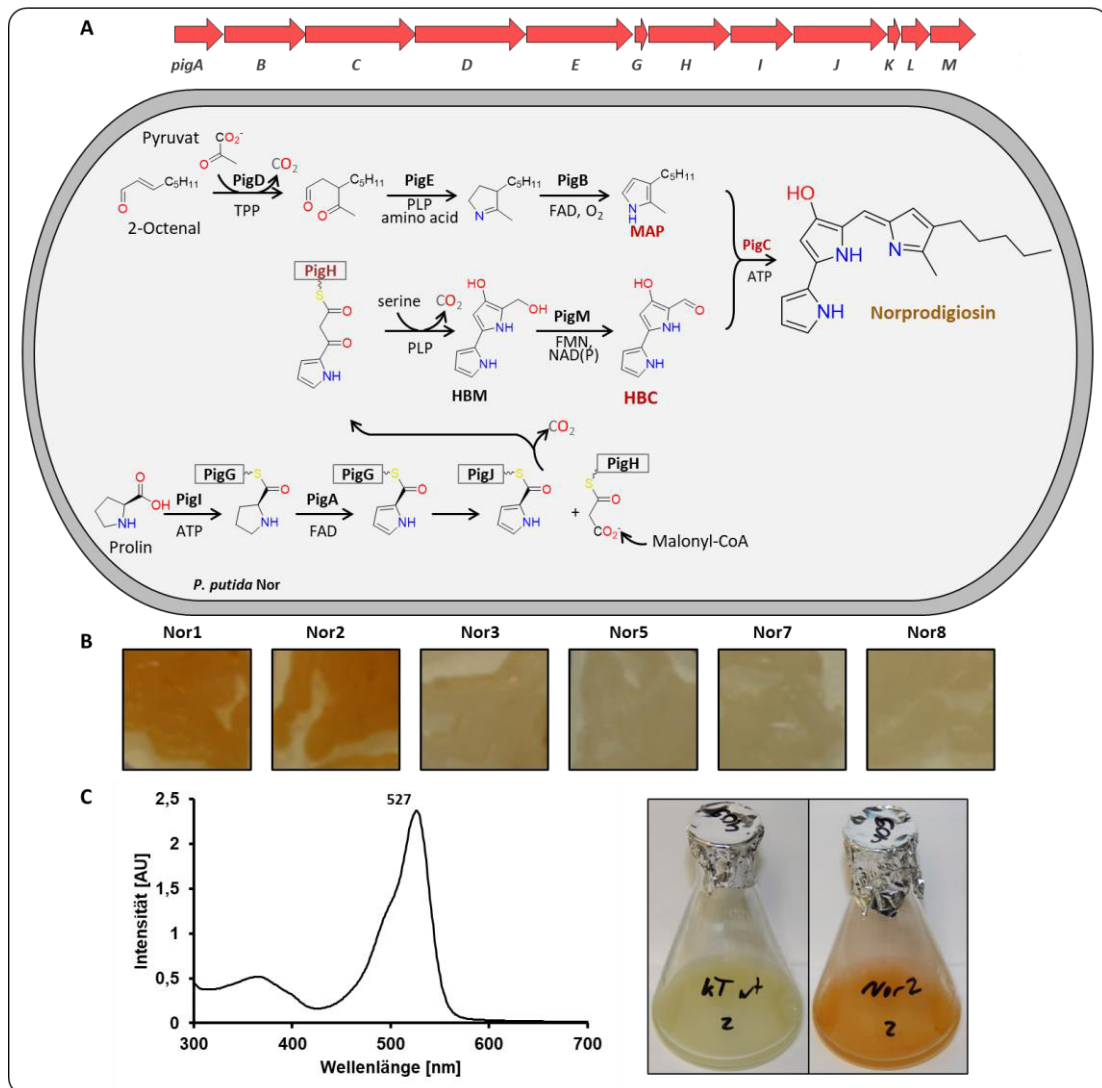


Abbildung 3-4: Erzeugung von pigmentierten Expressionsstämmen durch Integration eines künstlichen Norprodigiosin-Genclusters in das Genom von *P. putida* KT2440

(A) Durch zufällige Integration des Norprodigiosin Transposons mittels Tn5-Transposition konnten verschiedene Stämme mit unterschiedlichen Produktionskapazitäten erzeugt werden (B). Von diesen Stämmen wurde Nor2 als bester Produzent ausgewählt, in LB-Medium kultiviert und die Pigmente extrahiert. Von diesem Extrakt wurde das Absorptionsspektrum bei Wellenlängen zwischen 300 und 700 nm gemessen und so das Absorptionsmaximum bei 527 nm bestimmt. (C). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von n≥3 Versuchen.

Das gemessene Absorptionsspektrum der extrahierten Pigmente konnte nun mit vormals publizierten Daten verglichen werden, wobei die Absorptionseigenschaften des extrahierten Pigments in der Literatur nicht einheitlich beschrieben werden. Absorptionsmaxima in saurer alkoholischer Lösung werden dort bei ca. 500 nm diskutiert (Alihosseini et al., 2009; Williams & Green, 1956) oder ca. 526 nm (Medina-Castro, 1969; Qadri & Williams, 1973).

Die Pigmente des hier genauer untersuchten Stammes Nor2 zeigten ein Absorptionsmaximum bei 527 nm. Somit schien eine Spezifität des Absorptionssignals für Norprodigiosin denkbar.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Absorptionssignatur im Ganzzellextrakt tatsächlich auf Norprodigiosin zurückzuführen ist. Dazu wurde zunächst der Ganzzellextrakt mit Hilfe eines Massenspektrometers analysiert (Kapitel 2.8.6), um die Masse von Norprodigiosin nachzuweisen. Dabei konnte in der Probe des Stammes *P. putida* Nor2 mit m/z 310 ein dem Protonaddukt von Norprodigiosin entsprechendes Signal detektiert werden (Abbildung 3-5, A). Um festzustellen, ob dieses mit der Substanz, die die UV/Vis-Signatur verursacht, übereinstimmt, wurde eine Umkehrphasen-HPLC-PDA-Analyse und Fraktionierung vorgenommen (Kapitel 2.8.3.1) (Abbildung 3-5, B).

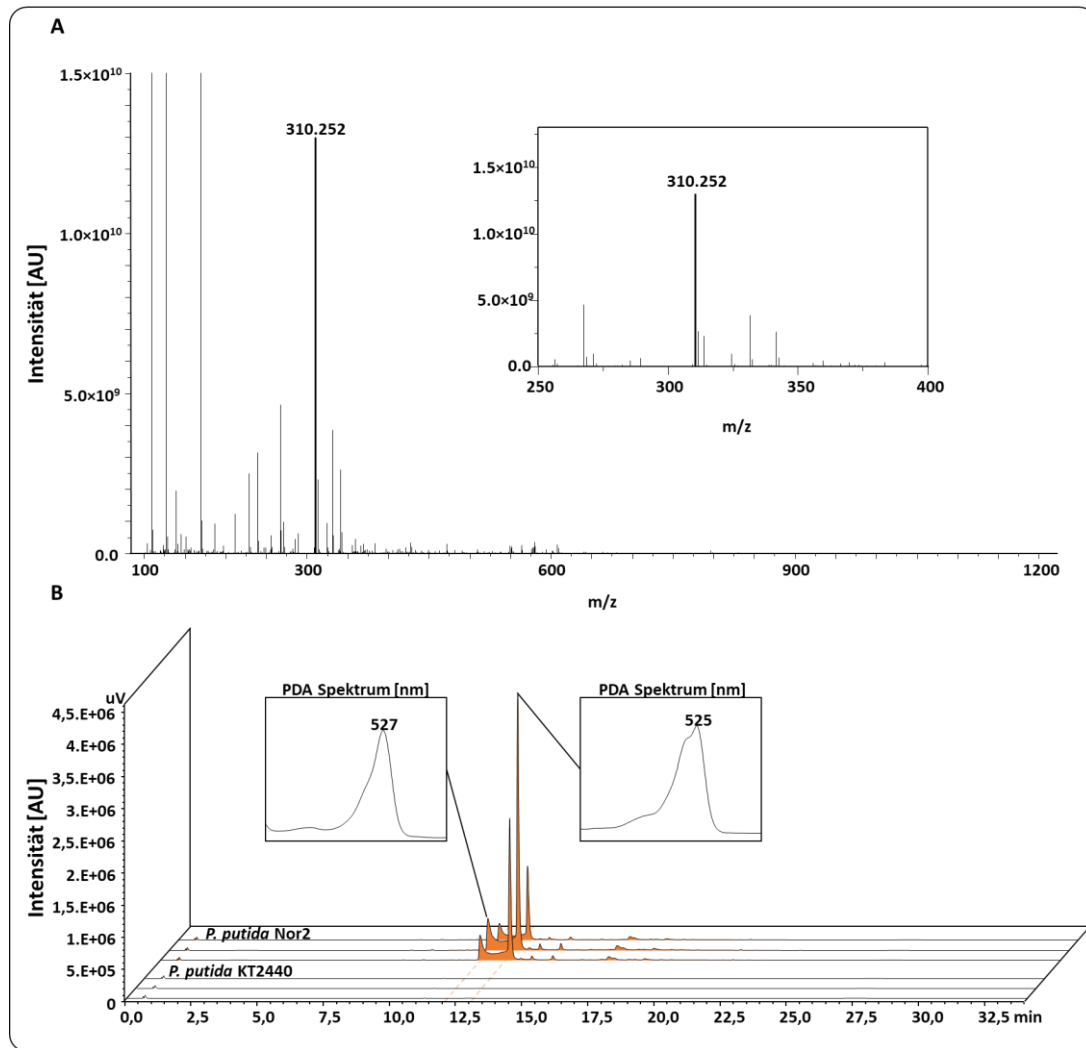


Abbildung 3-5: Massenspektrometrische und HPLC-Analyse von Proben der *P. putida*-Stämme Nor2 und KT2440

(A) Die Masse m/z 310 wurde im Extrakt aus Nor2 mittels eines Advion CMS detektiert, was einem Norprodigiosin-Protonaddukt $[M+H]^+$ entspricht und war, wie erwartet, in den Extrakten der Kontrollstämmen nicht detektierbar. Der Bereich von $m/z = 250$ bis 400 ist als Inset gezoomt dargestellt. (B) Bei der Analyse der Extrakte *via* HPLC mit angeschlossenen PDA-Detektor konnte in Chromatogrammen, die bei einer Wellenlänge von 526 nm aufgenommen wurden, im Stamm Nor2 starke Signale detektiert werden, welche in den wildtypischen Kontrollstämmen nicht auftraten. Ergänzend sind die hier gemessenen PDA-Spektren ($\lambda = 300 - 650$ nm) gezeigt. Dargestellt ist im Fall der massenspektrometrischen Analyse ein repräsentatives Experiment von $n \geq 3$ Versuchen; im Fall der HPLC-PDA-Analyse sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sowie repräsentative Spektren dargestellt.

Dabei konnten in den Proben der *P. putida* Nor2 Kulturen ein Hauptsignal und ein Nebensignal im Bereich einer Retentionszeit von 12 und 13 min detektiert werden. Zudem wiesen die zugehörigen UV/Vis-Spektren, die bereits in der Literatur beschriebene und möglicherweise typische Signatur mit einem Maximum im Bereich einer Wellenlänge von 526 nm auf, welche in den zum Vergleich herangezogenen Proben des *P. putida* KT2440 Wildtyps nicht detektiert werden konnten. Die etwas längere Retentionszeit im Vergleich mit Prodigiosin, das zuvor mit derselben Methode analysiert wurde (Kapitel 3.1.1), entspricht der Elutionsreihenfolge, die in ähnlichen Umkehrphasen-Chromatographien vormals festgestellt wurde (Kim et al., 2007). Die Fraktionen beider Signale wurden mit Hilfe eines an die HPLC angeschlossenen Fraktionssammlers gesammelt.

Nach einer 2-Phasen Extraktion (Kapitel 2.8.5.1) und gleichzeitiger Konzentration der Proben wurden diese wiederum mit einem Massenspektrometer analysiert. Erneut konnte die Masse von Norprodigiosin, wenn auch mit einer geringen Intensität, detektiert werden. Da also eine Korrelation der Norprodigiosinmasse und der UV/Vis-Signatur festgestellt werden konnte, wurde im Folgenden die spezifische Absorption als Indikator der Norprodigiosinbildung verwendet, um die Produktion zu evaluieren und zu optimieren.

3.1.2.3 Norprodigiosinproduktion unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

Anhand der beschriebenen Vortests zur Identifizierung von Klonen, welche Norprodigiosin produzieren, wurden die beiden potenziell besten Produzenten *P. putida* Nor1 und Nor2, ausgewählt, um deren Norprodigiosinproduktionsleistung unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen zu analysieren und besonders geeignete Produktionsbedingungen zu definieren. Dazu wurden beide Stämme jeweils in Flowerplates bei 20, 25 und 30 °C über 24 h bei 1400 UpM in 1 ml LB-Medium kultiviert. In der Annahme, dass das gebildete Pigment Norprodigiosin ist, wurde die Produktion anhand der Absorption in Extrakten evaluiert. Daher wurden die Zellen der gesamten Kultur sedimentiert, in 1 ml Ethanol (EtOH, 4 % HCl) extrahiert und die Menge des produzierten Norprodigiosins durch die Messung der Absorption des Extraktes bei einer Wellenlänge von 526 nm und Berechnung anhand des Extinktionskoeffizienten von Norprodigiosin (Medina-Castro, 1969) in Ethanol näherungsweise bestimmt (Abbildung 3-6).

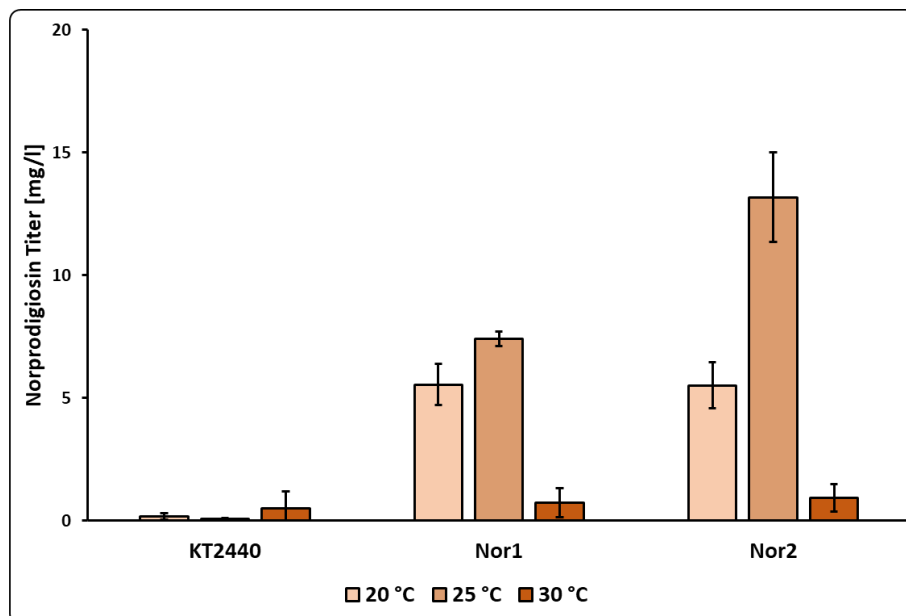


Abbildung 3-6: Vergleich der Norprodigiosinproduktion verschiedener *P. putida*-Stämme bei verschiedenen Bedingungen
Abgebildet sind die Produkttiter des produzierten Norprodigiosins der Stämme *P. putida* Nor1 und Nor2 nach 24 h Kultivierung in 1 ml LB, jeweils bei 20 °C, 25 °C und 30 °C im Vergleich mit dem *P. putida* KT2440 Wildtyp. Von den Kulturen wurden jeweils die gesamten Zellen sedimentiert, eine Extraktion mit Ethanol durchgeführt und durch Messung der Absorption bei 526 nm mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten das enthaltene Norprodigiosin und der Produkttiter der Kulturen in mg/l bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte einer biologischen Mehrfachbestimmung ($n \geq 3$), mit ihren als Fehlerbalken angezeigten Standardabweichungen.

Wie die Pigmentierung bereits andeutete, ergaben beide Stämme verschiedene Norprodigosinkonzentrationen. Es fällt auf, dass in beiden Stämmen ein ähnliches Muster vorlag. Beide zeigen die maximalen Produktionslevel bei 25 °C. Ähnlich wie bei der Umsetzung von Prodigiosin zu Cycloprodigosin (Kapitel 3.1.1) ist auffällig, dass eine Wachstumstemperatur von 30 °C, welche für *P. putida* optimal ist und allgemein zu höheren Zelldichten führt, ungeeignet für die Produktion von Norprodigosin zu sein scheint. So wurden die zweithöchsten Produktmengen in beiden Stämmen bei 20 °C gebildet. Unabhängig von den äußeren Einflüssen wurde jedoch deutlich, dass es sich beim Stamm *P. putida* Nor2 um den potenteren Norprodigosinproduzenten handelt.

3.1.2.4 Norprodigosinproduktion in größerem Maßstab

Um eine größere Menge Norprodigosin zu produzieren, sodass dieses schlussendlich isoliert und für weitere Tests verwendet werden konnte, wurden Kulturen in größerem Maßstab angezogen und unter den identifizierten, verbesserten Bedingungen kultiviert (Kapitel 3.1.2.3). Dabei sollte zudem ein weiterer Test bezüglich des Sauerstoffeintrags und der Kultivierungsdauer durchgeführt werden, um die Norprodigosinproduktionsleistung weiter zu verbessern.

Dazu wurden die Kulturen sowohl in Erlenmeyerkolben mit als auch ohne Schikanen in LB-Medium bei 25 °C kultiviert. So sollte im direkten Vergleich der Einfluss der Sauerstoffversorgung deutlich werden. Um zudem den Einfluss der Kultivierungsdauer zu untersuchen, wurden die Ergebnisse beider Bedingungen nach 24 h und 48 h betrachtet.

In den gewählten Erlenmeyerkolben mit 500 ml Gesamtvolumen wurden jeweils 50 ml Kulturen des Stammes *P. putida* Nor2 kultiviert, welcher im vorherigen Test bei der Kultivierung in Flowerplates die besten Produktausbeuten zeigte (Abbildung 3-6). Zur Analyse der Probe nach 24 h wurde den Kulturen jeweils 1 ml entnommen und das bis zu diesem Zeitpunkt produzierte Norprodigosin extrahiert (Kapitel 2.8.1.1). Die Extraktion des Produkts erfolgte nach 24 h wie auch nach Ende der Kultivierung mit 1 ml Ethanol. So wurden wie in Kapitel 3.1.2.3 beschrieben, die Pigmente extrahiert und die produzierten Norprodigosinproduktmengen anhand der Absorption bei 526 nm mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten (Medina-Castro, 1969) näherungsweise bestimmt. In Erlenmeyerkolben mit Schikanen lag die Produktmenge nach den ersten 24 h mit 12,3 mg/l noch leicht über der von Kulturen ohne Schikanen, konnte in den folgenden 24 h mit einer Steigerung auf 12,5 mg/l jedoch kaum noch gesteigert werden. In Kulturen aus Kolben ohne Schikanen verdoppelte sich die Produktmenge von 10,3 mg/l nach 24 h auf 20,4 mg/l nach 48 h dagegen fast (Abbildung 3-7). Auffällig war, dass sowohl eine Kultivierung über 48 h in Erlenmeyerkolben ohne Schikanen die Ausbeute deutlich verbesserte als auch, dass vermehrter Sauerstoffeintrag nach 24 h in Kolben mit Schikanen offenbar nicht zu mehr Produkt führte. Beide Testparameter brachten damit weitere Erkenntnisse, die für eine technische Verbesserung gegenüber den im kleinen Maßstab identifizierten Bedingungen (Kapitel 3.1.2.3) sorgten.

Der vermutlich im Verhältnis zu Erlenmeyerkolben hohe Sauerstoffeintrag, welcher in Flowerplates und somit im ersten Test zur Identifizierung verbesserter Bedingungen generell gegeben war, war dementsprechend eher ein Nachteil, da sämtliche Titer dort geringer waren.

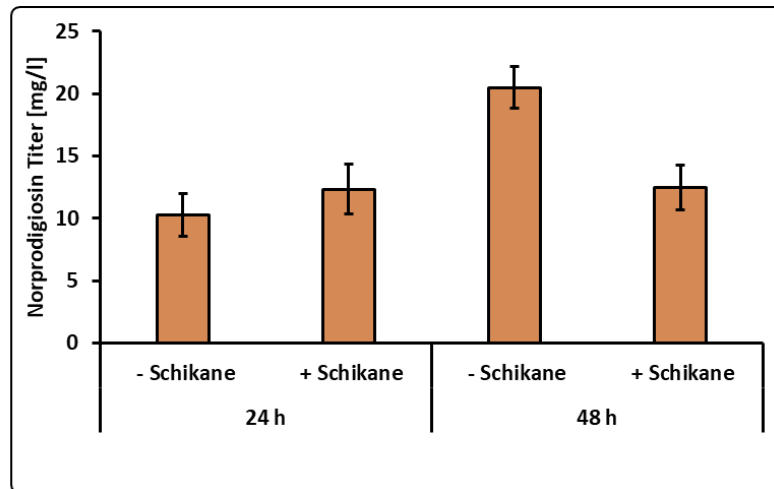


Abbildung 3-7: Norprodigiosintiter des Stammes *P. putida* Nor2 in 50 ml Kulturen vergleichend nach 24 h und 48 h

Abgebildet sind die Norprodigiosinprodukttitertiter nach 24 h und 48 h, in 50 ml Kulturen, kultiviert in LB-Medium in Erlenmeyerkolben mit (+) und ohne (-) Schikanen. Von den Kulturen wurden Proben entnommen, mit Ethanol extrahiert und das enthaltene Norprodigiosin durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 526 nm und mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten der Produkttitertiter der Kulturen in mg/l bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte einer biologischen Mehrfachbestimmung ($n \geq 3$) mit ihren als Fehlerbalken angezeigten Standardabweichungen.

Aufgrund der Tatsache, dass bei einer Kultivierung mit geringerem Sauerstoffeintrag deutlich mehr Produkt gebildet wurde, wurden fünf dieser Kulturen zur Extraktion verwendet. Das potenziell produzierte Norprodigiosin wurde somit durch den Aufschluss der pelletierten Zellen aus insgesamt 250 ml Zellkultur mit Ethanol extrahiert (Kapitel 2.8.1.1). Anschließend wurde das Extrakt durch Evaporation des Ethanols getrocknet und in 5 ml Methanol gelöst. Zur Säulung von Norprodigiosin wurde das ÄKTA Basic Chromatographiesystems ähnlich wie in Kapitel 3.1.1.1 für Cycloprodigiosin beschrieben, verwendet. Dabei wurde auch hier eine ISAspher 100-5 C18 AQ Säule mit den Dimensionen 20 x 150 mm und eine Flußrate von 15 ml/min gewählt. Zur Elution diente ein in Vortests festgelegtes Wasser/Acetonitril-Gemisch (50:50 %) (Tabelle 7-1). Bei 526 nm aufgezeichnete Chromatogramme zeigten zwei Signale. Parallel wurden mit Hilfe eines Fraktionssammlers beide Signale separat gesammelt, um beide Fraktionen unabhängig voneinander analysieren zu können. Anschließend wurden die Eluate beider Signale einer 2-Phasen-Extraktion (Kapitel 2.8.5.1) unterzogen und getrocknet. Die getrockneten Proben wurden anschließend erneut gelöst und eine massenspektrometrische Analyse mittels des Advion CMS durchgeführt (Abbildung 3-8, A) (Kapitel 2.8.6). In beiden Fraktionen konnte dabei die Masse m/z 310 in der Massenanalyse detektiert werden, was dem Norprodigiosin-Protonaddukt $[M+H]^+$ entspricht (Abbildung 3-8, B). So wurde validiert, dass in der Tat das Massesignal und die UV/Vis-Signatur in den Fraktionen zusammenfallen und dem Pigment Norprodigiosin entsprechen.

Für beide Proben wurde abschließend die Menge des final extrahierten Norprodigosin mit Hilfe der Absorption bei 526 nm, des molaren Extinktionskoeffizienten (Medina-Castro, 1969) und des Molekulargewichts kalkuliert (Kapitel 2.8.2.2). Für Signal 1 ergaben sich so 0,18 mg Norprodigosin und für Signal 2, 1,86 mg. In Summe konnten also 2,04 mg Norprodigosin aus 250 ml Kultur gewonnen werden, was 8,16 mg aus einem Liter Kultur bei den beschriebenen Anzucht- und Extraktionsbedingungen entspräche. Es konnte somit mit großer Sicherheit die biosynthetische Produktion von Norprodigosin nachgewiesen werden. *P. putida* KT2440 ist damit der erste Laborstamm, in dem gezielt, durch die Integration eines artifiziellen Genclusters, heterolog Norprodigosin produziert, extrahiert und analysiert werden konnte. Somit wurde ein Ansatz etabliert, der die Gewinnung von Norprodigosin aufzeigt und dessen weitere Analysen, etwa mittels NMR-Spektroskopie zur abschließenden Strukturbestätigung oder mittels Bioaktivitäts-Assays zur vergleichenden Untersuchung mit anderen Prodigininen, erlauben wird. Welches Phänomen dem Trennverhalten von Norprodigosin in ein Neben- und ein Hauptsignal auf den beiden unterschiedlichen verwendeten C18-Säulenmaterialien zugrunde liegt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.

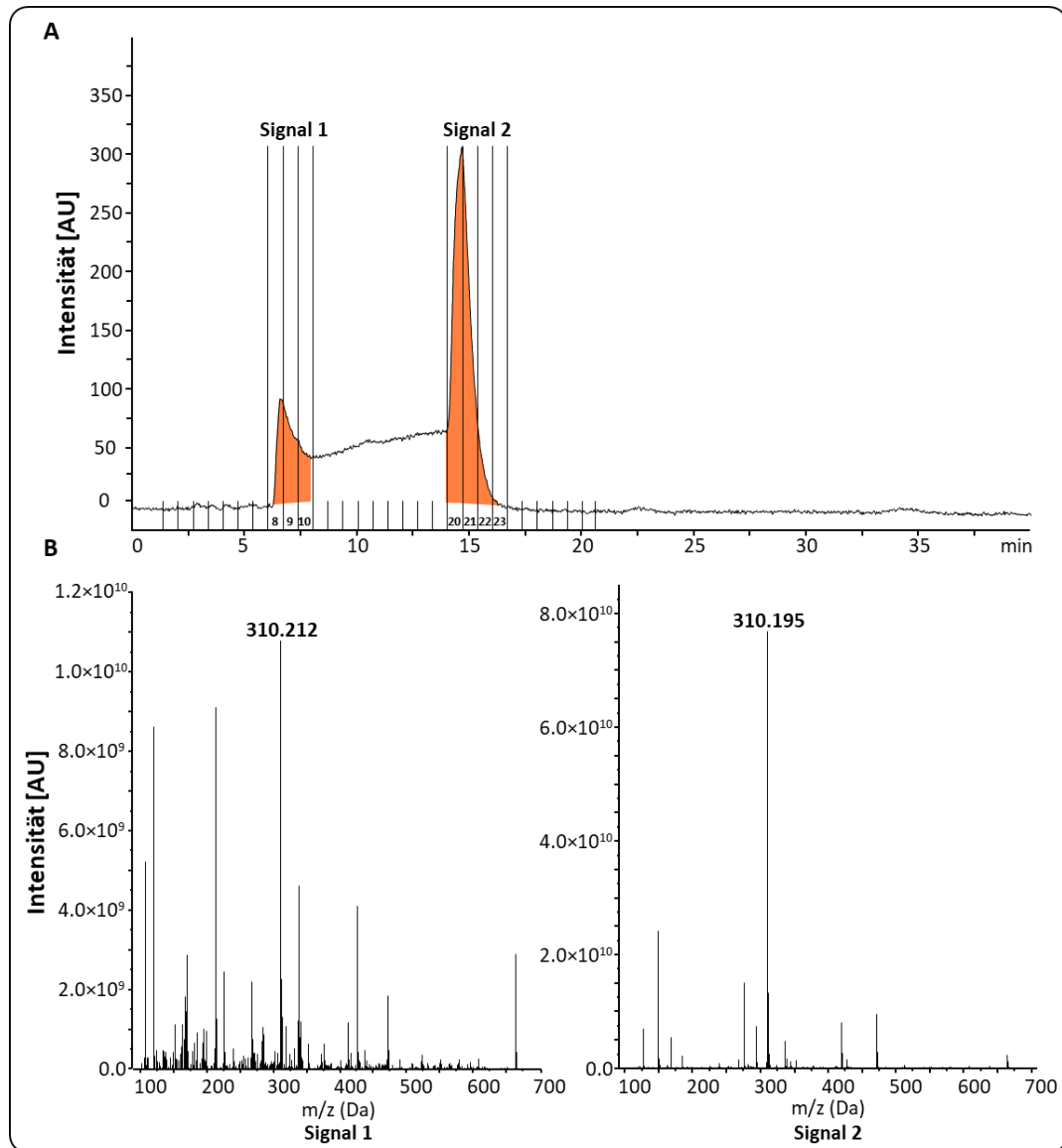


Abbildung 3-8: ÄKTA-Chromatographie-basierte Isolierung und massenspektrometrische Analyse des Pigments aus Extrakten von *P. putida* Nor2

(A) Ein ÄKTA-Chromatographielauf von der Injektion bis zum Ende der Fraktionierung dauerte ca. 20 min und wurde bei einer Wellenlänge von 526 nm aufgezeichnet. Anschließend wurde die Säule ca. 20 min mit dem Laufmittel (50:50, Acetonitril/Wasser, je + 0,1 % Formiat) gespült. Gesammelt und vereinigt wurden jeweils die Fraktionen 8-10 für das kleineren Signal 1, sowie die Fraktionen 20-23 für das größeren Signal 2. (B) Die gesammelten Fraktionen wurden wiederum einer 2-Phasen Extraktion und einer massenspektrometrischen Analyse mittels Advion CMS unterzogen, wobei in beiden Signalen ein dem Protonaddukt von Norprodigiosin entsprechendes Massesignal detektiert wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von $n \geq 3$ Versuchen.

Aufgrund der Tatsache, dass Norprodigiosin das erste Mal heterolog produziert werden konnte, können keine Titer anderer heterologer Expressionsstudien zum Vergleich der Produktionsleistung herangezogen werden. Stattdessen kann der erreichte Wert von 2,04 mg aus 250 ml Kultur bzw. 8,16 mg/l Kultur mit dem der Dissertation von Jorge Medina-Castro verglichen werden (Medina-Castro, 1969). Dazu muss jedoch die hier produzierte Menge Norprodigiosin zuvor auf das Zelltrockengewicht (*DCW*) bezogen werden, da die erreichte Ausbeute dort in dieser Einheit angegeben ist.

Dazu wurde mit dem Mittelwert der gemessenen $OD_{650\text{ nm}}$ Werte der hier extrahierten Kulturen gerechnet und ein Zellrockengewicht von $0,72\text{ mg}/OD_{650\text{ nm}} = 1$ angenommen (Domröse et al., 2015). Nach dieser Korrelation entsprechen die hier in 250 ml Kultur enthaltenen Zellen einer DCW von $0,68\text{ g}$, was eine Norprodigiosinausbeute von $\sim 3,02\text{ mg/gDCW}$ ergibt. Die hier durch heterologe Expression des erzeugten, artifiziellen Norprodigiosin-Genclusters erreichte Norprodigiosinausbeute liegt damit höher als die im mutanten Norprodigiosin produzierenden Stamm *S. marcescens* OF erreichte Wert von $\sim 1,68\text{ mg/g DCW}$ (Medina-Castro, 1969).

Die geringeren Ausbeuten in der Mutante könnten möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass die Kulturen bei 28 °C in Kolben mit 20 bzw. 35 % Füllvolumen kultiviert wurden (Medina-Castro, 1969). Obwohl aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse davon ausgegangen werden kann, dass eher durch zu viel Sauerstoff im Medium eine Verschlechterung der Norprodigiosinproduktion hervorgerufen werden kann (Abbildung 3-6), könnte ein Füllvolumen von deutlich über 10 % des Kolbenvolumens hier zu einer Sauerstofflimitation und einer schlechteren Produktion geführt haben. Weiter konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Temperatur von 25 °C zu den höchsten Ausbeuten der getesteten Temperaturen führt, während eine Kultivierung bei 30 °C signifikant schlechtere Ausbeuten lieferte. Es ist demnach denkbar, dass die geringeren Temperaturen günstiger für die enzymatischen Schritte der Norprodigiosinbildung oder für die Expression der die Enzyme kodierenden Gene sind.

Diese Ergebnisse werden unterstützt von *in vitro* Studien, die zeigten, dass PigC im Bezug auf die Kondensation von MAP und MBC bei niedrigen Temperaturen von weniger als 20 °C seine maximale Stabilität sowie bei $\sim 10\text{ °C}$ eine maximale Umwandlungseffizienz zeigt (You et al., 2018). Dies steht jedoch im Gegensatz zu einer *in vivo* Studie in *S. marcescens*, in der eine für diese durch die Ligase PigC katalysierte Reaktion optimale Temperatur von 27 °C beschrieben wird (Williams et al., 1965). Auch wenn sich die von Medina-Castro bei der Kultivierung verwendeten 28 °C nicht drastisch von den hier als beste Temperatur definierten 25 °C unterscheiden, könnte dies also einen abschwächenden Einfluss auf die Norprodigiosinproduktion gehabt haben. Bei diesem Vergleich muss jedoch immer berücksichtigt werden, dass die hier erhobenen Daten sich auf einen heterologen Produktionswirt mit unbekanntem genomischen Integrationsort beziehen. Die beschriebene Diskrepanz verschiedener Studien zur optimalen Temperatur zeigt jedoch, wie stark sich die Ergebnisse von Untersuchungen des gleichen Enzyms *in vitro* und *in vivo* unterscheiden können und, dass das Milieu, in dem ein Enzym arbeitet, einen entscheidenden Einfluss haben kann. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen *in vivo* und *in vitro* Studien könnten als Folge der verschiedenen Bedingungen möglicherweise auch damit erklärt werden, dass die maximale Geschwindigkeit, mit der die Vorläufermoleküle von PigC umgesetzt werden, *in vivo* möglicherweise nicht durch die maximale Umsatzgeschwindigkeit von PigC definiert werden, sondern durch das Vorläuferangebot.

Diese These würde die Ergebnisse beider Untersuchungen erklären, da sich You *et al.* 2018 ausschließlich auf die Charakterisierung von PigC fokussierten und beide Vorläufermoleküle im Überschuss zugaben, während Williams *et al.* 1965 die optimale Temperatur zum Umsatz von MBC und MAP *in vivo* untersuchten, wobei MBC vom *S. marcescens* selbst produziert wurde und daher limitierend sein kann.

Durch die Situation, dass in dieser Arbeit kein MBC, sondern ausschließlich HBC als Dipyrrol gebildet werden konnte, kann jedoch auch die Substratspezifität von PigC bei der Umsatzgeschwindigkeit eine entscheidende Rolle spielen. Von Chawrai *et al.* 2008 konnte dahingehend gezeigt werden, dass PigC eine ausgeprägte Promiskuität bezüglich MBC-Analoga zeigt, jedoch auch, dass die Umsatzgeschwindigkeit von MAP mit diesen Analoga je nach Substanz deutlich abnimmt (Chawrai *et al.*, 2008). HBC, welches bei der Biosynthese von Norprodigiosin als MBC-Analoga durch PigC umgesetzt wird (Williamson *et al.*, 2005), könnte also dementsprechend auch zu einer allgemein geringeren Norprodigiosinproduktion aufgrund einer geringeren Substrataffinität führen. Eine geringe Substratspezifität ist dabei nicht ungewöhnlich und wurde bereits mehrfach für verschiedene Prodigiosinbiosynthesewege beschrieben (Chawrai *et al.*, 2008; de Rond *et al.*, 2017; Feitelson *et al.*, 1985; Williamson *et al.*, 2005). Aus evolutionärer Sicht ist dies zur Erhaltung der Konkurrenzfähigkeit gegenüber Wettbewerbern im eigenen Habitat absolut essenziell. Jones *et al.* 1991 postulierten, dass zur Produktion einer ausreichenden Vielfalt an biologisch aktiven Substanzen, für den Organismus eine Notwendigkeit besteht, eine hohe Diversität von Sekundärmetaboliten zu produzieren und zu erhalten. Diese scheinbar verschwenderische Strategie ist notwendig, da nur eine hohe Diversität eine angemessene Wahrscheinlichkeit bietet, aktive Verbindungen zu produzieren. Die Synthese inaktiver Verbindungen wird zudem häufig beibehalten, weil sie die Wahrscheinlichkeit erhöhen, neue aktive Verbindungen zu produzieren bzw. bei einer Anpassung der Konkurrenten an bereits wirksame Substanzen und veränderte Konstellationen noch wirksam zu werden (Jones & Firn, 1991).

Interessanterweise wurde neben dem Einfluss diverser äußerer Faktoren wie Sauerstoffkonzentration und Temperatur auch die Nährstoffversorgung bereits von Williamson *et al.* 2006 als relevant für die Prodigiosinbildung beschrieben. Dabei ist die Expression der Gene des Prodigiosinbiosynthesewegs im nativen Produzenten *S. marcescens* sehr stark reguliert. Diese Regulation erfolgt u.a. durch Stickstofflimitation, *quorum sensing* und andere Regulatoren auf transkriptioneller Ebene (Williamson *et al.*, 2006). Der Zusammenhang mit dieser essenziellen Ressource könnte daher für eine Rolle von Prodigiosin als Abwehrmechanismus gegen Konkurrenten im Kampf um Ressourcen sprechen, was durch die antibiotische Wirkung der Substanz umso wahrscheinlicher erscheint. Hier kann vermutet werden, dass eine solche direkte Regulation des Genclusters in heterologen Wirten nicht oder deutlich weniger zum Tragen kommt, da ausschließlich regulatorische Elemente, die direkt auf die mit dem artifiziellen Gencluster ins Genom integrierten Gene zurückzuführen sind, eine Rolle spielen können.

Da jedoch bei dem in dieser Arbeit verwendeten artifiziellen Norprodigosin-Gencluster keine als Regulatoren des Prodigiosinbiosynthesewegs bekannten Gene übertragen wurden, kann hier vor allem von einer durch den genomischen Integrationslocus definierten Expressionsleitung ausgegangen werden. Aufgrund dieser Tatsachen und der hohen Toleranz von *P. putida* gegenüber verschiedenen Xenobiotika (Loeschcke & Thies, 2015) könnte dies eine Erklärung für die gegenüber der *S. marcescens* Mutante höhere Produktionsleistung sein.

Bei der Produktion in *P. putida* könnte dabei durch eine erhöhte Sauerstofftransferrate (OTR) in Kolben mit Schikanen das gebildete Produkt, welches als anfällig für oxidative Degradation und/oder Polymerisierung beschrieben wird (Hearn et al., 1964; Medina-Castro, 1969), durch eben diese Mechanismen zerstört worden sein. Ebenso würde eine Degradation des Produkts bei zu hohem Sauerstoffeintrag eine Erklärung für die, im Vergleich mit den in Erlenmeyerkolben ohne Schikane kultivierten Kulturen, geringeren Ausbeuten in Flowerplates bieten (Abbildung 3-6). Diese zur Mikrokultivierung entwickelten Kultivierungsgefäße bieten je nach Füllhöhe einen sehr hohen Sauerstoffeintrag, welcher das Wachstum der Kulturen begünstigen soll. Bei der hier angelegten Schüttelfrequenz von 1400 upm und einem Kulturvolumen von 1 ml bedeutet das eine OTR von über 85 mM/h (www.m2p-labs.com), welche deutlich über der in einer Studie für Erlenmeyerkolben ohne Schikanen und bei 10 % Befüllung beschriebenen (~20 mM/h) (Running & Bansal, 2016) liegt. Die OTR sollte in den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen aufgrund der mit 130 UpM niedrigeren Schüttelfrequenz sogar noch darunter liegen.

Abschließend ist festzustellen, dass die optimale Temperatur zum Umsatz eines nicht nativen Vorläufermoleküls, insbesondere in einem heterologen Expressionswirt und im Kontext eines komplexen, vielschrittigen Biosynthesewegs generell nicht trivial zu definieren ist und experimentell evaluiert werden muss. Die in dieser Arbeit gezeigten Tests deuten auf eine optimale Temperatur um 25 °C hin. Zukünftige Untersuchungen könnten diesen Aspekt weiter optimieren.

Zudem scheint im gezeigten *Setup* der Expression eines artifiziellen Genclusters zur Norprodigosinproduktion, eine gezielte Anpassung der Ligase PigC hinsichtlich der Akzeptanz des Dipyrrols HBC zur weiteren Verbesserung der Norprodigosinausbeuten interessant zu sein, ähnlich wie dies bereits für Monopyrrole durchgeführt wurde (Brands et al., 2021a, 2021b). Dies könnte zukünftig die Möglichkeit bieten, durch Kombination mit weiteren Anpassungen wie z.B. einer gezielten Integration des Norprodigosin-Genclusters in einem hinsichtlich der Transkription sehr aktiven Locus, die Norprodigosinproduktion so weit zu steigern, bis sie auch die Xenobiotikatoleranz von *P. putida* übersteigt und toxisch wird oder die Metabolite des Primärmetabolismus die Biosynthese begrenzen.

Produktion von Norprodigiosin mit Hilfe eines artifiziellen Genclusters:

Es konnte gezeigt werden, dass sich *Pseudomonas putida* als heterologer Wirt für die rekombinante Biosynthese verschiedener Prodiginine, nämlich Cycloprodigiosin und Norprodigiosin, eignet. Für beide Verbindungen wurde erstmalig eine heterologe Produktion etabliert. Die Cycloprodigiosinbildung verdeutlichte, dass Stämme mit integriertem TREX-Transposon robuste Plattformen für die weitere Umsetzung der Produkte eines zuvor erzeugten Produktionsstammes bilden (Kapitel 3.1.1). Zudem konnte gezeigt werden, dass durch die gezielte Kombination bekannter Gene, ein artifizielles Gencluster zur Biosynthese von Norprodigiosin erzeugt werden konnte, welches in *P. putida* die heterologe Produktion dieses Tripyrrols ermöglichte (Kapitel 3.1.2). Zwar sind in beiden Fällen die Ausbeuten der produzierten Produkte noch optimierbar, dennoch bieten die gezeigten Ergebnisse wertvolle Ansatzpunkte zur weiteren Verbesserung.

3.2 Prodigininmutasynthese

3.2.1 Erzeugung artifizieller Vorstufenproduzenten zur Mutasynthese von Prodigininen

Neben der Möglichkeit Sekundärmetabolite durch weitere Umwandlung zu verändern (Kapitel 3.1.1) oder mit Hilfe artifizieller Gencluster zu produzieren (Kapitel 3.1.2) und so den Zugang zu schwer zu erzeugenden natürlichen Substanzen zu ermöglichen, ist auch die Mutasynthese ein vielversprechender Ansatz, welcher weitere Vorteile bei der Erzeugung halbsynthetischer Substanzen bringen kann (Kapitel 1.2.1.4). Mit dieser Methode können auch Vorstufenmoleküle von Substanzen in einem Organismus produziert und mit einem geeigneten zugegebenen Molekül *in vivo* kombiniert werden. So können dabei diverse neue Substanzen produziert werden, welche bisher nicht natürlich vorkommen oder zugänglich sind und möglicherweise vielversprechende biologische Eigenschaften besitzen. Da die chemische Synthese von MBC sehr aufwendig ist, bietet sich zu dessen Gewinnung die Biosynthese an. Das Monopyrrol ist dagegen in verschiedenen Varianten chemisch relativ leicht zu gewinnen. Zudem weist die Ligase PigC eine gewisse Substrattoleranz auf (Brands et al., 2021a; Chawrai et al., 2008), weshalb darauf aufbauend eine Mutasynthesestrategie entwickelt wurde. Diese beruhte auf der Zugabe von Monopyrrolbausteinen zu einem bakteriellen Produktionsstamm, der MBC bildet und die Ligase exprimiert, welche wiederum beide Bausteine zusammenfügt. Durch den Austausch des Monopyrrols konnten so bereits verschiedene neue Prodigininderivate produziert werden. Der bislang genutzte MBC-produzierende Stamm entstand durch einen *knockout* im *pig*-Gencluster eines ursprünglichen Prodigiosinproduzenten (Klein et al., 2017). Um die Mutasyntheseeffizienz zu steigern wurde die Strategie gewählt, ein artifizielles Gencluster zur MBC-Biosynthese ins *P. putida* KT2440 Genom zu integrieren. So sollten ein MBC-Produktionsstamm erzeugt werden, welcher ohne unnötigen metabolischen Aufwand, größere Mengen MBC produzieren und zur Mutasynthese bereitstellen kann.

Dazu wurde das γ TREX-Plasmid gewählt, mit dem eine randomisierte Transposon Tn5-basierte, chromosomale Integration in den Wirt erfolgen kann. Das Gen, welches die Ligase PigC kodiert, sollte anders als bei dem bisher genutzten Deletionsstamm nicht kointegriert werden, um es einfacher auf einem Plamid einbringen und austauschen zu können. Dabei kann die Ligase zur Erweiterung des möglichen Produktspektrums dienen, da sie eine entscheidende Limitante für das Substratspektrum darstellt. Da MBC jedoch eine Substanz mit weniger auffälligen optischen Eigenschaften als Prodigiosin ist, konnte die Produktionsleistung nicht wie bei Prodigiosin oder Norprodigiosin produzierenden Stämmen anhand der Färbung der erhaltenen Klone beurteilt und selbst in gering konzentrierten Extrakten optisch identifiziert werden. Um dennoch ein visuelles sowie biochemisch detektierbares Signal zu erzeugen, wurde hier mit einem biologischen Reporter gearbeitet, dessen Gen dem artifiziellem Gencluster am 3'-Ende angefügt wurde, um die Transkriptionsleistung anzuzeigen.

Um die gewünschte Korrelation zu ermöglichen, wurde das Reporter-gen ohne Promotor an das Gencluster angefügt, sodass es nur gemeinsam mit diesem transkribiert werden kann. Durch das Signal, welches der Reporter liefert, sollten so Rückschlüsse auf die Stärke der Transkription des integrierten Genclusters ermöglicht werden. Der Einsatz eines solchen Reportersystems wurde zunächst mit einer etablierten Biosynthese als Modell validiert.

3.2.1.1 Validierung des reporterbasierten Screenings mit dem yTREX-System

Zur Validierung eines Reportersystems, das nach randomisierter Genomintegration eine Genclusterexpression anzeigen soll, wurde ein artifizielles Gencluster zur Biosynthese von Phenazin-1-Carboxylsäure (PCA), einem Intermediat des Phenazinsynthesewegs aus *P. aeruginosa* (PAO1) herangezogen. Dieses artifizielle Gencluster wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits in den yTREX-Vektor integriert (Domröse et al. 2017) und zur visuellen Nachverfolgbarkeit der Transkription am 3'-Ende mit einem Reporter-gen versehen, da PCA ebenso wie MBC, kein visuell detektierbares Signal liefert. Durch den im Kontext der yTREX-Anwendung erstmals eingesetzten Transkriptionsreporter musste die aufwendige Extraktion, Konzentration und HPLC-Analyse zur Quantifizierung nur für die vorselektierte und dadurch deutlich reduzierte Anzahl Klone durchgeführt werden. Als Reporter wurde dabei das Enzym β -Galactosidase verwendet, dessen Aktivität in Klonen auf Agar-Platten anhand der Umsetzung von 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) angezeigt werden kann (Kapitel 2.7.1). Der entstehende Farbstoff führt zu auffällig blauen Kolonien auf den Agarplatten (Kessler et al., 1992; Kodaka et al., 1995), wobei die Intensität der Blaufärbung grundsätzlich abhängig vom Expressionslevel ist (Wood, 1995). So konnte bereits anhand einer Stichprobe gezeigt werden, dass die reporterbasierte „blau/weiß-Selektion“ auf Agarplatten eine Unterscheidung von exprimierenden und nicht-exprimierenden Stämmen ermöglicht (Domröse et al., 2017). Allerdings lag noch keine Untersuchung vor inwieweit die Reporteraktivität mit der Produktbildung quantitativ korreliert, sodass im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitere Stämme zur Charakterisierung hergestellt wurden.

Zur Erzeugung neuer PCA-Produktionsstämme wurde hier das Plasmid yTREX-PCA-lacZ (R. Weihmann, 2016) verwendet, mit dem das artifizielle Phenazin-Gencluster *phzA1B1C1D1E1F1G1-lacZ* zur PCA-Produktion an einem zufälligen Locus ins Wirtsgenom von *P. putida* KT2440 integriert werden konnte. Nach dem Ausbringen der Transkonjuganten auf mit X-Gal versetzten Agarplatten zeigten die Klone eine blaue Färbung (Abbildung 3-9).

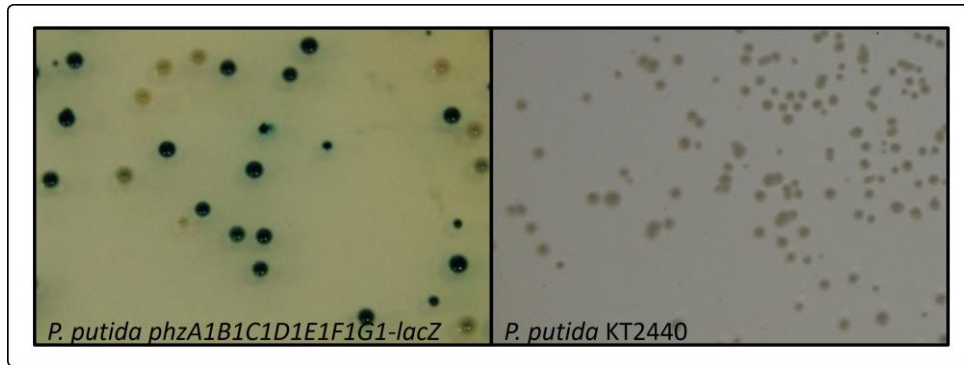


Abbildung 3-9: Blau/weiß-Screening Platte von *P. putida* PCA-lacZ im Vergleich mit wildtypischen Kolonien

Aufgrund der Tn5-vermittelten Integration des Transposons an einem zufälligen Locus im Genom kann abhängig von der Aktivität der dort lokalisierten, intrinsischen Promotoren eine unterschiedlich starke β -Galactosidase Expression auftreten, was in einer unterschiedlichen Intensität der X-Gal vermittelten Blaufärbung resultieren kann.

Am Beispiel einer Auswahl dieser Stämme sollte anschließend die Funktionalität und Verlässlichkeit des Reportersystems analysiert werden. Dabei sollte einerseits das visuelle Signal validiert und insbesondere die Korrelation zwischen Reportersignalintensität und PCA-Produktionsleistung der Stämme betrachtet werden. Hierzu wurden sechs verschiedene Klone als Stichprobe ausgewählt, die nach ihrer Erzeugung auf X-Gal-haltigen Agarplatten differenzierbare Blaufärbungen zeigten und mit *P. putida* PCA1, PCA2, PCA7, PCA8, PCA10 und PCA20 benannt wurden.

Eine vergleichbare Beurteilung der *lacZ*-Expressionsstärke anhand der Intensität der Blaufärbung von Klonen auf Agarplatten ist jedoch generell schwierig, da sie individuell vom Experimentator sowie verschiedener anderer Faktoren wie z.B. der Dicke des Agars sowie der Inkubationszeit der Bakterien auf den Agarplatten abhängt. Zudem kann sie von verschiedenen Faktoren wie anderer, zusätzlich produzierter Substanzen (wie etwa PCA) beeinflusst werden, weshalb ein weiterer robuster biochemischer Test notwendig war, um das Ergebnis der Vorselektion zu stützen.

Aus diesem Grund sollte die β -Galactosidaseexpression der verschiedenen Klone quantitativ gemessen werden, um im nächsten Schritt eine etwaige Korrelation mit der Produktbildung prüfen zu können. So sollte es möglich sein, beispielsweise den Stamm mit der potenziell stärksten Expression der Gene des gesamten Genclusters, der möglicherweise auch am meisten Produkt bildet, zu identifizieren. Dazu wurde der weit verbreitete ONPG-Test verwendet, bei dem die β -Galactosidaseaktivität anhand des Umsatzes von o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) pro Zeiteinheit gemessen wird, wodurch wiederum die Menge des exprimierten Enzyms im Zelllysat berechnet und in *Miller Units* ausgedrückt werden kann (Kapitel 2.7.2). Für eine valide Quantifizierung muss das Substrat ONPG über die Dauer der Inkubation im Überschuss im Ansatz vorhanden sein. Wäre dies nicht der Fall, müsste die Inkubationszeit oder die enzymhaltige LySATmenge verringert werden. Aus diesem Grund wurde eine LySATmenge von 10 μ l Flüssigkultur gewählt, über unterschiedliche Inkubationszeiten ein korrelierendes Produktsignal verifiziert und eine Dauer von 2 min festgelegt (Kapitel 2.7.2).

Nach der Validierung der Methode erfolgte eine Quantifizierung der β -Galactosidaseaktivität sowie der PCA-Produktion der Stämme *P. putida* PCA1, PCA2, PCA7, PCA8, PCA10 und PCA20. Die zur Quantifizierung der β -Galactosidaseaktivität der einzelnen Stämme notwendigen Kulturen wurden jeweils in 1 ml TB-Medium, über 24 h, bei 30 °C kultiviert. Dazu wurde die OD der Kulturen bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt und 10 μ l der Kulturen zur Durchführung eines ONPG-Tests verwendet. Aus den Messergebnissen konnten so die Miller Units bestimmt werden (Kapitel 2.7.2). Im Fall des Wildtyps *P. putida* KT2440 ist festzustellen, dass dieser ein Hintergrundsignal von etwa 2200 Miller Units zeigt, welches vermutlich durch den natürlichen Zerfall des Substrats hervorgerufen wird. Die anderen Stämme dagegen zeigten deutlich höhere Signale zwischen ca. 10400 und 54200 Miller Units. Zur Bestimmung der PCA-Titer wurden weitere 750 μ l der Kulturen entnommen, die Zellen sedimentiert, und das produzierte PCA in einer 2-Phasen-Extraktion aus dem Kulturüberstand isoliert (Kapitel 2.8.1.3). Anhand einer HPLC-PDA-Analyse und mit Hilfe einer Kalibrierreihe mit kommerziell erhältlichem PCA konnten die PCA-Titer der Kulturen errechnet werden. Die Stämme wurden anhand ihrer gemessenen β -Galactosidaseaktivität in aufsteigender Reihenfolge zusammen mit ihren ermittelten PCA-Titern (mg/l) in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 3-10, A).

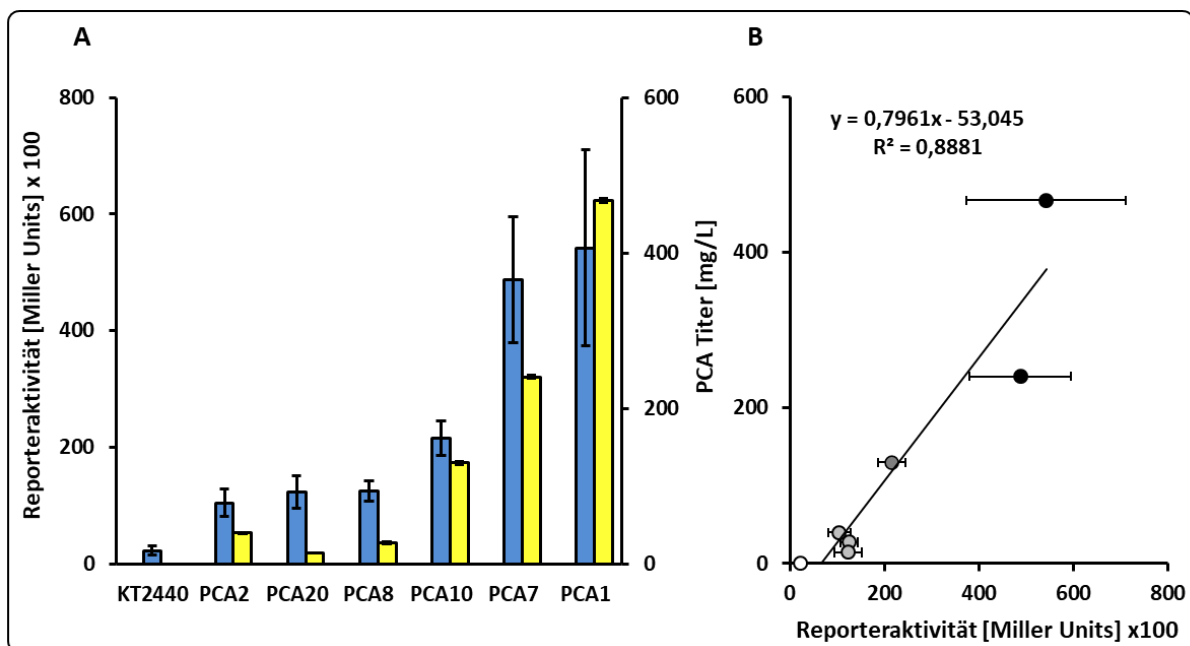


Abbildung 3-10: Korrelation zwischen produziertem PCA und der β -Galactosidaseaktivität in rekombinanten *P. putida*-Stämmen

(A) Blaue Balken repräsentieren die gemessene β -Galactosidaseaktivität (linke Y-Achse, Miller Units), während die gelben Balken die Menge des produzierten PCA angeben (rechte Y-Achse, mg/l). (B) Die Titer der einzelnen Stämme (Y-Achse, mg/l) sind gegen die im jeweiligen Stamm gemessenen β -Galactosidaseaktivitäten (X-Achse, Miller Units) aufgetragen um die PCA Produktion der jeweiligen Stämme anhand ihrer β -Galactosidaseaktivität in Gruppen von wenig (hellgrau), mittel (grau) und viel (schwarz) produzierende Stämme einteilen zu können. Alle Werte wurden in biologischer Mehrfachbestimmung ($n > 3$) nach 24 h Kultivierung bestimmt. Die jeweiligen Standardabweichungen sind durch schwarze Fehlerbalken dargestellt. Die Abbildung wurde adaptiert nach Weihmann et al., 2020 welches unter der *Creative Commons Attribution Non-Commercial License* veröffentlicht wurde <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Es zeigte sich, dass die Stämme PCA2, PCA20 und PCA8, korrelierend mit der vergleichsweise geringen β -Galactosidaseaktivität, geringe PCA-Mengen produzierten (14-39 mg/l). Der Stamm PCA10, der eine im Vergleich mittlere β -Galactosidaseaktivität zeigte, produzierte passend dazu mit 129 mg/l auch eine moderate Menge PCA. Die beiden Stämme PCA7 und PCA1, welche die höchste β -Galactosidaseaktivität zeigten, produzierten mit 241-467 mg/l auch die größte Menge PCA. Die Werte der β -Galactosidaseaktivität wurden daher in einem Diagramm mit den produzierten PCA-Konzentrationen der jeweiligen Stämme gegeneinander aufgetragen und eine Ausgleichsgerade eingefügt (Abbildung 3-10 B), um die Korrelation zu beschreiben. Einige Werte, insbesondere die der Stämme PCA7 und PCA1, weichen deutlicher von der Ausgleichsgerade ab, welche aber dennoch mit einem Bestimmtheitsmaß von 89 % einen gewissen linearen Zusammenhang beider Werte zeigt. Eine „Deckelung“ der Miller Units bei höheren Werten durch das Test-Setup kann aufgrund der vorherigen Kalibrierung und Validierung des Tests ausgeschlossen werden (Kapitel 2.7.2), sodass der ungleiche Anstieg hier andere Ursachen haben muss.

Da sich aufgrund der Integration durch die Tn5-Transposase alle Stämme in ihrem genomischen Insertionsort unterscheiden, werden die Gene *phzA1B1C1D1E1F1G1-lacZ* möglicherweise von verschiedenen Promotoren unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen transkribiert. Aus diesem Grund sind verschiedene Dynamiken im Abbau von den 3'-Enden des Transkripts denkbar, welche unterschiedliche Halbwertszeiten der Transkripte bedingen können (Belasco, 2010; Deutscher, 2015). Zudem war eine strikt lineare Korrelation der Reporter- und Metabolitproduktion generell nicht zu erwarten, da der Ablauf der Phenazinbiosynthese sehr viel komplexer ist als die Expression der als relativ robust geltenden β -Galactosidase. Die Produktbiosynthese kann dabei von diversen Faktoren, wie dem allgemeinen Stoffwechsel, der Aktivität der Proteinbiosynthese sowie Stoffzuflüssen, Diffusion in der Zelle usw. beeinflusst werden (Song et al., 2016). Um die Stabilität von Enzymen bzw. der entsprechenden mRNA, möglicherweise auch innerhalb eines Biosynthesewegs zu verbessern, kann eine Anpassung der 3'UTRs hilfreich sein (Song et al., 2016). Eine Reduktion von Endonukleaseschnittstellen innerhalb dieser Sequenz könnte dabei möglicherweise den Abbau der Transkripte verlangsamen. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass die Transkriptstabilität auch von einer Kombination aus lokalen und operonweiten Stabilitätsfaktoren bestimmt wird (Selinger et al., 2003). Dies könnte im Kontext der heterologen Expression wiederum bedeuten, dass auch die Transkriptstabilität der heterologen Gene durch den genomischen Locus beeinflusst sein könnte, in den sie integriert wurden. Somit kann zwar aufgrund der wenigen Datenpunkte keine allgemeingültige Aussage zur Korrelation zwischen einer gemessenen β -Galactosidaseaktivität und einer zu erwartenden Metabolitproduktion getätigt werden. Dennoch zeigen die Daten einen Trend, der zur groben Klassifizierung von Metabolitproduzenten, die durch Tn5-Transposition des benötigten Genclusters erzeugt wurden, in schwache, mittlere und starke Produzenten, genutzt werden kann.

3.2.1.2 Erzeugung neuer *P. putida* Stämme zur Prodigininderivatisierung

Die Nutzung von *lacZ* als Reportergen, das nach randomisierter Genomintegration eine Genclusterexpression und gegebenenfalls eine einhergehende Metabolitproduktion qualitativ und quantitativ anzeigen soll, konnte erfolgreich validiert werden (Kapitel 3.2.1.1). Daher wurden nach demselben Prinzip verschiedene artifizielle *pig*-Gencluster geplant und kloniert. Mit den Plasmiden konnten verschiedene Stämme erzeugt werden, indem die entsprechenden Gene, beispielsweise zur HBC- oder MBC-Synthese, chromosomal integriert wurden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die Analyse und den Einsatz von MBC-Produzenten zur Mutasynthese gelegt. Wie in Kapitel 1.2.1.4 erläutert, bietet die Mutasynthese eine vielversprechende Möglichkeit zur Produktion neuartiger Prodiginine mit möglicherweise vielversprechenden, pharmazeutisch relevanten Eigenschaften. Für solche Versuche wurde bisher der Stamm *P. putida pig-r2 ΔpigD* (Klein et al., 2017) verwendet, in dem im vollständigen *pig*-Gencluster das Gen *pigD* ausgeschaltet wurde, um den ersten Schritt der MAP-Biosynthese zu verhindern und so einen MBC-Produzenten zu erzeugen (Abbildung 3-11, A). Um die Ausbeuten der Mutasynthese weiter zu verbessern, wurde hier ein artifizielles Gencluster entworfen, welches ausschließlich Gene enthielt, die zur MBC-Produktion zwingend erforderlich sind. Durch die verringerte Anzahl der Gene, welche im Vergleich zum Stamm *P. putida pig-r2 ΔpigD* in das Genom des Wirtsorganismus integriert wurden (Abbildung 3-11, B), sollte eine deutliche Reduktion der Stoffwechselbelastung des Produktionswirtes und eine erhöhte MBC-Produktionsleistung erreicht werden.

Es ist bekannt, dass die Produktion von Proteinen, insbesondere im Fall einer Überexpression, einen maßgeblichen Anteil am Energieverbrauch der Zellen hat (Russell & Cook, 1995; Wu et al., 2016). Da hier durch die Expression des klonierten artifizielles MBC-Genclusters nun drei Enzyme weniger exprimiert werden als im Stamm *P. putida pig-r2 ΔpigD*, sollte der Stamm deutlich weniger Energie unnötig verbrauchen. Zudem wurde im Stamm *P. putida pig-r2 ΔpigD* der *pigD knockout* durch die Integration eines Streptomycin-Resistenzgens herbeigeführt. Dieses Antibiotikum bindet an die 30S-Untereinheit der prokaryotischen 70S-Ribosomen und deformiert deren Struktur. Damit hemmt es die Bildung des Initiationskomplexes und somit die Proteinbiosynthese (Springer et al., 2001). Der Resistenzmechanismus, welcher die dauerhafte Expression einer Aminoglycosid-(3'')(9)-Adenylyltransferase erfordert, führt zu einem zusätzlich erhöhten Energieverbrauch. Bei erfolgreicher Erzeugung der neuen MBC-Produktionsstämme sollte dementsprechend der bisher bei der Mutasynthese eingesetzte MBC-Produktionsstamm *P. putida pig-r2 ΔpigD* durch einen effizienteren Stamm ersetzt werden, welcher weder zusätzliche Resistenzgene noch im Zuge des unterbrochenen MAP-Biosynthesewegs unnötige Gene exprimiert.

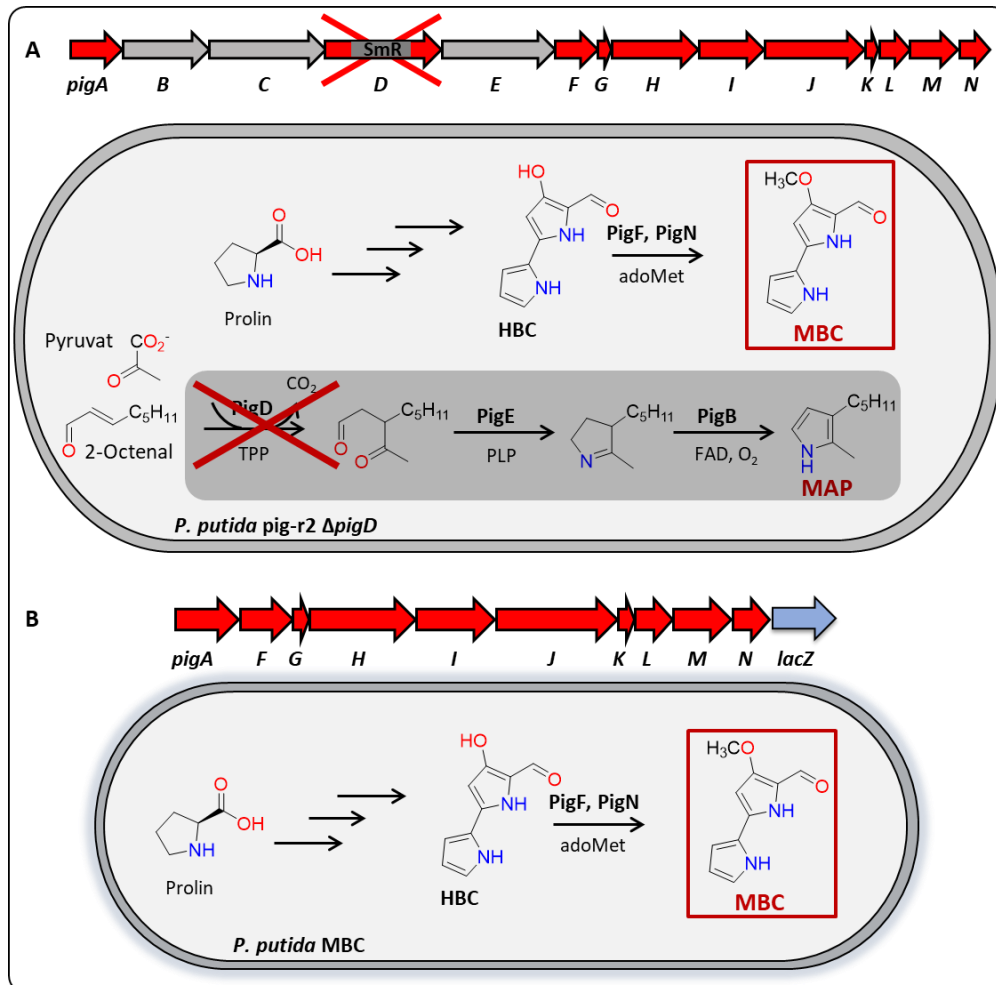


Abbildung 3-11: Vergleich verschiedener konzipierter MBC-bildender Mutasynthesestämme

(A) Der bisher zur MBC-Produktion genutzte Stamm *P. putida pig-r2 ΔpigD* und (B) ein durch ein artifizielles Gencluster zur MBC-Produktion entworfener Stamm *P. putida MBC*. Über beiden Stämmen sind jeweils die Gene des *pig*-Genclusters aus *S. marcescens* gezeigt, welche in den Stamm eingebracht wurden. Im Fall des Stammes *P. putida pig-r2 ΔpigD* sind dies alle Gene des nativen *pig*-Genclusters, wobei das Gen *pigD* durch die Integration eines Streptomycin-Resistenzgens (*Sm^R*) zerstört wurde, um den MAP-Biosyntheseweg zu unterbrechen und so einen MBC-Produzenten zu erzeugen. Dabei werden die Gene *pigB*, *pigC* und *pigE* weiterhin exprimiert, ohne jedoch eine Funktion erfüllen zu können. Zusätzlich wird das Streptomycin-Resistenzgen dauerhaft exprimiert. Im Stamm *P. putida MBC* werden die Gene *pigB*, *pigC* und *pigE* dagegen bei der Klonierung des artifiziiellen Genclusters ausgeschlossen.

Wie bereits bei der Klonierung des artifiziiellen Genclusters zur Norprodigiosinproduktion (Kapitel 3.1.2.1) wurde das *S. marcescens pig*-Gencluster auch als *Template* zur Amplifikation der Gene für die MBC-Synthese verwendet. Im nativen Prodigosinbiosyntheseweg wird die Biosynthese des Dipyrrols MBC durch die von den Genen *pigAFGHIJKLMN* kodierten Enzyme katalysiert (Williamson et al., 2005). In den speziell zur MBC-Produktion entworfenen Stämmen sollten dementsprechend ausschließlich diese Gene integriert sein. Dazu wurde ein artifizielles Gencluster, bestehend aus den genannten Genen designt, welches anschließend durch die Anwendung des γ TREX-Systems in das Wirtsgenom integriert werden sollte. Die geplanten Genfragmente wurden anschließend *via* PCRs amplifiziert (Kapitel 2.6.2.6). Dabei wurde der Vektor pUC19-*pig* als *Template* verwendet und das Gencluster in drei Teile aufgeteilt, welche die Gene *pigA* (Primer AD142+171, 1239 Bp), *pigF-I* (Primer AD172+162, 4867 Bp) *pigJ-N* (Primer AD163+164, 5033 Bp) umfassten (Tabelle 2-9).

Zudem wurde das Gen *lacZ* auf Basis des Vektors pRcExpII2-YF1-FixJ-PFixK2-LacZ ohne seine Promotorregion amplifiziert (Primer AD124+125, 3127 Bp), um als Reporter gen am 3'-Ende des Genclusters zu dienen (Kapitel 3.2.1.1). Sämtliche Gene wurden dabei inklusive der 5'-gelegenen UTR mit der jeweiligen RBS amplifiziert. Nach der Amplifikation der einzelnen Fragmente sowie der Linearisierung des γ TREX-Vektors mit der Endonuklease I-SceI, wurden diese mittels hefebasierter, homologer Rekombination zum fertigen Vektor γ TREX-MBC-lacZ rekombiniert (Kapitel 2.6.1.1). Zur Erzeugung von MBC-Produktionsstämmen wurde der Vektor γ TREX-MBC-lacZ anschließend durch Konjugation in wildtypische Zellen des Stammes *P. putida* KT2440 übertragen (Kapitel 2.5.5.5). Dort wurde das artifizielle MBC-Gencluster durch Tn5-Transposition an einer zufälligen Stelle ins Genom integriert. Anschließend konnte die Anzahl der auf MBC-Produktion zu testenden Klone mittels Vorselektion anhand der Koexpression von *lacZ* und somit der β -Galactosidaseaktivität eingegrenzt werden (Kapitel 3.2.1.1).

3.2.1.3 Charakterisierung der Produktionsstärke ausgewählter MBC-Stämme

Nachdem eine Reihe von Stämmen mit artifiziell MBC-Gencluster erzeugt und 19 Stämme anhand der β -Galactosidaseaktivität ausgewählt werden konnten, erfolgte deren initiale Charakterisierung, im Rahmen der während dieser Doktorarbeit betreuten Bachelorarbeit von Schinya Ibrahim. Im Folgenden werden Teile der Ergebnisse kurz vorgestellt.

Es wurden 19 potentiell MBC-produzierende *P. putida*-Stämme vergleichend mit dem bisher zur Mutasynthese genutzten Stamm *P. putida* pig-r2 Δ pigD auf MBC-Produktion untersucht. Die Analyse der Proben erfolgte durch eine Flüssigchromatographie mit angeschlossenen Massenspektrometer (LC-MS) in Zusammenarbeit mit Birgit Henßen (IBOC, HHUD). Von Jan Gebauer (IBOC, HHUD) chemisch synthetisiertes MBC diente als Referenz und für eine Kalibrierreihe. Der Wildtyp zeigte erwartungsgemäß kein Signal, während in *P. putida* pig-r2 Δ pigD, welcher als Positivkontrolle fungierte sowie in den Proben von 15 der 19 Expressionsstämmen ein MBC-Signal nachgewiesen werden konnte. Im Stamm *P. putida* pig-r2 Δ pigD wurde anhand der Kalibrierung ein MBC-Produkttitert von ca. 183 μ g/l bestimmt. Die erstmals charakterisierten Stämme, welche das neu konstruierte artifizielle MBC-Gencluster exprimierten, wiesen dagegen sehr verschiedene Titer von ~32- 1372 μ g/l auf. Beispielhaft sind hier die Daten verschiedener Stämme gezeigt, die wenig, mittel und viel MBC produzierten und folgend auch zur weiteren Analyse und Mutasynthese in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden (Abbildung 3-12).

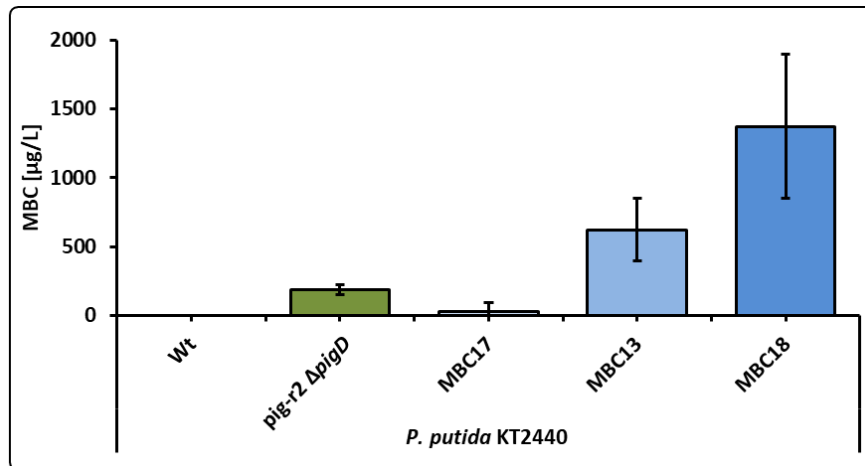


Abbildung 3-12: MBC-Produktion verschiedener *P. putida* Expressionsstämme eines artifizierten MBC-Genclusters

Abgebildet sind die MBC-Produkttitel der Stämme *P. putida pig-r2 ΔpigD*, MBC17, MBC13 und MBC18 nach 24 h Kultivierung in 1 ml TB-Medium bei 30 °C im Vergleich mit dem *P. putida* KT2440 Wildtyp. Von den Kulturen wurden jeweils die gesamten Zellen sedimentiert sowie durch eine Extraktion mit anschließender 2-Phasen-Extraktion das MBC extrahiert. Daraufhin wurden die Proben einer HPLC-MS-Analyse unterzogen und anhand der Signalfäche der gemessenen Proben mit Hilfe einer Kalibriergeraden, welche mit chemisch synthetisiertem MBC erstellt wurde, der Produkttitel [µg/l] bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte einer biologischen Mehrfachbestimmung ($n \geq 3$), mit ihren als Fehlerbalken angezeigten Standardabweichungen.

Durch die, in der Bachelorarbeit von Schinya Ibrahim (Ibrahim, 2019), nachgewiesene MBC-Produktion konnte so erneut gezeigt werden, dass mit Hilfe des γ TREX-Systems gezielt, heterologe Produktionsstämme von *P. putida* KT2440 erzeugt werden können. Gleichzeitig konnte der Screening-Ansatz auf Basis der durch intrinsische Promotoren gesteuerten Expression von *lacZ* als Transkriptionsreporter (Kapitel 3.2.1.1) wiederholt zur gezielten Identifizierung von Produktionsstämmen nach Tn5-Transposition genutzt werden. Dabei zeigten die neu erzeugten Stämme zum Teil deutlich höhere MBC-Produkttitel als der ursprünglich zur Mutasynthese genutzte Stamm *P. putida pig-r2 ΔpigD*, welcher aus einem Prodigiosinproduktionsstamm erzeugt wurde und das Prodigiosin-Gencluster nachweislich an einem günstigen genomischen Locus zur Überproduktion trägt (Domröse et al., 2015; Klein et al., 2017). Dies stützt die, eingangs aufgestellte These (Kapitel 3.2.1.2), dass eine verringerte Stoffwechselbelastung aufgrund des genutzten adaptierten Genclusters (Abbildung 3-11) zu einer erhöhten Produktionskapazität führen kann. Zwar können auch andere Faktoren, wie der genomische Integrationsort, eine Rolle bei der höheren Produktivität der neu erzeugten Stämme gespielt haben, dennoch scheint es wahrscheinlich, dass die potenziell geringere Stoffwechselbelastung aufgrund des adaptierten Genclusters zumindest einen positiven Einfluss hatte.

3.2.2 Anwendung der erzeugten MBC-Stämme zur Mutasynthese

Nach der erfolgreichen Erzeugung und initialen Charakterisierung neuer MBC-Produktionsstämme wurden die drei Stämme MBC13, 17 und 18 ausgewählt und zur Anwendung gebracht. Diese Stämme bieten dabei drei verschiedene Produktionskapazitäten. Der Stamm MBC17, welcher in einem ONPG-Test die geringste β -Galactosidaseaktivität zeigte, wies mit ca. 32 $\mu\text{g/l}$ auch den geringsten MBC-Titer auf. Der mit einer mittleren Reporteraktivität eingestufte Stamm MBC13 zeigte dagegen mit ca. 624 $\mu\text{g/l}$ einen deutlich höheren Produkttiter, welcher bereits mehr als 3-mal so hoch war wie der des bisher verwendeten Stammes *P. putida pig-r2 Δ pigD*. Den höchsten Titer zeigte mit ca. 1372 $\mu\text{g/l}$ jedoch der Stamm MBC18, welcher auch die höchste Reporteraktivität aufwies und dessen Titer mehr als 7-mal höher war als im bisher genutzten Stamm (Abbildung 1-12). Die ausgewählten Stämme wurden folgend vergleichend in der Mutasynthese eingesetzt. Da die neuen MBC-Produktionsstämme im Gegensatz zum Stamm *P. putida pig-r2 Δ pigD* ausschließlich die Gene *pigAFGHIJKLMN* ohne die Gene *pigBCDE* tragen (Abbildung 3-11), wurde die Ligase PigC plasmidbasiert in den Stämmen exprimiert, um das produzierte MBC mit dem zugeführten Monopyrrol MAP zu Prodigiosin zu kondensieren. Dazu mussten die zu testenden Stämme MBC13, 17, und 18 zuerst mit dem Plasmid pVLT33-pigC (Brands et al., 2020) durch Elektroporation transformiert werden (Kapitel 2.5.5.6). Dieser Vektor trägt das PigC-kodierende Gen unter der Kontrolle des P_{tac} -Promotors. Anschließend wurden die transformierten Stämme unter Standardbedingungen zur Mutasynthese kultiviert (Kapitel 2.5.4.3). Zusätzlich wurde zeitgleich zur Induktion, 50 mM des Monopyrrols MAP zugegeben. Als Referenz und Positivkontrolle wurde der Stamm *P. putida pig-r2 Δ pigD* in gleicher Weise kultiviert und mit MAP versetzt. Im Anschluss wurden die Kulturen weitere 20 h inkubiert, um die Kondensation von MBC und MAP zu Prodigiosin zu ermöglichen. Nach dem Ende der Kultivierung wurden die Zellen sedimentiert und die produzierten Metabolite extrahiert. Zur Detektion von Prodigiosin wurden die Ethanolextrakte abschließend in einem Plattenphotometer auf die für Prodigiosin typische Absorption bei 535 nm hin untersucht. Es konnte allerdings in keiner der Proben außer der Positivkontrolle des Stammes *P. putida pig-r2 Δ pigD* ein Signal bei dieser Wellenlänge festgestellt werden. Dies führte zu dem Schluss, dass in den neu erzeugten MBC-Produktionsstämmen eine entscheidende Komponente zur Kondensation von MBC und MAP fehlte.

Daher wurden zuerst die Gencluster der beiden Stammvarianten zur MBC-Produktion *P. putida pig-r2 Δ pigD* und *P. putida* MBC verglichen, um das Gen zu identifizieren welches die Mutasynthesefähigkeit wiederherstellen könnte. Dabei wurden die MAP-Biosynthesegene *pigB*, *pigC* und *pigE* betrachtet, die bei *P. putida* MBC nicht mehr vorhanden waren. Das entscheidende fehlende Gen musste also innerhalb dieser Gene liegen. Allerdings war nicht unmittelbar ersichtlich, welches dieser Gene für die Kondensationsreaktion essenziell war.

Aus *in vitro* und *in vivo* Studien von Kooperationspartnern am IBOC (HHUD) und am Institut für Biotechnologie der RWTH Aachen zur Synthese von Prodigiosin war bereits bekannt, dass die Ligase PigC *per se* keine weiteren Enzyme benötigt, um die Kondensation der beiden Vorstufen MBC und MAP zu katalysieren (Brands et al., 2020; Brass et al., 2019). Das Enzym ist bei alleiniger Expression also aktiv. Die neuen MBC-Produktionsstämme weisen im Unterschied zur alleinigen *pigC*-Expression jedoch alle Proteine der MBC-Biosynthese auf. Dies führte zu der Annahme, dass es unter diesen demnach Gene bzw. Proteine zu geben scheint, welche die Pyrrolkondensation verhindern. Zusätzlich konnte in Versuchen, die im Rahmen der Bachelorarbeit von Schinya Ibrahim (Ibrahim, 2019) durchgeführt wurden, beobachtet werden, dass PigC dazu fähig ist, in einem *P. putida*-Stamm, der HBC bildet und zusätzlich die Ligase PigC exprimiert, nach MAP-Zugabe, das Di- und das Monopyrrol zu Norprodigiosin zu kondensieren. Der HBC-bildende Stamm wurde ähnlich wie die MBC-Stämme hergestellt (Kapitel 3.2.1.2), beinhaltet aber nicht die Gene *pigN/F*, die zur Umsetzung von HBC zu MBC notwendig sind. Somit scheint in den MBC-Stämmen die einzige zusätzliche Komponente, nämlich PigN/F, die Kondensation zu verhindern (Abbildung 3-13). Dieser Effekt muss durch eines der Proteine der MAP-Biosynthese jedoch aufgehoben werden können, da PigC im ursprünglich zur Mutasyntese genutzten Stamm *P. putida pig-r2 ΔpigD*, in der Lage ist, eine Ligation von MAP und MBC zu katalysieren.

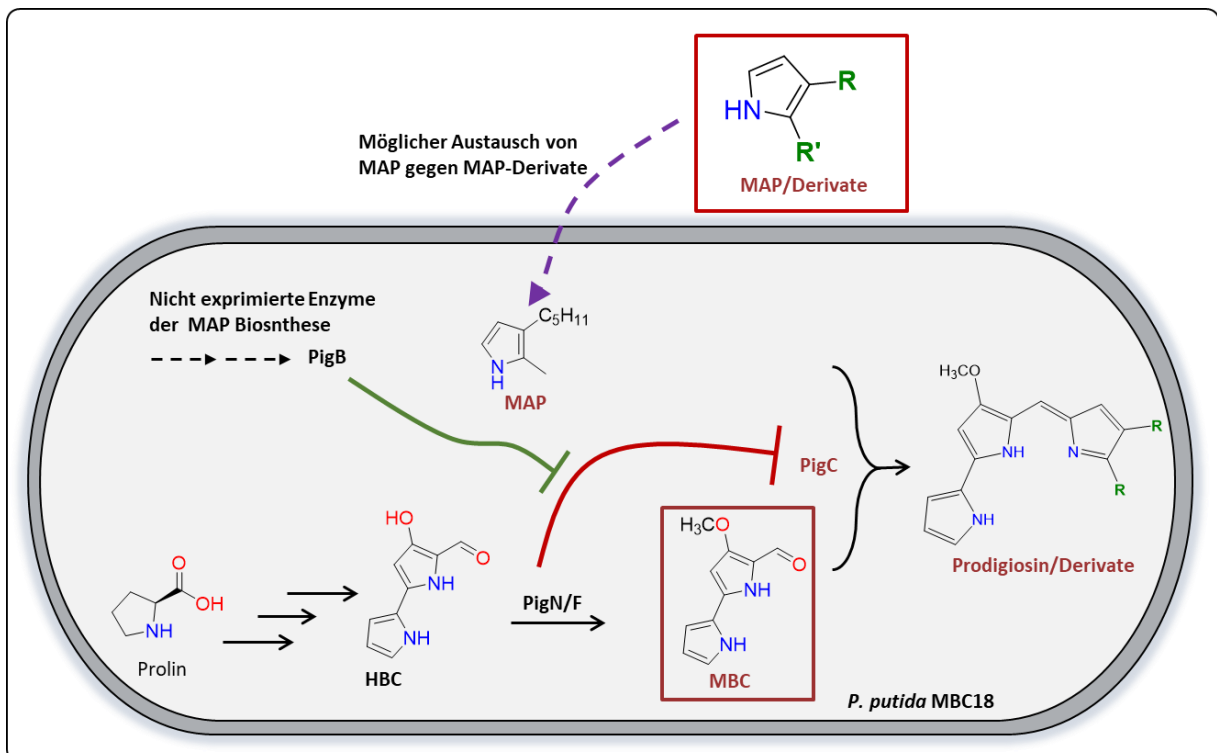


Abbildung 3-13: Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen zwischen den Proteinen PigB, PigN/F und PigC

Es kann vermutet werden, dass die alleinige Anwesenheit von PigN/F ohne die Proteine des MAP-Synthesewegs eine Kondensation von MBC mit zugeführtem MAP oder Derivaten und somit die Prodigiosinmutasyntese verhindert. PigB scheint als Interaktionspartner für PigN/F und/oder PigC notwendig, um die Kondensation beider Vorläufermoleküle zum Endprodukt zu ermöglichen.

Da PigB das letzte Enzym des MAP-Biosynthesewegs ist, wurde postuliert, dass der kritische Punkt innerhalb der Beziehung zwischen PigB, PigC und PigN/F liegen könnte. Dies legte den Schluss nahe, dass es sich möglicherweise bei PigB, dem letzten Enzym der MAP-Synthese, um das Protein handelt, dessen Fehlen die Probleme beim Einsatz der neuen MBC-Produktionsstämme verursacht (Abbildung 3-13). Unterstützt wird diese These durch, in der Literatur beschriebene, Analysen, in denen vermutet wird, dass PigB drei Transmembrandomänen besitzt, welche das Protein vermutlich in der inneren Membran verankern (Williamson et al., 2006, 2005). Dies ist deshalb interessant, da auch für PigN, welchem eine entscheidende Rolle im PigF-katalysierten Methylierungsschritt der MBC-Synthese zugesprochen wird, prognostiziert wird, dass es an der inneren Membran lokalisiert ist (Chawrai et al., 2012). Die Hypothese, dass die terminalen Schritte der MAP- wie auch der MBC-Biosynthese durch die membranständigen Enzyme PigN/F und PigB durchgeführt werden und diese die Vorstufenmoleküle dort zusammenbringen, wurde bereits formuliert (Williamson et al., 2005). Dies wäre im Kontext der antimikrobiellen Eigenschaften des Produkts sinnvoll, da so das von PigC gebildete Produkt Prodigiosin direkt über die Membran abgegeben werden kann (Feitelson et al., 1985; Feitelson & Hopwood, 1983; Williamson et al., 2006, 2005). Auch die Tatsache, dass sich PigC nach der Produktion in *E. coli*, bei der anschließenden Reinigung in der Membranfraktion befindet (Brands et al., 2020; Brass et al., 2019; Chawrai et al., 2012) und offenbar ebenfalls modellierten Vorhersagen entsprechend Transmembrandomänen besitzt, unterstützen die These (You et al., 2018). Auch das in *Janthinobacterium lividum* BR01 vorkommende Fusionsprotein der beiden Enzyme PigB und PigC, spricht dafür, dass in anderen Organismen, in denen keine kovalente Bindung vorliegt, dennoch ein Proteinkomplex vorliegen könnte und demnach PigB eine entscheidende Rolle bei der Ermöglichung der Kondensationsreaktion der beiden Vorläufermoleküle zufällt (Schloss et al., 2010). Zur Überprüfung der Hypothese, dass PigB möglicherweise essenziell zur Ermöglichung der Mutasyntese sein könnte, sollte anschließend das Gen *pigB* in Kombination mit dem Gen der Ligase PigC induziert exprimiert werden.

3.2.2.1 *pigB* als essenzieller Bestandteil der Mutasynteseplattform

In das bereits zuvor zur Expression von *pigC* verwendete Plasmid pVLT33-pigC wurde das Gen *pigB* kloniert, um eine Koexpression beider Gene bei Induktion zu erreichen. Dazu wurde *pigB* mit den Primern RW144 und RW145 vom *Template*-Vektor pUC19-pig amplifiziert (Tabelle 2-9). Parallel wurde der Vektor pVLT33-pigC mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XbaI* linearisiert. In der folgenden Ligation konnte das amplifizierte Gen *pigB* so gerichtet in den Vektor integriert werden, womit der Vektor pVLT33-pigC-pigB erzeugt wurde (Kapitel 2.6.1.3). Anschließend wurden die Stämme MBC13, 17, und 18 mit dem Plasmid pVLT33-pigC-pigB sowie zum Vergleich mit pVLT33-pigC mittels Elektroporation transformiert und unter Mutasyntesebedingungen kultiviert (Kapitel 2.5.4.3).

Parallel zur Induktion wurde das Monopyrrol MAP zugegeben und die Kultivierung für weitere 20 h fortgesetzt. Nach Abschluss der Kultivierung wurden die Zellen aus 500 µl Kulturvolumen durch Zentrifugation geerntet und durch einen Aufschluss mit angesäuertem Ethanol extrahiert. Die Absorption der Extrakte wurden im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 535 nm gemessen und zusätzlich Absorptionsspektren der Proben von 450-700 nm aufgenommen (Abbildung 3-14). Die Koexpression von *pigB* ermöglichte tatsächlich die Mutasyntese in den Stämmen mit artifiziellem MBC-Gencluster. Während im Stamm MBC17 keine Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne *pigB* Koexpression erkennbar waren, zeigte der Stamm MBC13 bei *pigB* Koexpression bereits eine deutlich stärkere Absorption bei 535 nm. Im Stamm MBC18 war dieser Effekt noch stärker zu beobachten und mehrte so die Hinweise darauf, dass die Effizienz der Mutasyntese durch eine erhöhte MBC-Produktion der Stämme weiter gesteigert werden kann (Abbildung 3-14, A). Dass die Absorption bei einer Wellenlänge von 535 nm in denselben Stämmen ohne *pigB* Koexpression in allen Fällen auf einem ähnlich niedrigen Level liegt, ist dabei jedoch nicht auf ein spezifisches Prodigiosinsignal zurückzuführen. In den gemessenen Absorptionsspektren ist lediglich das Signal des Vorläufers MAP, welcher der Kultur zugesetzt wurde und dessen Absorption bei ca. 500 nm liegt, zu detektieren (Abbildung 3-14, B). Im Vergleich der Prodigiosinproduktionstiter des bisher zur Mutasyntese eingesetzten Stammes *P. putida pig-r2 ΔpigD* mit dem neu erzeugten Stamm *P. putida* MBC18 bei gleichzeitiger *pigB* Expression zeigte sich zudem, dass die Effektivität des neuen Stammes mehr als 10-mal so hoch ist wie im bisherigen Deletionsstamm (Abbildung 3-14, C).

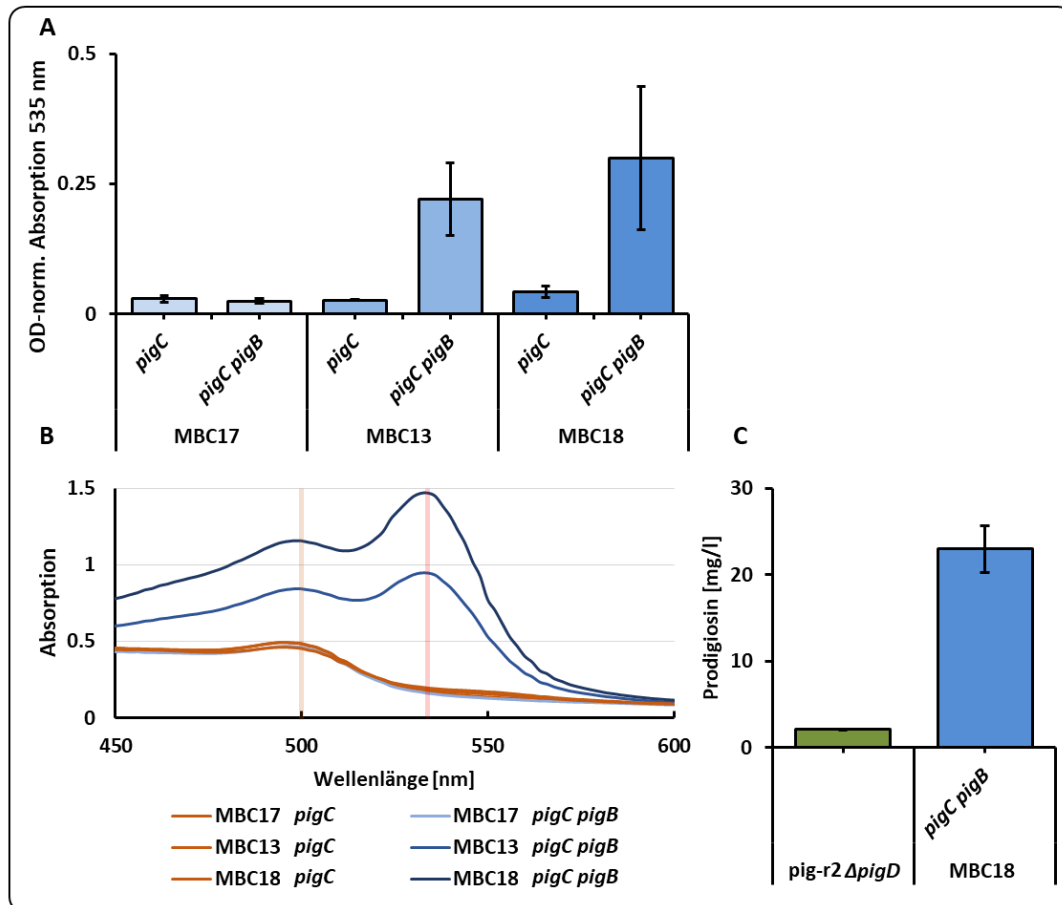


Abbildung 3-14: Mutagenesefähigkeit verschiedener *P. putida*-Expressionsstämme eines künstlichen MBC-Genclusters (A) Vergleich der Mutagenesefähigkeit nach Transformation der Stämme mit einem Plasmid, welches entweder das Gen *pigC* oder eine Kombination von *pigC* mit *pigB* trägt. Die Stämme wurden in 1 ml TB-Medium für 4 h bei 30 °C und 1200 UpM inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Induktion der plasmidbasierten Expression mit 0,5 mM IPTG und die Zugabe von 1 mM MAP. Nach weiteren 20 h Inkubation wurden die Zellen mit saurem Ethanol extrahiert und die Absorption der Proben bei 535 nm gemessen. (B) Absorptionsspektren der Extrakte der verschiedenen Stämme nach der Mutagenese mit *pigC* oder *pigC-pigB*. Die Wellenlängen der MAP bzw. Prodigiosin zuzuordnenden Absorptionsmaxima von 500 (braune Linie) bzw. 535 nm (rote Linie) sind markiert. (C) Vergleich der kalkulierten Prodigiosinproduktion durch Mutagenese des Stammes *P. putida pig-r2 ΔpigD* und des besonders potenten MBC-Produktionsstammes *P. putida* MBC18. Abgebildet sind die Mittelwerte einer biologischen Mehrfachbestimmung ($n \geq 3$), mit ihren als Fehlerbalken angezeigten Standardabweichungen.

Somit konnte mit dem Stamm MBC18, welcher basierend auf der β -Galactosidaseaktivität ausgewählt wurde, ein MBC-Produktionsstamm erzeugt werden, der über 7-mal mehr MBC produziert als der bisher genutzte Stamm. Dabei konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte MBC-Produktion bei Koexpression von *pigB* und *pigC* auch zu einer signifikant besseren Prodigiosinausbeute bei der Mutagenese führen kann. Die deutlich verbesserte MBC-Produktionsleistung könnte dabei sowohl auf die Reduktion der metabolischen Belastung als auch auf einen möglicherweise besonders vorteilhaften Integrationslocus des künstlichen MBC-Genclusters im Genom zurückzuführen sein. Aufgrund mehrfacher Sequenzierungsversuche gibt es starke Hinweise, dass der Integrationsort der *pig*-Gene im Stamm *P. putida* MBC18 in der rDNA liegt, welche sich bereits in den von Andreas Domröse erzeugten Prodigiosinproduktionsstämmen als besonders geeignet für eine Überproduktion herausgestellt hat (Domröse et al., 2019). Der Integrationsort konnte hier jedoch nicht abschließend bestätigt werden.

Es könnte aber auch die deutliche Verkürzung des rekombinanten Genclusters (Abbildung 3-11) zu dessen effektiverer Expression geführt haben. Neben der Transkriptbildung, die sich durch unterschiedliche Promotoren unterscheiden kann, spielt weiterhin die Transkriptstabilität eine entscheidende Rolle für die letztliche Expressionstärke von Proteinen. Dazu konnte gezeigt werden, dass Sequenzen, die der 3'-UTR von *pigN* angehängt werden, die mRNA-Stabilität erhöhen und die Prodigiosinbildung in *Serratia* verstärken können (Sun et al., 2021). Der Stamm *P. putida* pig-r2, der dem Deletionsstamm pig-r2 Δ *pigD* zugrunde liegt, wurde mit einem TREX-Vektor (Kapitel 1.4) erzeugt. Dagegen wurde der Stamm MBC18 mit einem γ TREX-Vektor (Kapitel 1.4.1) und *lacZ* als angefügtem Reportergen erzeugt. Dies bedingt, dass sich im rekombinanten Tn5-Transposon stromabwärts von *pigN* die kointegrierten Sequenzen deutlich unterscheiden, was wiederum die Transkriptstabilität beeinflussen kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieser Umstand jedoch nicht vertiefend untersucht. Es konnte allerdings während der im Rahmen dieser Arbeit betreuten Masterarbeit von Florian Gätgens, tatsächlich ein gegenüber pig-r2 Δ *pigD* deutlich erhöhtes *pigN*-Transkriptlevel in MBC18 nachgewiesen werden (Gätgens, 2022).

Interessant war außerdem der Unterschied in den beobachteten MBC-Leveln des neuen Stammes und den damit erreichten Prodigiosintitern im Mutasynteseansatz. Während die produzierte MBC-Menge des Stammes MBC18 etwa 7-mal höher lag als im Stamm pig-r2 Δ *pigD*, war die Konzentration des produzierten Prodigiosins etwa 10-mal so hoch. Dies deutet darauf hin, dass die MBC-Menge, welche in den Zellen akkumuliert, begrenzt ist, jedoch ein größeres Flusspotential in Richtung des Prodigiosinbiosynthesewegs besteht, wenn MBC weiter umgesetzt wird. Diese These wird zudem durch die Tatsache unterstützt, dass auch die Zugabe von Polyurethanschwämmchen zu Prodigiosin produzierenden Stämmen als Adsorbens für das Produkt deren Prodigiosinproduktion erhöhen konnte (Domröse et al., 2015). Hier wird vermutet, dass die Adsorption des Prodigiosins an die Polyurethanschwämmchen zu einer Bindung des Produkts und dadurch zu einer Reduktion des gelösten Prodigiosins im Medium führt, welche die weitere Produktion begünstigt.

Aufgrund der Erkenntnis, dass PigB tatsächlich der entscheidende Faktor zur Nutzbarkeit der neuen MBC-Produktionsstämme zu sein scheint, können nun auch die von Stefanie Brands (RWTH Aachen) durch „KnowVolution“ erzeugten PigC-Varianten im Mutasynteseansatz getestet werden. Diese sind durch den gezielten Austausch von Aminosäuren in einer finalen Variante, nach Initiation und Analyse einer Reihe zufälliger Mutageneseschritte, so verändert worden, dass sie bezogen auf die Umsetzung kurzkettiger MAP-Derivate verbessert wurden. In den *in vitro* durchgeführten Analysen zeigte die beste Variante eine bis zu 10,7-fach höhere Wechselzahl und eine bis zu 40-fach erhöhte katalytische Effizienz gegenüber der wildtypischen Ligase PigC (Brands et al., 2021a).

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Notwendigkeit der Koexpression von *pigB* in den MBC-Produktionsstämmen wurde vermutet, dass dessen Koexpression auch für die verbesserten PigC-Varianten notwendig ist. Deshalb wurde in einem ersten Schritt *pigB*, wie bereits für den Vektor pVLT33-pigC beschrieben (Kapitel 3.2.2.1), in den Vektor pVLT33-I1 integriert, der die PigC-Variante „I1“ trägt (Brands et al., 2021a). Diese wurde im Rahmen der Kooperationen des *Bioeconomy Science Center* (BioSC) Projekts CombiCom weitergegeben, um während dieser Arbeit das Mutasyntesepotential dieser PigC-Variante auch *in vivo* zu analysieren. Für die Analyse der Mutasynteseignung der PigC-Variante wurde der Stamm *P. putida* MBC18 wie bereits für das native PigC beschrieben, mit dem Plasmid pVLT33-I1 oder mit pVLT33-I1-pigB transformiert. Es erfolgte die Kultivierung unter Mutasyntesbedingungen (Kapitel 2.5.4.3) im Vergleich mit *P. putida* *pig-r2 ΔpigD* als Positivkontrolle (Abbildung 3-15). Anschließend wurde die Absorption bei 535 nm in den erstellten Extrakten miteinander verglichen, um den Umsatz von MAP und MBC in beiden Varianten vergleichend zu quantifizieren. Im Vergleich der beiden Plasmide zeigte sich, dass auch in diesem Fall eine Koexpression von *pigB* zu wesentlich besseren Ergebnissen führte (Abbildung 3-15). Ohne die Koexpression von *pigB* zeigte die Variante I1 dabei einen schlechteren Umsatz von MBC und MAP zu Prodigiosin als die native PigC-Variante im ursprünglich zur Mutasyntese genutzten Stamm *P. putida* *pig-r2 ΔpigD*, während der Umsatz bei Koexpression von *pigB* fast doppelt so hoch war. Im Unterschied zur vergleichenden Analyse des nativen PigC in Abbildung 3-14, wurden hier in LB-Medium und bei 25 °C kultiviert, da erste Versuche (nicht gezeigt) darauf hindeuteten, dass die Aktivität von I1 bei diesen Bedingungen höher war, sodass die Titer von der Referenz *P. putida* *pig-r2 ΔpigD* nicht unmittelbar vergleichbar sind.

Im Vergleich der OD-normierten Absorptionswerte bei 535 nm der Abbildung 3-14, A und Abbildung 3-15, fällt auf, dass die Variante I1 dennoch eine um den Faktor 3,9 reduzierte Mutasyntesekapazität gegenüber dem wildtypischen PigC zeigte. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als dass diese schlechteren Ergebnisse trotz der für die adaptierte PigC-Variante I1 gewählten günstigeren Temperatur von 25 °C erreicht wurden, bei der die Variante I1 *in vitro* besser abschnitt als das native PigC (Brands et al., 2021a). Dabei muss berücksichtigt werden, dass möglicherweise die MBC-Produktion des Stammes MBC18 in LB-Medium reduziert ist, was jedoch für die MBC-Produktion des Referenz-Stammes *P. putida* *pig-r2 ΔpigD* im direkten Vergleich in gleicher Weise gelten sollte. Dennoch ist die Prodigiosinproduktion des Stammes MBC18 transformiert mit dem Plasmid pVLT33-I1-pigB im Vergleich mit dem Referenzstamm *P. putida* *pig-r2 ΔpigD* nur etwa um den Faktor 2 erhöht, was darauf hindeutet, dass die neue PigC-Variante I1 *in vivo* keine verbesserten Umsätze in der Mutasyntese mit MAP als Substrat zeigt.

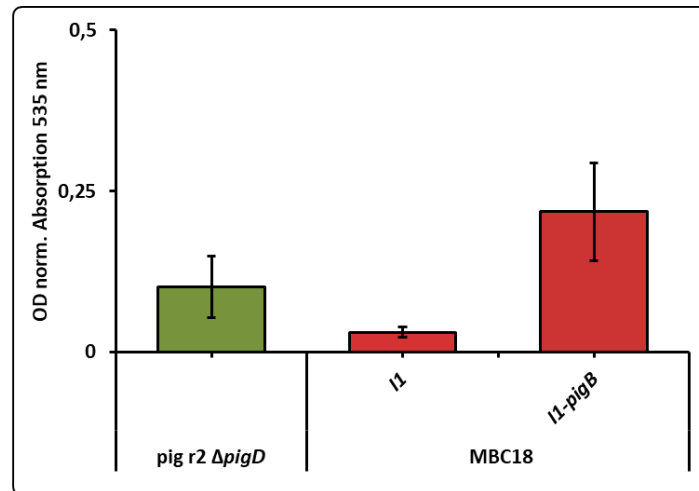


Abbildung 3-15: PigB-abhängige Prodigiosinmutasynthese mit PigC-I1 in *P. putida* MBC18

Es wurde die Prodigiosinproduktion durch Mutasynthese zwischen dem bisher verwendeten Stamm *P. putida pig-r2 ΔpigD* und dem neu erzeugten Stamm MBC18, welcher das Plasmid pVLT33-I1 bzw. I1-pigB trägt, analysiert. Die transformierten Stämme wurden in 1 ml LB-Medium in Flowerplates unter Mutasynthesebedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen extrahiert und die Absorption der Proben mit einem Tecan Plattenphotometer bei 535 nm gemessen. Um die Vergleichbarkeit mit den bisher durchgeführten Mutasyntheseversuchen in TB-Medium zu verbessern, sind die Werte OD-normiert dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte einer biologischen Mehrfachbestimmung ($n \geq 3$), mit ihren als Fehlerbalken angezeigten Standardabweichungen.

Als Ursache kann hier ein schlechteres Zusammenspiel der Enzyme PigB, PigN/F und PigC aufgrund der veränderten PigC Aminosäuresequenz und daher veränderten Struktur vermutet werden. Da die Tests der Studie von Brands et al., 2021 im Zuge der Verbesserung des Enzyms die Zugabe beider Vorläufermoleküle umfassten, wurden hier keine weiteren Protein-Protein-Wechselwirkungen berücksichtigt. Hinzu kommt, dass die Experimente grundsätzlich auf eine Verbesserung des Umsatzes von kurzkettigen Monopyrrolvorläufermolekülen ausgerichtet waren, da ein aus einem solchen Monopyrrol zusammengesetztes halbsynthetisches Prodiginin sich zuvor als vielversprechende Substanz im Test gegen eine Brustkrebszelllinie erwiesen hatte (Klein et al., 2017). Daher wurde zur Analyse der Auswirkungen der herbeigeführten Aminosäureaustausche, Dimethyl-Pyrrol verwendet (Brands et al., 2021), sodass die in der vorliegenden Arbeit angewandten Tests aufgrund der Verwendung von MAP nicht die optimale Umsatzfähigkeit der neuen PigC-Variante repräsentieren. Im Kontext der in dieser Arbeit durchgeführten Mutasyntheseexperimente bietet die *in vitro* adaptierte PigC-Variante also keinen Mehrwert im Sinne einer gesteigerten Prodigiosinausbeute. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass (I) im neu etablierten Mutasynthese-Setup grundsätzlich höhere Produkttiter erreicht werden können als mit dem vormals genutzten Stamm und dass (II) auch alternative PigC-Derivate durch den einfachen Tausch von Plasmiden eingesetzt werden können, um das Prodigininproduktspektrum zu erweitern. Weitere, verbesserte PigC-Varianten können somit nun sehr einfach in der Mutasynthese getestet werden. Übergeordnet unterstreichen die Ergebnisse, dass bei einer Verbesserung einer Komponente in einem komplexen System, auch immer die Leistung innerhalb der finalen Konfiguration untersucht werden muss, um einen Vorteil in der Anwendung zu erreichen.

Erzeugung artifizierter Vorstufenproduzenten zur Mutasynthese von Prodigininen:

Es konnte gezeigt werden, dass auch die Produktion von Prodigininvorstufen durch die Erzeugung und Integration eines artifizierten Genclusters in das *P. putida*-Genom mit Hilfe des yTREX-Systems erfolgreich war. In einem gezielt erzeugten MBC-Produktionsstamm konnten so, gegenüber dem bisher verwendeten Stamm *P. putida* pig-r2 Δ pigD, um den Faktor 7 gesteigerte MBC-Mengen produziert werden. Auch die Prodigininausbeuten der Mutasynthese konnten mit diesem neuen Stamm um den Faktor 10 verbessert werden. Dabei konnte das Protein PigB als essenzieller Bestandteil bei der Reaktion identifiziert werden. Das neue Stamm-Setup ermöglicht so den leichten Tausch der Ligase, dem die Schlüsselfunktion im Hinblick auf die adressierbaren Produkte zukommt. *P. putida* erschien dabei erneut als sehr gut geeigneter Organismus sowohl zur Erzeugung heterologer Produktionsstämme als auch zur Durchführung von Derivatisierungsansätzen im Zuge der Mutasynthese.

Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden veröffentlicht in den Publikationen:

Domröse A., **Weihmann R.**, Thies S., Jaeger K.-E., Drepper T., Loeschcke A. (2017). *Rapid generation of Pseudomonas putida secondary metabolite production strains using yTREX. Synthetic and Systems Biotechnology* 2 (4) 310-319 doi: 10.1038/s41598-019-43405-1

Weihmann R., Domröse A., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A., (2020). *Protocols for yTREX/Tn5-based gene cluster expression in Pseudomonas putida. Microbial Biotechnology*, 13 (1) 250-262 doi:10.1111/1751-7915.13402

3.3 Konzeption der *y*TREX-*Toolbox* als modulares Expressionssystem

Das TREX-System (Kapitel 1.4) wurde ursprünglich dazu entwickelt verschiedene Wirtsorganismen mit geringem Aufwand auf ihre Fähigkeit zur Expression von Genclustern und die Produktion verschiedener Substanzen testen zu können. Die erzeugten Stämme können anschließend für eine initiale Produktion der gewünschten Substanzen genutzt und diese bezüglich ihrer biologischen Aktivität untersucht werden. Das gleiche Prinzip wird mit dem von Andreas Domröse entwickelten, *y*TREX-System angewandt, welches es ermöglicht, die nötigen Klonierungsschritte zur Erzeugung der Vektoren durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* durchzuführen (Domröse et al. 2017). Diese Neuerung vereinfachte der Klonierung der benötigten *y*TREX-Vektoren bereits deutlich, sodass wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben bereits komplexe artifizielle Gencluster in die *y*TREX-Vektoren kloniert und neue heterologe Produktionsstämme für verschiedene Substanzen erzeugt werden konnten. Auch das *y*TREX-System zeigte jedoch bei vermehrter Anwendung und insbesondere bei der Verwendung eines Reporters in Kombination mit artifiziellen Genclustern, noch Potential zur Vereinfachung der Anwendbarkeit.

Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil dieser Arbeit, das *y*TREX-System zu einer allgemein anwendbaren *Toolbox* weiterentwickelt. Diese *Toolbox* sollte dem Anwender durch ihren flexibel anwendbaren modularen Aufbau eine komfortable Möglichkeit bieten, die für die Funktionalität des TREX-Systems entscheidenden Elemente unabhängig voneinander zu verändern. Bei diesen Elementen handelt es sich im Wesentlichen um das zu integrierende Gencluster, einen visuell auslesbaren Transkriptionsreporter als Durchlesekontrolle, einen Resistenzmarker zur Selektion der Transformanten und einen variablen Integrationsmechanismus, je nach Ziel der Anwendung. Im Folgenden wird die Konzeption und Funktionsweise der *y*TREX-*Toolbox* erläutert.

Um die Kompatibilität der einzelnen Integrationsmodi zu gewährleisten, wurde die zentrale DNA-Sequenz des Systems in Kooperation mit Sonja Kubicki, Stephan Thies und Andreas Domröse gestaltet und von Anita Loeschcke betreut. Dabei wurde eine Tn7-Variante des Systems im Rahmen der Dissertation von Sonja Kubicki (Kubicki, 2020) erstellt, während eine Tn5-Variante sowie die zielgerichtete Integration von Genclustern im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert wurden. Von Sonja Kubicki durchgeführte Arbeiten sind dementsprechend kenntlich gemacht.

Grundsätzlich wurden beim Erstellen der *y*TREX-*Toolbox* vier wesentliche Eigenschaften umgesetzt. Dabei ist die Integration des Genclusters ins Genom des Wirtsorganismus von entscheidender Bedeutung, da dies das übergeordnete Ziel der Anwendung ist. Hier kann es im Hinblick auf neue biotechnologische Anwendungen sinnvoll sein, die Gencluster anhand der Klonierung artifiziell zu verändern, wie es beispielsweise zur Norprodigosinproduktion gemacht wurde (Kapitel 3.1.2). Diese Klonierungsarbeiten sollten also (I) möglichst komfortabel durchführbar sein.

Weiter hat sich ein Transkriptionsreporter als wirksames Hilfsmittel bei der Reduktion des Screeningaufwandes nach exprimierenden Klonen bei randomisierter, genomischer Integration erwiesen (Domröse et al., 2017) (Kapitel 3.2.1.1). Aus diesem Grund sollte (II) eine Variation dieser Reporter für verschiedene Anwendungen möglich sein. (III) Sollte auch bei der Wahl des Resistenzmarkers Flexibilität geschaffen werden, um diesen bei Bedarf an verschiedene Anforderungen anpassen zu können. Die (IV) Anpassung betrifft den Integrationsmechanismus und stellt die größte Neuerung des Systems dar. So sollte die *yTREX-Toolbox* von einem Screening-System hin zum molekulargenetischen Werkzeug zur gezielten Erzeugung neuer Produktionsstämme mit definierten Charakteristika erweitert werden. Dabei wird mit Hilfe der *yTREX-Toolbox* das Durchsuchen des gesamten Wirtsgenoms nach vielversprechenden Insertionsorten durch zufällige Integration möglich sein, in welche anschließend gezielt integriert werden kann.

Aufgrund der gewünschten Anpassungen erfolgte zunächst die Planung des *yTREX-Toolbox*-Systems und Konzeption auf DNA-Sequenzebene (Kapitel 3.3.1), gefolgt von der Konstruktion der *yTREX-Toolbox* Ausgangsvektoren (Kapitel 3.3.2), welche schließlich zur Anwendung des *yTREX-Toolbox*-Systems genutzt wurden (Kapitel 3.4).

3.3.1 Das *yTREX-Toolbox* Konzept

Um systematisch ein flexibles Expressionssystem aufzubauen, wurde die *yTREX-Toolbox* nach dem Modularitätsprinzip konzeptioniert (Abbildung 3-16, A). Dazu sollte eine neue Vektorfamilie erstellt werden, welche die *YT_core*-Sequenz (*YT*: *yTREX-Toolbox*, *core*: Kernelement der Vektorenreihe) als zentrale Einheit beinhaltet (Abbildung 3-16, B). In dieser Sequenz liegen einzigartige DNA-Sequenzen zwischen den als austauschbar konzeptionierten, genetischen Elementen vor, welche zur Klonierung der Vektoren genutzt werden sollen. In der Mitte jeder dieser Sequenzen werden Restriktionsendonukleaseschnittstellen kodiert, welche jeweils nur einmal auf dem Vektor vorliegen. Mittels dieser Schnittstellen soll der Vektor an spezifischen Stellen geöffnet werden können, um das jeweils gewünschte Modul in Form eines Marker- oder Reportergens, eines Genclusters oder regulatorischer Elemente, wie z.B. Promotoren, einzuklonieren oder auszutauschen. Aufgrund der einzigartigen DNA-Sequenzen, welche die Restriktionsschnittstellen flankieren, wird es dabei möglich sein, spezifische homologe Bereiche zur Klonierung der austauschbaren Elemente zu verwenden. Diese müssen dazu an die Primer zur Amplifikation der Elemente angefügt werden und können dann in alle Vektoren der *yTREX-Toolbox*-Familie, mit dem gleichen Arbeitsablauf integrieren werden. Dies soll zu einer wesentlichen Zeitersparnis bei neuen Klonierungen führen und zudem zum Aufbau einer Vektorbibliothek beitragen, welche den direkten Zugang zu *yTREX-Toolbox*-Vektoren mit verschiedenen bereits integrierten Markern, Reportern oder regulatorischen Elementen erlaubt.

Zudem wird es verschiedene Arten von Vektoren geben anhand derer man die Integrationsmethode der Gencluster in das Genom des Zielwirts bestimmen kann.

Aufgrund der entstehenden Vektorbibliothek soll es so zukünftig möglich sein, einfach den entsprechend geeigneten Vektor für die jeweilige Anwendung auszuwählen, um sofort mit der Klonierung des gewünschten Genclusters beginnen zu können. Im Folgenden wird eine Auswahl der konkret geplanten, austauschbaren Elemente der *yTREX-Toolbox* beschrieben.

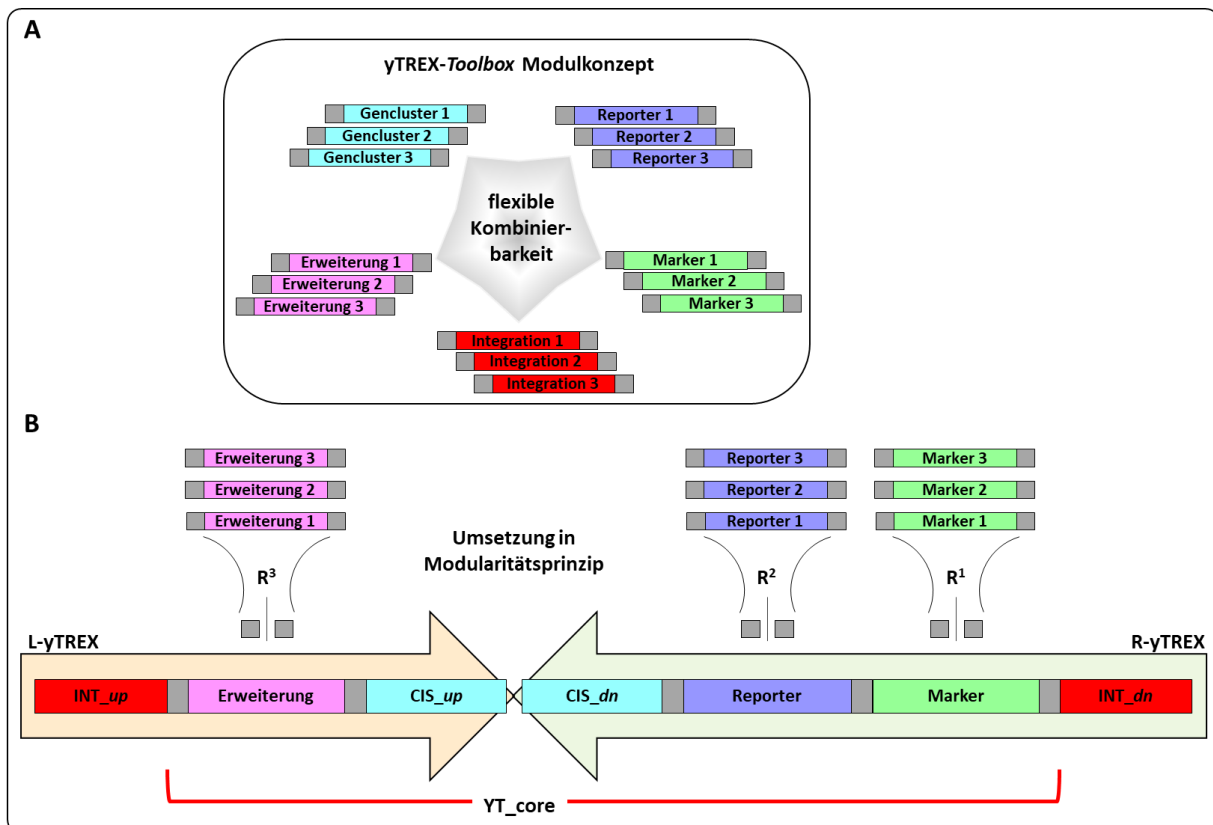


Abbildung 3-16: Konzept und Prinzip der Entwicklung einer modularen yTREX-Toolbox

(A) Das Ziel ist es, eine freie Kombinierbarkeit verschiedener Elemente innerhalb des Systems zu ermöglichen. Bei diesen handelt es sich um verschiedene Gencluster, Transkriptionsreporter, Resistenzmarker, Integrationsmodi und mögliche weitere Erweiterungen der *Toolbox*. (B) Zur Umsetzung dieses Ziels enthalten alle yTREX-*Toolbox*-Vektoren die YT_{core}-Sequenz, die nach dem Modularitätsprinzip das Einbringen bestimmter Elemente an speziell gewählte Positionen erlaubt, ohne dass dies eine Veränderung der anderen Komponenten bedeutet. Dazu sollen nach Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen an definierten Stellen (R¹, R² bzw. R³), festgelegte DNA-Sequenzen (graue Kästchen) zur homologiebasierten Klonierung genutzt werden. CIS_{up}, CIS_{dn}, linke und rechte Sequenz der *cluster integration site* (CIS); Int_{up}/Int_{dn}, Sequenzen zur Umsetzung verschiedener Integrationsmodi. Schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung.

3.3.1.1 Auswahl relevanter Transkriptionsreporter und Selektionsmarker

Wie im yTREX-System soll auch das yTREX-*Toolbox*-System die Möglichkeit bieten die vollständige Transkription eines Genclusters durch einen Reporter anzuzeigen. Dazu können verschiedene Gene verwendet werden, die bei ihrer Expression zu Proteinen führen, die aufgrund ihrer visuellen oder enzymatischen Eigenschaften einen einfachen Nachweis ermöglichen. Dabei soll es etwa nach einer randomisierten, genomischen Integration möglich sein ein einfaches agarplattenbasiertes Screening anzuwenden, um Klone manuell auswählen oder ein Hochdurchsatz-Screening durchführen zu können.

Dabei zeigt die Expression eines solchen Reporters, dessen Gen stromabwärts des Genclusters inkloniert wird, ausschließlich an, dass das Gencluster in seiner Gesamtheit transkribiert wird.

Die Reporteraktivität lässt also nicht zwingend den Schluss zu, dass das gewünschte Produkt auch produziert wird. Um diverse Nachweismethoden zu ermöglichen, wurden daher verschiedene Gene ausgewählt, die entsprechend detektierbare Proteine kodieren.

3.3.1.1.1 Enzyme als Transkriptionsreporter

Im γ TREX-System wurde bereits die sehr robuste β -Galactosidase, welche durch das *lacZ* Gen kodiert wird, als Transkriptionsreporter verwendet. Durch die spezifische Aktivität der β -Galactosidase erscheinen Kolonien des transformierten Bakteriums, die das gesamte Gencluster transkribieren, auf X-Gal haltigen Agarplatten blau und die anderen im Fall von *P. putida* weißlich (Abbildung 3-9). Anhand der unterschiedlichen Blaufärbung der Klone kann hierbei ein Eindruck der Expressionsstärke der erhaltenen Klone erhalten werden. Um eine genauere quantitative Aussage zu der Expressionsstärke zu erhalten, empfiehlt sich ein ONPG-Test, bei welchem das verwendete Substrat *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) gespalten wird, was durch das Abspalten von *o*-Nitrophenyl zu einem gelben Farbumschlag führt (Kapitel 3.2.1.1). Dieser kann wiederum detektiert und anhand der Intensität der Färbung direkt die Aktivität bzw. Menge der produzierten β -Galactosidase abgeleitet werden.

Ein ähnlicher Ansatz wird mit dem Gen einer Polyester Hydrolase (PE-H) aus *Pseudomonas aestusnigri* verfolgt (Bollinger et al., 2020a, 2020b). Durch die Expression und Aktivität der PE-H sollen exprimierende Klone dazu in der Lage sein, Polyester wie Tributyrin oder Impranil® zu spalten, was zu Klärhöfen (Molitor et al., 2020) oder zu einer Färbung bzw. Fluoreszenz durch beispielsweise Rhodamin B auf den sonst aufgrund der Substrate trüben Agarplatten führt (Samad et al., 1989). Anhand der Größe der Klärhöfe oder Intensität der Färbung sollen Rückschlüsse auf die Expressionsstärke des jeweiligen Klons bzw. auf die Aktivität des intrinsischen Promotors, unter dessen Kontrolle das Gencluster steht, möglich sein. Somit soll mit wenig Aufwand auch mit diesem Gen sowohl ein qualitativer als auch ein erster quantitativer Eindruck der Transkriptionsstärke ablesbar sein. Ein Vorteil der PE-H im Vergleich zum LacZ-basierten Screening käme vor allem bei bereits pigmentierten, heterologen Expressionsstämmen zum Tragen, da in diesen die Färbung ausgelöst durch die LacZ-Aktivität möglicherweise schlecht zu erkennen sein oder die Detektion des *o*-Nitrophenyl beim ONPG-Test beeinflusst werden könnte. Zudem kann eine gewisse Auswahl unter den enzymbasierten Nachweismethoden sinnvoll sein, da sie ggf. unterschiedlich sensitiv die Transkription der Gencluster anzeigen. Dies würde z.B. bei großen Genclustern gelten, wo die Transkriptmenge mit zunehmender Entfernung vom Promotor möglicherweise abnimmt (Domröse, 2016) und daher einen sehr sensitiven Reporter notwendig machen könnte.

3.3.1.1.2 Fluoreszenzproteine als Transkriptionsreporter

Da gezeigt werden konnte, dass in einigen Fällen die Menge des produzierten Reporterproteins mit der Metabolitmenge korreliert, kann es sinnvoll sein, den Reporter zu quantifizieren.

Um sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage treffen und diese mit einem Hochdurchsatz-Screening kombinieren zu können, wurden Gene von Fluoreszenzproteinen als Transkriptionsreporter ausgewählt. Diese können zusätzlich zum Platten-Screening auch für Hochdurchsatz-Screenings mittels eines *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)*-Geräts eingesetzt werden, um die Fluoreszenz der Zellen in einem Vorgang detektieren, analysieren und die Zellen anhand der Fluoreszenzstärke sortieren zu können. Um das Hochdurchsatz-Screening mit dem *yTREX-Toolbox*-System so allgemein anwendbar wie möglich zu gestalten, wurden Fluoreszenzreporter ausgewählt, die sich mit den am häufigsten in *FACS*-Geräten verbauten Lasern anregen lassen: eYFP (*enhanced yellow fluorescent Protein*), mTagBFP2 (*blue fluorescent protein*) und mCherry (*red fluorescent protein*). Mittels dieser Reporterproteine soll es möglich sein die Zellen direkt aus der Transformations- oder Konjugationssuspension für ein Screening zu verwenden. Es kann mit diesem Verfahren während der Detektion der Fluoreszenz auch die Fluoreszenzhelligkeit der jeweiligen Zelle, welche einen Hinweis auf die Expressionsstärke liefert, bestimmt werden. Dabei können Zellen anhand ihrer Fluoreszenzintensität sofort zur weiteren Verwendung ausgewählt und gesammelt werden. Mit Hilfe dieses Systems können so mehrere tausend Zellen pro Sekunde untersucht und selektiert werden, was den Screening-Aufwand im Vergleich zum visuellen bzw. testbasierten Screening erheblich verringert und die Anzahl der Klone, die untersucht werden können, stark erhöht.

3.3.1.1.3 Resistenzgene als Selektionsmarker

Um den Einsatz der *yTREX-Toolbox* in verschiedenen Anwendungsszenarien zu gewährleisten, sollte es auch im Fall der Resistenzgene möglich sein, die Resistenz des Transposons auszutauschen. Dies ist zwangsläufig dann notwendig, wenn das System in einem Bakterienstamm eingesetzt werden soll, welcher bereits ein Resistenzgen trägt, da sonst keine Selektion von Klonen mit integriertem Transposon möglich wäre. Soll zum Beispiel ein Gencluster in einen bakteriellen Wirt integriert werden, der bereits durch genetische Manipulation verändert wurde, ist es wahrscheinlich, dass dieser bereits Antibiotikaresistenzen aufweist. Um dennoch das *yTREX-Toolbox*-System anwenden zu können, muss aus verschiedenen Antibiotika-Resistenzgenen gewählt werden können. Auch soll durch die Wahl eines bestimmten Resistenzmarkers eine Kompatibilität mit später in diesem Stamm zu nutzenden Plasmiden und deren Resistenzmarkern sichergestellt werden. Daher wurden Resistenzmarker gegen Gentamicin (*aacC1*) (Choi et al., 2005), Tetracyclin (*tetA(C)*) (Domröse et al., 2017), Streptomycin (*aadA*) (Prentki & Krisch, 1984), Kanamycin (*aphII*) (Pridmore, 1987) und Chloramphenicol (*cat*) (Katzke et al., 2010; Shaw, 1983) als modulare Bestandteile der *Toolbox* ausgewählt.

Die entsprechenden Gene sind molekularbiologisch gängige Marker und ihre Funktionalität in *P. putida* ist bereits bekannt.

3.3.1.2 Design der Rekombinationssequenzen und Auswahl der Endonukleasen zur Integration funktionaler Elemente

Die Bereiche, welche zur Klonierung aller gewünschten Elemente in einen *yTREX-Toolbox*-Vektor genutzt werden sollen, wurden als unterschiedliche Sequenzen mit randomisierten Basenabfolgen geplant (Abbildung 3-17). Die absolute Zufälligkeit und Unterschiedlichkeit dieser Sequenzen untereinander, aber auch auf die Sequenzen mikrobieller Genome bezogen, ist in diesem Zusammenhang essenziell. Mit diesem Ansatz soll die Wahrscheinlichkeit einer ungeplanten, homologen Rekombination entweder bei der Klonierung in *S. cerevisiae* oder der Integration des Genclusters in das Genom des Zielorganismus möglichst geringgehalten werden.

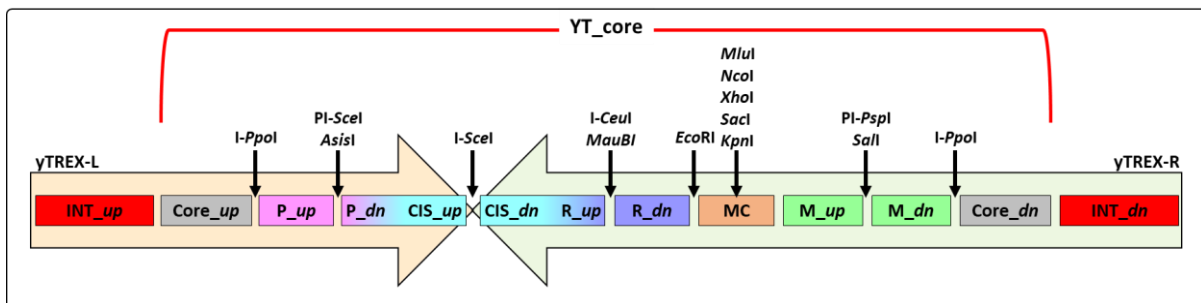


Abbildung 3-17: Position der Endonukleaseschnittstellen und Rekombinationssequenzen im Integron eines *yTREX-Toolbox*-Vektors

Die farbigen Blöcke zeigen die verschiedenen hier als Rekombinationssequenzen bezeichneten DNA-Abschnitte an, die in der *yTREX-Toolbox* vorliegen und zur homologiebasierten Klonierung verschiedener Elemente an diesen Stellen dienen sollen. Das Integron, der Teil, welcher ins bakterielle Genom integriert wird, ist mit einer roten Klammer gekennzeichnet und wird durch die Integrationssequenzen (*INT_up* und *_dn*) begrenzt. Die schwarzen Pfeile zeigen die Lokalisation der Endonukleaseschnittstellen zwischen den Rekombinationssequenzen an. Eine Erweiterung des Systems oder die Integration von beispielsweise Promotoren, kann im Rekombinationsbereich *P_up/P_dn* durch Klonierung mit den Endonukleasen *AsiSI* oder *PI-SceI* realisiert werden. Die *homing*-Endonuklease *I-SceI* innerhalb der Genclusterintegrationsstelle (*CIS_up* und *_dn*) dient dem Linearisieren des Vektors und dem Einbringen eines Genclusters an dieser Stelle. *MauBI* oder alternativ *I-CeuI* dienen dagegen zum Einbringen eines Transkriptionsreporters in der Sequenz zur Integration eines Transkriptionsreporters (*R_up/R_dn*) (siehe auch Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2). Zwischen Reporter und Marker liegen die Erkennungssequenzen verschiedener Endonukleasen in einem *multiple cutter* (MC) genannten Bereich, die jeweils nur diese eine Schnittstelle innerhalb der *yTREX-Toolbox* besitzen. Diese können zur Identifizierung des Integrationsortes nach randomisierter Transposition in das Genom (Kapitel 3.3.1.4) genutzt werden. Die *I-PpoI* Schnittstelle, welche am Anfang und Ende des Konstruktes vorkommt, kann dazu verwendet werden, den Integrationsmechanismus (*INT_up* und *_dn*) eines fertig klonierten Integrons zu verändern. Dazu kann der gesamte Bereich inklusive dem Gencluster und allen funktionalen Elementen durch Hydrolyse isoliert und in einen *yTREX-Toolbox*-Vektor, welcher eine anderer genomische Integrationsmethode ermöglicht, integriert werden. Hierzu stehen die Rekombinationssequenzen *Core_up* und *Core_dn* zur Verfügung. Schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung.

Um zu gewährleisten, dass die Rekombinationssequenzen komplett zufällig sind und einen GC Gehalt von rund 50 % haben, wurden diese mit Hilfe der *Sequence Manipulation Suite* generiert (Stothard, 2000). Nach der zufälligen Generierung der Sequenzen mittels dieses Online-Tools wurden die Sequenzen zudem manuell auf das Vorkommen verbreiteter Sequenzen von Ribosombindestellen sowie von Start- und Stopcodons untersucht.

Alle diese Sequenzen innerhalb der zufällig generierten Rekombinationssequenzen wurden entfernt, wobei darauf geachtet wurde, die Basen möglichst zufällig auszutauschen und den GC-Gehalt bei 50 % zu belassen. Im Anschluss wurden alle Rekombinationssequenzen mit dem Online-Tool BPROM auf das Vorhandensein von oder auf Ähnlichkeiten zu bakteriellen Promotoren untersucht, sowie mit dem Online-Tool ARNold (Naville et al., 2011; Solovyev & Salamov, 2011) auf Sequenzen bakterieller Transkriptionsterminatoren durchsucht, um diese auszuschließen. Abschließend wurden die erzeugten Sequenzen *via* BLASTN mit der gesamten NCBI Datenbank verglichen, um auch eine Ähnlichkeit mit einigen möglicherweise interessanten Genclustern ausschließen zu können und unerwünschte homologe Rekombinationsereignisse präventiv zu vermeiden (Kapitel 2.3.2.1). Die Benennung, Funktion und Länge der so erstellten designierten Rekombinationssequenzen sind in Tabelle 3-1 zusammen-gefasst.

Tabelle 3-1: Nomenklatur, Funktion und Länge der Rekombinationssequenzen

Rekombinationsbereich	Funktion im yTREX- <i>Toolbox</i> -Vektor	Sequenzlänge [Bp]
<i>Core_up</i>	Rekombinationsbereich zum Austausch der gesamten <i>Toolbox</i> zwischen <i>Toolbox</i> -Vektoren mit verschiedenen Integrationsmodi	40
<i>P_up</i>	Rekombinationsbereiche zur Integration von Erweiterungselementen der <i>Toolbox</i> in Kombination mit dem 5'-Teil der <i>CIS_up</i>	40
<i>P_dn</i>		40
<i>CIS-up</i>	Rekombinationsbereiche zur Integration eines Genclusters	120
<i>CIS-dn</i>		120
<i>R_up</i>	Rekombinationsbereiche zur Integration eines Transkriptionsreporters <i>R_dn</i>	40
<i>R_dn</i>		40
<i>M_up</i>	Rekombinationsbereiche zur Integration eines Selektionsmarkers	40
<i>M_dn</i>		40
<i>Core_dn</i>	Rekombinationsbereich zum Austausch der gesamten <i>Toolbox</i> zwischen <i>Toolbox</i> -Vektoren mit verschiedenen Integrationsmethoden	40

Zum Linearisieren eines yTREX-*Toolbox*-Vektors jeweils in der Mitte der zufälligen Rekombinationssequenzen wurden verschiedene Restriktionsendonukleasen ausgewählt (Abbildung 3-16, B). Das wichtigste Kriterium für die Auswahl war, dass es sich um singuläre Schnittstellen im gesamten yTREX-*Toolbox*-Konstrukt handelt. Dabei sollte es sich zum einen um gut nutzbare und allgemein verwendete Endonukleasen bzw. Restriktionsschnittstellen handeln, zum anderen durften diese möglichst weder in den ausgewählten Transkriptionsreportern oder Selektionsmarkern vorhanden sein, welche möglicherweise später in den *Toolbox*-Vektor integriert oder ausgetauscht werden sollen.

Daher wurden bei der Planung der *Toolbox* bereits verschiedene Marker- und Reportergene ausgewählt (Kapitel 3.3.1.1) und zum Sequenzabgleich genutzt (Tabelle 7-3). Aus den übrigen in Frage kommenden Schnittstellen wurden diejenigen ausgewählt, welche zum Linearisieren des Vektors zur Verfügung stehen sollen. Um die Auswahl dabei so groß wie möglich zu halten, wurde geprüft, ob das Vorkommen einzelner Schnittstellen bei Betrachtung einer Unterteilung zwischen Transkriptionsreporter und Resistenzmarker zwingend zu Problemen bei Klonierungen führen würde. Dabei ist z.B. das Vorhandensein einer *MauBI* Schnittstelle, welche zum Öffnen des *yTREX-Toolbox*-Vektors an der Integrationsstelle eines Reportergens gewählt wurde, in einem Reporter gen kein Ausschlusskriterium, da dieses Insert mittels PCR amplifiziert und rekombinationsbasiert kloniert werden soll, ohne einer Restriktion unterzogen zu werden. Auch wäre das Zerschneiden eines bereits integrierten Reportergens beim Austausch mit einem anderen unproblematisch.

Analog verhält es sich z.B. mit *Sall* in Bezug auf die Resistenzmarkergene. Bei den genetischen Elementen der Reporter- und Selektionsmarkergene bestand also nur eine Kreuzabhängigkeit in dem Sinn, dass die Restriktionsschnittstelle nicht in den Gensequenzen der jeweils anderen Elemente vorhanden sein durfte. Nach diesen Maßgaben wurden die Erkennungssequenzen für *AsiI*, *MauBI*, *EcoRI* und *Sall* zur Hydrolyse des Vektors und dem Einbringen etwaiger Promotoren, Reporter- oder Selektionsmarkergene definiert (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Endonuklease, Funktion und Sequenzlänge der Schnittstelle

Endonuklease	Funktion im <i>yTREX-Toolbox</i> -Vektor	Sequenzlänge [Bp]
<i>AsiI</i>	Öffnen der potenziellen Promotorintegrationsposition [stromaufwärts des Genclusters]	8
<i>MauBI</i>	Öffnen des Vektors zur Integration eines Transkriptionsreporters	8
<i>EcoRI</i>	Öffnen der potenziellen Promotorintegrationsposition [stromabwärts des Genclusters]	6
<i>Sall</i>	Öffnen des Vektors zur Integration eines Selektionsmarkers	6
<i>homing</i> -Endonuklease	Funktion im <i>yTREX-Toolbox</i> -Vektor	Sequenzlänge [Bp]
I- <i>Scel</i>	Öffnen des Vektors zur Integration eines Genclusters	18
I- <i>PpoI</i>	Austausch der gesamten <i>Toolbox</i> zwischen verschiedenen Vektoren	15
PI- <i>Scel</i>	Öffnen des Vektors zur nachträglichen Integration eines vorwärts gerichteten Promotors	37
I- <i>CeuI</i>	Öffnen des Vektors zur nachträglichen Integration eines Transkriptionsreporters	27
PI- <i>PspI</i>	Öffnen des Vektors zur nachträglichen Integration eines rückwärts gerichteten Promotors	30

Um auch nach der Integration eines großen Genclusters, welches meist viele Endonukleaseschnittstellen trägt, in der Lage zu sein, dass Reporter- bzw. Selektionsmarker gen auszutauschen, wurden zusätzlich zu den gewöhnlichen Endonukleaseschnittstellen, *homing*-Endonukleaseschnittstellen zwischen den Rekombinationsbereichen integriert. Diese zeichnen sich durch besonders lange, asymmetrische Erkennungssequenzen von 12-40 Basenpaaren aus und sind aus diesem Grund in natürlichen DNA-Sequenzen sehr selten. Eine 18 Bp lange Sequenz, wie z.B. die Schnittstelle der *homing*-Endonuklease I-SceI kommt statistisch nur einmal in einer 7×10^{10} Bp langen zufällig generierten Sequenz vor, was etwa der Anzahl an Nukleotiden in 20 menschlichen Genomen entspricht (Jasin, 1996). Diese Seltenheit soll es ermöglichen auch im Nachhinein die funktionellen Elemente der *yTREX-Toolbox* auszutauschen. Daher wurden die Erkennungssequenzen für die *homing*-Endonukleasen I-SceI, I-PpoI, PI-SceI, I-CeuI und PI-PspI zur Genclusterintegration und für den Austausch von Elementen ausgewählt.

3.3.1.3 Definition der Integrationsmodi des *yTREX-Toolbox*-Systems

Neben der Möglichkeit, die Methode der Selektion und des Gencluster-Transkriptionsnachweises nach Wahl anzupassen, soll die *yTREX-Toolbox* zudem verschiedene Optionen bieten, ein Gencluster ins Wirtsgenom zu integrieren.

Dabei sollte (I) die Integration mittels Tn5-Transposition auch für die *yTREX-Toolbox* etabliert werden, da es sich bereits beim Screening ganzer Genome bewährt hat. Zudem sollte (II) die Funktionsfähigkeit dahingehend erweitert werden, dass ein spezifischer Ort im Wirtsgenom adressiert werden kann, um z.B. verschiedene genetische Regulationssysteme vergleichend testen zu können. Dieser Ansatz wurde mittels des Tn7-Transposonsystems verfolgt, dessen Anwendung im Zuge der *yTREX-Toolbox* in der Dissertation von Sonja Kubicki (Kubicki, 2020) beschrieben ist. Mit diesem System integriert das Transposon immer im *attTn7* Locus, was für eine Vergleichbarkeit u.a. von regulatorischen Systemen, zwingend notwendig ist. Schließlich sollte (III) ein Interposonsystem etabliert werden, womit vielversprechende Integrationsloci direkt adressiert werden sollen. Dabei soll das Integron des *yTREX-Toolbox*-Konstrukts, inklusive aller oben beschriebenen funktionalen Elemente mit Hilfe von Nukleotidsequenzen, welche homolog zum Integrationsort sind und das *yTREX-Toolbox*-Konstrukt, erfassen, durch homologe Rekombination in den entsprechenden Locus integriert werden. Dazu kann sich besonders die rDNA von *P. putida* anbieten, da hier bereits eine effektive Transkription und Metabolitproduktion nach einer Genclusterintegration nachgewiesen werden konnte (Domröse et al., 2015). Alle diese Integrationsmechanismen bieten dabei verschiedene Vor- und Nachteile und sollen je nach Ziel der späteren Anwendung anhand drei verschiedener Vektorvarianten (Abbildung 3-18) ausgewählt werden können.

Die Wahl des Integrationsmodus stellt dabei einen Sonderfall im γ TREX-*Toolbox*-System dar, da die genetischen Elemente zur Genomintegration nicht in einem bestehenden Vektor ausgetauscht werden können. Ein Wechsel von einem Modus zu einem anderen kann hier vollzogen werden, indem ein erstelltes Integron als Ganzes mit Hilfe der *homing* Endonuklease *I-PpoI* isoliert und in eine Vektorvariante mit alternativen Integrationselementen eingebracht wird (Abbildung 3-18).

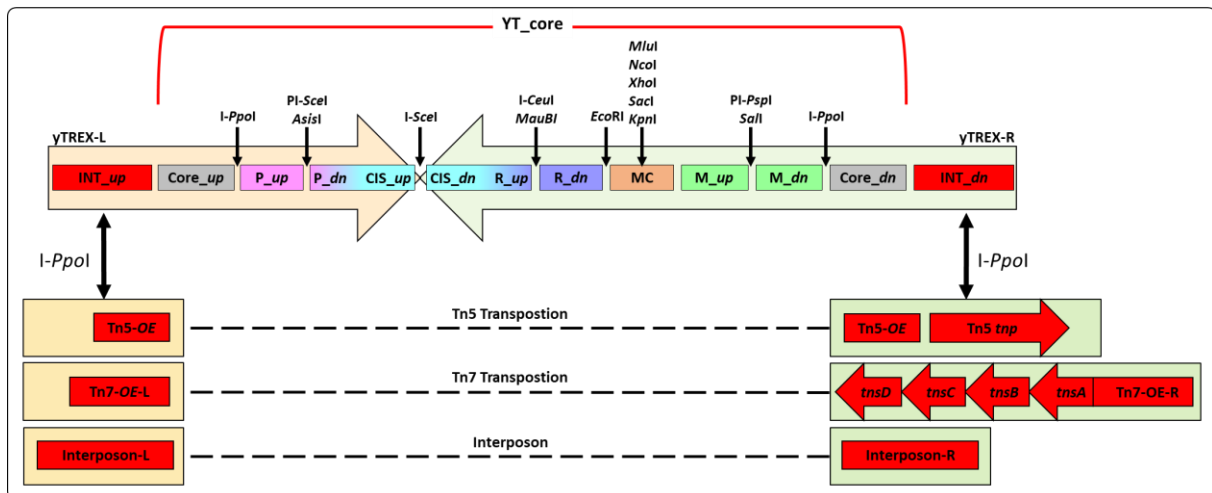


Abbildung 3-18: Schematische Darstellung der genetischen Elemente zur Anwendung verschiedener Integrationsmechanismen in der γ TREX-*Toolbox*

Dargestellt sind die, als Bestandteil der γ TREX-*Toolbox*-Vektorfamilie vorgesehenen, beiden γ TREX-*Toolbox*-Kassetten mit ihren flexibel austauschbaren Elementen, Reporter, Marker, Erweiterung und der Genclusterintegrationsstelle (CIS_{up} und CIS_{dn}) zwischen den beiden Kassetten. Weiter sind die Möglichkeiten der genomischen Integration, die das System bieten soll, allgemein durch die roten Boxen (INT_{up} und _{dn}), gekennzeichnet. Diese stehen für verschiedene Elemente in drei unterschiedlichen Vektorvarianten, die spezifische Methoden bieten, das Integron in ein bakterielles Wirtsgenom zu integrieren. Die YT_{core}-Sequenz kann dabei inklusive aller Elemente mit Hilfe der *homing*-Endonuklease *I-PpoI* isoliert und in einen Vektor mit anderem Integrationsmechanismus kloniert werden. Unter den γ TREX-*Toolbox*-Kassetten sind die entsprechenden genetischen Elemente spezifiziert (schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung). In allen Fällen fassen diese sämtliche Komponenten der YT_{core}-Sequenz ein, wodurch dieses an den durch die Methode definierten oder einen zufälligen Ort im Wirtsgenom integriert werden kann. Das Tn5-Transpositionssystem führt zu einer ungerichteten, genomischen Integration. Das Gen der Tn5-Transposase (Tn5 *tnp*) wird bei dieser Methode nicht ins Wirtsgenom übertragen. Bei der Tn7-Transposition wird das Integron immer am *attTn7* Locus im Wirtsgenom integriert. In diesem Fall sind die OEs länger und die Transposase wird durch vier Gene kodiert. Da das rechte, begrenzende OE (Tn7-OE-R) mit dem ersten Gen des Operons *tnsA* gekoppelt vorliegt, werden bei dieser Methode die transposasekodierenden Gene gemeinsam mit dem Integron ins Wirtsgenom integriert. Bei der Interposonmethode wird das Integron durch homologe Rekombination integriert. Dazu sind die hier als Interposon-L und -R gezeigten Sequenzbereiche homolog zu einem Locus im Wirtsgenom.

3.3.1.4 Lokalisation eines Tn5-Integrationsortes und mögliche Erweiterungen des Systems

Die Tn5-Transposition konnte bereits dazu genutzt werden, besonders geeignete Integrationsloci im *P. putida* KT2440 Chromosom anzuzeigen. Um weitere vielversprechende, mit Hilfe der Tn5-Transposition identifizierte genomische Integrationsorte zu lokalisieren, wurden verschiedene singuläre Endonukleaseschnittstellen in das YT_{core}-Design aufgenommen. Nach erfolgreicher Genomintegration eines Genclusters an einer zufälligen Stelle (Kapitel 1.4.2) können verschiedenste Methoden angewendet werden, um die Integrationsposition zu identifizieren. Bei einer Methode, welche vermutlich am häufigsten angewendet wird, werden ringförmige DNA-Moleküle erzeugt und sequenziert (Saavedra et al., 2017). Alternativ wird häufig ein Plasmid-*rescue* Ansatz verfolgt (Huang et al., 2009; Kiessling et al., 1984).

Um diese Methoden zu ermöglichen, wurden mehrere Erkennungssequenzen für Endonukleasen integriert, welche allgemein häufiger in genomischer DNA (gDNA) vorkommen. Dazu wurde das *P. putida* KT2440 Chromosom auf das Vorhandensein von Endonukleaseschnittstellen überprüft, die das Genom in Fragmente einer Größe von 1,8 bis 7,8 Kb unterteilen. Zudem sollten sie soweit möglich nicht innerhalb der *γ*TREX-*Toolbox*-Sequenz oder deren variablen Elementen schneiden (Tabelle 7-3). In einer *multiple cutter* Sequenz (*MC*) wurden somit die Endonukleaseschnittstellen der Enzyme *MluI*, *NcoI*, *XhoI*, *SacI*, *KpnI* gebündelt. Unabhängig von der Möglichkeit den Integrationsort des *γ*TREX-Transposons im Genom zu finden bietet die *MC* zudem die Option, das System mit weiteren nützlichen funktionellen Elementen und damit weiteren Eigenschaften zu erweitern.

3.3.1.5 Definition der Interposon-Zielsequenz

Mit Hilfe der Tn5-Transposition konnten im Vorfeld dieser Arbeit die rDNA-Operons (auch: *rrn* Operons) als vielversprechende Loci zur Integration und Überexpression von Genclustern in *P. putida* identifiziert werden (Domröse et al., 2019).

Die Studie diente daher als Ausgangspunkt für die Definition der Zielsequenzen der Interposonvariante des *γ*TREX-*Toolbox*-Systems. Sie stützt sich auf eine Stammbibliothek von 50.000 *P. putida*-Stämmen, welche das *pig*-Gencluster an einem zufälligen genomischen Locus integriert trugen (Domröse, 2016). In 50 anhand der roten Pigmentierung gewählten Stämmen war das *pig*-Gencluster dabei in eines der sieben *rrn*-Operons integriert. Diese unterscheiden sich nur durch wenige Basen in ihrer Nukleotidsequenz. Eine Integration in die Operons A, C und D führte dennoch zu einer deutlich stärkeren Expression und Produktion als eine Integration in die Operons B, E, F und G (Abbildung 3-19). Auffällig sind dabei die Unterschiede innerhalb der -35 und die -10 Regionen der beiden Promotorsequenzen in den verschiedenen *rrn*-Operons (Kapitel 1.4.2). Unterschiede zur Sequenz des Operons A korrelieren hier stark mit einer verringerten Prodigiosinproduktion (Domröse et al., 2019). Neben diesen Sequenzunterschieden der sieben Operons weisen diese zudem Unterschiede in ihrer Lokalisation im Genom auf (Abbildung 3-19). Eine Lokalisation nah am Replikationsursprung wird im Allgemeinen mit einer höheren „*gene dosage*“ aufgrund der Replikation assoziiert (Slager & Veening, 2016). Die erhöhte Expressionsleistung bei der Genintegration in ein *rrn*-Operon dicht am Replikationsursprung könnte somit auf einen ähnlichen Effekt zurückzuführen sein, wie für den *attTn7* Locus vermutet. Da sich dieser auch dicht am Replikationsursprung befindet, wird vermutet, dass dieser Locus aufgrund der fortschreitenden Zellteilung die meiste Zeit in zwei oder mehreren Kopien vorliegt (Chaves et al., 2020; Lieder et al., 2014; Slager & Veening, 2016), was zu einer erhöhten Transkription führen kann (Arciszewska et al., 1989). Da jedoch in einigen der rDNA-Operons seltener Integrationen vorlagen, sind diese in der Statistik unterrepräsentiert (Domröse et al., 2019). Aus diesem Grund konnte anhand dieser Studie bezüglich der operonabhängigen Produktivität nur von Trends gesprochen werden.

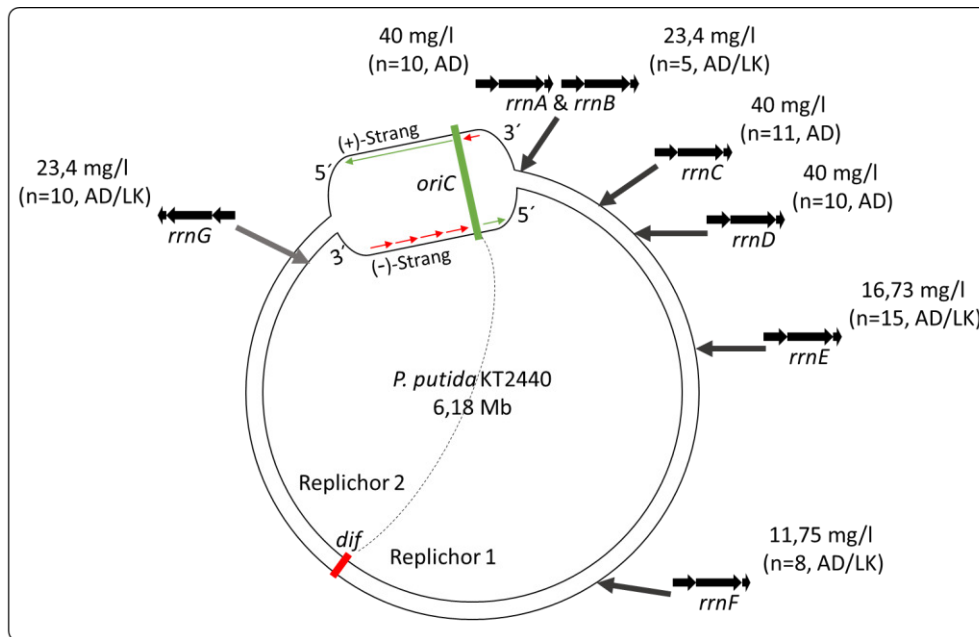


Abbildung 3-19: Übersicht der Lokalisation der *rrn*-Operons im Genom von *P. putida* KT2440 mit durchschnittlichen Prodigiosintitern

Schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung des Genoms von *P. putida* mit eingezeichneten Loci der verschiedenen *rrn* Operons. Die Pfeilspitzen markieren die Lokalisation der Operons im Genom, welche auf dem (+) Strang (A bis F) oder (-) Strang (G) der DNA liegen. Zudem liegt Operon G im Replichor 2, wohingegen alle übrigen Operons in Replichor 1 liegen. Durch randomisierte Tn5-vermittelte Integration der *pig*-Gene (Verwendung des Vektors pTREX-LpigR) wurden 69 Stämme erzeugt, die dieses in einem *rrn*-Operon tragen. Zur Einschätzung der unterschiedlichen Expressionskapazitäten der einzelnen Operons sind jeweils die, bei dortiger Integration durchschnittlichen von Andreas Domröse (AD) und Luzie Kruse (LK) gemessenen, Prodigiosintiter in mg/l angegeben, sowie die Stichprobengröße. Der Replikationsursprung (*oriC*) ist durch einen grünen und die Terminationssequenz (*dif*) durch einen roten Strich gekennzeichnet. Beide unterteilen das Chromosom in die zwei Replichore (markiert durch die gestrichelte Linie). Diese werden jeweils kontinuierlich (grüne Pfeile) sowie diskontinuierlich repliziert, wodurch die in der Replikationsgabel angedeuteten Okasaki Fragmente entstehen (rote Pfeile). Darstellung der Abbildung inspiriert von Aparicio et al., 2016.

Für die vorliegende Arbeit ist der beschriebene Trend von besonderem Interesse, da eine deutlich unterschiedliche Expression bei Genclusterintegration in die rDNA-Loci genutzt werden könnte, um definierte Expressionsstärken gezielt durch Integration in bestimmte Operons einzustellen. Als Grundlage für die Entwicklung einer solchen Strategie galt es zunächst zu verifizieren, ob die Insertion eines Genclusters in die unterschiedlichen *rrn*-Operons zu einer deutlich unterschiedlichen Expressions- und Produktionsstärke führt.

Diese Verifikation wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Luzie Kruse durchgeführt, welche an die vorliegende Doktorarbeit angegliedert war. Dabei wurden gezielt die bis dahin unterrepräsentierten *rrn*-Operons B, E, F und G untersucht (Kruse, 2017). Im Rückblick auf den Trend der Datenanalyse von Andreas Domröse wurde dazu die Screening-Methode angepasst. In einer Bibliothek von ca. 30.000 Klonen, die das TREX-*pig* Transposon trugen, wurden nicht nur gezielt die Stämme herausgesucht, die besonders rot erschienen, sondern auch diejenigen, die nur eine leichte rötliche Färbung aufwiesen. Mit dieser Strategie wurden neben den stark produzierenden Stämmen auch vermehrt Stämme gesammelt, die zwar Prodigiosin produzierten, jedoch auf einem moderaten bis niedrigen Level.

Durch die angepasste Selektionsmethode im Rahmen der Bachelorarbeit konnte gezeigt werden, dass tatsächlich vermehrt Stämme gefunden werden konnten, bei denen das *pig*-Gencluster in den Operons B, E, F und G inseriert war (Kruse, 2017). Der Vergleich des Prodigiosintiters mit den von Andreas Domröse erhobenen Daten und die Betrachtung der gemittelten Daten stützten dabei die These, dass die Produktivität der Prodigiosinproduzenten abhängig vom *rrn*-Operon war (Abbildung 3-19).

Einen ähnlichen Effekt, also ein organismusspezifisches Muster der Expressionsstärke zwischen den verschiedenen Operons, haben andere Studien bereits für *Pseudomonas sp.* UW4 und *E. coli* beschrieben (Duan et al., 2014; Maeda et al., 2015). Dies bekräftigte eine Eignung der rDNA-Loci zur gezielten Wahl unterschiedlicher Expressionsstärken nach Genclusterinsertion.

Es können allerdings auch äußere Einflüsse wie z.B. die Nährstoffversorgung, Stress oder allgemein die Umweltbedingungen einen großen Einfluss auf die Expressionsleistung der verschiedenen *rrn*-Operons haben, die Expressionsmuster stark verändern oder sogar umkehren (Duan et al., 2014; Kurylo et al., 2018; Maeda et al., 2015). Da alle bisher beschriebenen Experimente unter gleichbleibenden Standardbedingungen durchgeführt wurden, war bisher nicht klar, ob die *rrn*-Operons von *P. putida* KT2440 in einer ähnlichen Weise reguliert sind.

Um dies zu untersuchen, wurde mit einer Auswahl von Stämmen, die geringe, mittlere und starke Produzenten nach Insertion in verschiedene Operons repräsentierten, die Prodigiosinproduktion bei einer Kultivierung in M9 Minimalmedium im Vergleich mit der vorherigen Kultivierung in TB Vollmedium analysiert (Domröse et al., 2019). Dazu wurden die Stämme in M9 Minimalmedium (800 µl, bei 20 °C und 1400 UpM in Flowerplates über 24 h) kultiviert, wie es im Zuge der vorherigen Studie in TB-Medium gemacht wurde. Anschließend wurde der Prodigiosingehalt durch Absorptionsmessung in einem Ethanolextrakt bestimmt (Kapitel 2.8.2.2) (Abbildung 3-20).

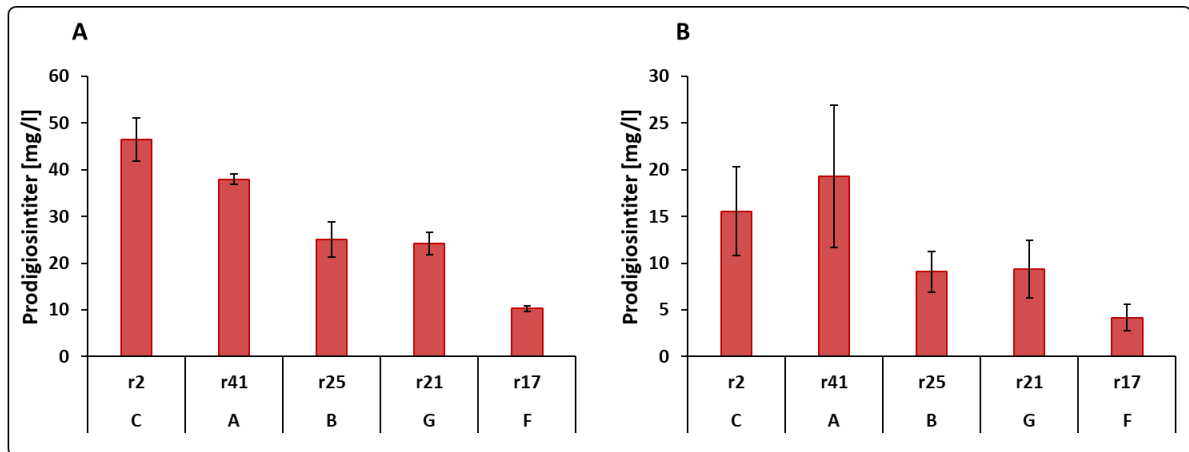


Abbildung 3-20: Prodigiosinproduktion in Voll- und Minimalmedium bei *pig*-Geninsertion in verschiedene *rrn*-Operons

Gezeigt ist ein Vergleich der Prodigiosintiter, welche von Andreas Domröse in TB-Medium bestimmt wurden (Domröse, 2016) (A), und Messungen der gleichen Stämme nach einer Kultivierung in M9-Minimalmedium im Rahmen der vorliegenden Arbeit (B). Dazu wurden Stämme bei 20 °C schüttelnd in Flowerplates inkubiert nach 24 h der Prodigiosintiter anhand von Absorptionsmessungen in Ethanolextrakten bestimmt. An der X-Achse ist die jeweilige Stammbezeichnung und das entsprechende *rrn*-Operon, in welches das *pig*-Gencluster integriert wurde, angegeben. Die Stämme wurden in absteigender Reihenfolge nach viel produzierenden Stämmen (r2, r41), mäßig produzierenden (r25, r21) und wenig produzierenden Stämmen (r17) angeordnet. Die Prodigiosintiter sind als Mittelwerte einer biologischen Dreifachbestimmung, im Fall der M9 Daten, einer biologischen Sechsfachbestimmung, mit den entsprechenden Standardabweichungen angegeben.

Die Daten zeigen, dass obwohl die allgemeine Produktionsleistung im M9 Minimalmedium deutlich geringer ist als in TB-Medium, das übergeordnete Muster der Expressionsstärke auch bei Nährstofflimitation ähnlich bleibt. Die Produzenten können in beiden Medien abhängig vom Operon grob in Gruppen von wenig produzierenden (r17), moderat produzierenden (r21 und r25) und viel produzierenden Stämmen (r2 und r41) unterteilt werden. Die Abweichung, die im Fall des Stammes r2 zu verzeichnen ist, welcher das Prodigiosin-Gencluster im *rrn*-Operon C trägt, wäre in diesem Kontext mit der Entfernung dieses Locus zum Replikationsursprung sowie der deutlich langsameren Zellteilung in M9 Minimalmedium erklärbar. Das *rrn*-Operon C könnte dabei in einer kritischen Entfernung zum Replikationsursprung liegen, welcher dafür sorgt, dass bei einer vermehrten Zellteilung zwei Kopien des Locus vorliegen (Chaves et al., 2020; Slager & Veening, 2016), jedoch bei langsamer Teilungsrate nur eine Kopie, was die unterschiedlichen Titer mit einer verminderten Transkription erklären würde. Das Ergebnis zeigt, dass sich die relative Expressionsstärke der getesteten *rrn*-Operons unter den untersuchten Nährstoffbedingungen, nicht maßgeblich ändert und sich die *rrn*-Operons daher als robuste Insertionsorte zur gezielten Regulation der Expressionsstärke integrierter Naturstoffbiosynthesegencluster in *P. putida* KT2440 eignen.

Daher wurde die Geninsertion an diesem Locus als ein Integrationsmodus in der Konzeption der γ TREX-*Toolbox* festgelegt. Da die Integration der *pig*-Gene in das 16S-Gen zumeist eine stärkere Expression und Produktion bewirkte als die Integration in das stromabwärts gelegene 23S-Gen (Domröse et al., 2019), wurde ersteres als Ziel zur Interposonintegration definiert.

Die *rrn*-Integration stellt damit die dritte Methode zur Integration eines Genclusters in die genomische DNA des Zielwirtes dar, womit die Konzeption der γ TREX-*Toolbox* abgeschlossen wurde.

Mit der *yTREX-Toolbox* soll so aus einer Auswahl genetischer Elemente zur Selektion und Visualisierung der Transkription ausgewählt und ein auf die Ansprüche des jeweiligen Projekts angepasstes Expressionssystem kloniert werden können (Abbildung 3-33, A). Dabei soll durch die Wahl eines von drei Grundvektoren (Abbildung 3-33, B) der gewünschte Integrationsmodus beim Transfer in das Genom des bakteriellen Wirtes gewählt werden (Abbildung 3-33, C).

Konzeption der *yTREX-Toolbox* als modulares Expressionssystem:

Zusammenfassend konnte mit der *yTREX-Toolbox* ein Expressionssystem entworfen werden, welches aufgrund seiner Anpassbarkeit unterschiedlichste Anforderungen erfüllen kann und dabei eine komfortable Anwendung ermöglichen soll. Dabei bildet die *YT_core*-Sequenz das Grundgerüst, in welches verschiedene genetische Elemente nach standardisierten Verfahren eingebracht werden können. Durch die Auswahl aufeinander abgestimmter Gene, welche als Transkriptionsreporter und Selektionsmarker eingesetzt werden, können diese nach dem Modularitätsprinzip einzeln ausgetauscht werden, um eine hohe Flexibilität zu ermöglichen. Die Wahl einer von drei Varianten des Grundvektors definiert dabei den Integrationsmodus in das bakterielle Genom als ungerichtete Tn5-Transposition, gerichtete Tn7-Transposition und zielgerichteter Integration eines Interposons in die rDNA. Zukünftig kann die *yTREX-Toolbox* so dazu beitragen, die effektive Erzeugung von heterologen Expressionsstämmen weiter zu vereinfachen und gleichzeitig die Anpassbarkeit des Systems an verschiedene Anforderungen der synthetischen Biologie zu erhöhen.

3.3.2 Konstruktion der *y*TREX-*Toolbox*-Vektoren

3.3.2.1 Klonierung und Funktionsvalidierung der *y*TREX-*Toolbox*-Ausgangsvektoren

Um das in Kapitel 3.3.1 geplante *y*TREX-*Toolbox*-System zu klonieren, wurde zunächst die geplante *Toolbox*-Sequenz, welche zwischen den äußeren Genomintegrationssequenzen liegt und die Modularität des Systems ermöglicht, mit dem Programm Clone Manager virtuell entworfen und anschließend Eurofins Genomics mit der Synthese dieser Sequenz beauftragt. Dieses Element wurde mit YT_core benannt (YT: *y*TREX-*Toolbox*, core: Kernelement der Vektorenreihe) und sollte zusammen mit den verschiedenen Genomintegrationssequenzen (Kapitel 3.3.1.3) mit dem Vektorrückgrat des *y*TREX-Vektors, das auf dem γ CP50-poly basiert, kombiniert werden. Aufgrund der Tatsache, dass nur der Integrationsteil des Vektors verändert wird, bleiben alle in diesem Vektorrückgrat vermittelten Eigenschaften erhalten. Das Vektorrückgrat trägt dabei aufgrund seiner γ CP50-poly-Basis einen *E. coli* spezifischen Replikationsursprung aus dem Plasmid pMB1 sowie eine *S. cerevisiae* Replikationseinheit bestehend aus dem Centromer des IV Chromosoms (*CEN4*) sowie der autonom replizierenden Sequenz (*ARS1*) (Domröse, 2016). Es kann also weiterhin mit *S. cerevisiae* durch homologe Rekombination kloniert sowie *E. coli* zur Vervielfältigung des fertigen Vektors genutzt werden.

3.3.2.1.1 Klonierung des Tn5-Ausgangsvektors pYTRW01K_0x5

Für die Klonierung des pYT-Vektors mit Tn5-vermittelter Insertion, wurde die synthetische YT_core-Sequenz durch eine PCR mit den Primern RW001 und RW002 amplifiziert (Tabelle 2-9), wodurch auch die homologen Bereiche zur folgenden Rekombination vermittelt wurden (Kapitel 2.6.2.6). Als *Template* diente der Vektor, pMK-RQ-YT_core. Das resultierende Fragment (759 Bp) wurde durch homologe Rekombination in *S. cerevisia* VL6-48 mit dem hydrolysierten *y*TREX-Vektor kombiniert. Die Rekombination erfolgte über die jeweils endständigen 30 Bp des PCR-Produkts, sowie die dazu homologen, flankierenden Bereiche zu beiden Seiten der ursprünglichen *y*TREX-Kassetten im linearisierten *y*TREX-Vektor, bei denen es sich um die *OE* des Tn5 und die stromaufwärts bzw. stromabwärts liegenden Basen handelte. Aufgrund des Designs des *y*TREX-Vektors und fehlender singulärer Endonukleaseschnittstellen konnte der Vektor nicht unmittelbar an den *OE* Sequenzen hydrolysiert werden. Aufgrund der gewählten Methode der hefevermittelten Rekombination war es allerdings möglich, die Endonukleasen *I-SceI* und *SaII* zu verwenden, sodass ein 665 Bp langer Rest des Tetracyclinresistenzgens sowie einige Basen stromaufwärts der *I-SceI* site im Zuge der homologen Rekombination entfernt werden konnten (Abbildung 3-21, A). Die Rekombinationsstellen des neu klonierten *y*TREX-*Toolbox*-Tn5-Grundvektors (pYTRW01K_0x5) wurden anschließend mit den Primern RW003 und RW004 sequenziert (Tabelle 2-9), sodass das gesamte YT_core Fragment überprüft werden konnte.

Bei der eingehenden Sequenzprüfung wurde festgestellt, dass das in der pYT-Serie kodierte *mob*-Gen eine Verlängerung gegenüber seiner nativen Sequenz bis in den Bereich der YT_core-Sequenz aufwies. Dies wiederum könnte bei Klonierungen innerhalb dieser Sequenz zu einer Verlängerung bis zum nächsten im Leseraster liegenden Stopcodon führen, wodurch die Übertragbarkeit der Plasmide beeinträchtigt sein könnte. Um dies zu verhindern, sollte folgend zuerst das *mob*-Gen rekonstruiert werden (Abbildung 3-21, B), um dessen native Funktion sicherzustellen.

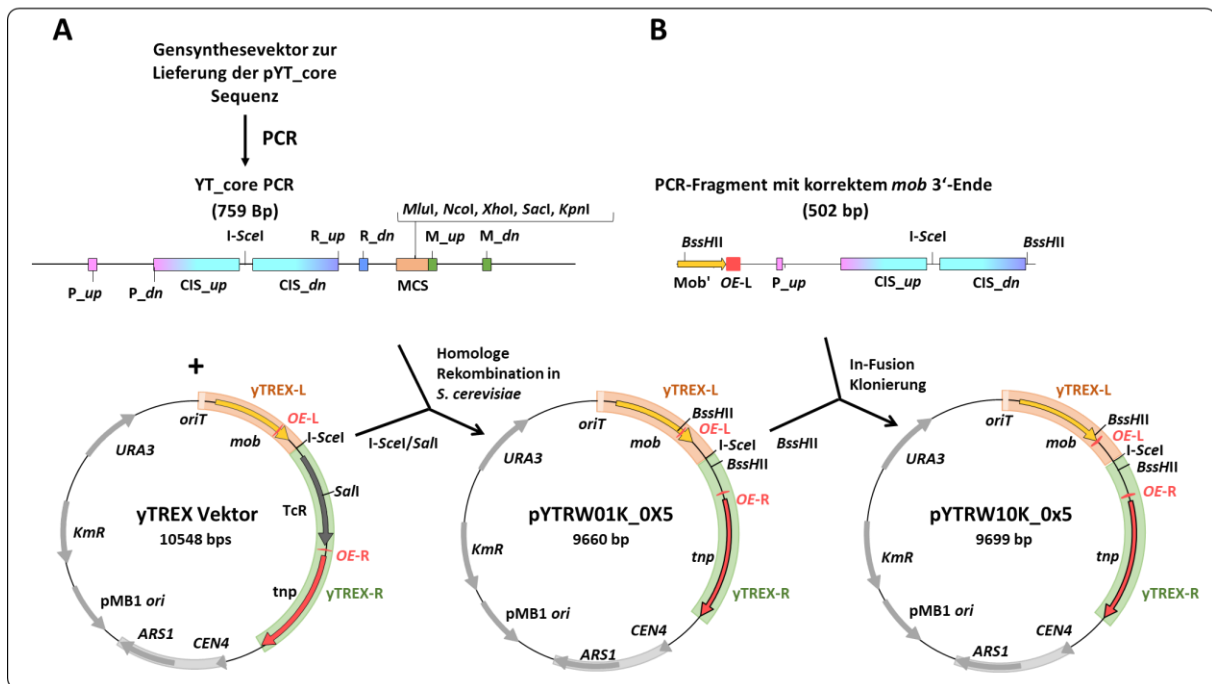


Abbildung 3-21: Klonierung des ersten pYT-Vektors zur Tn5-Transposition und anschließende Rekonstruktion des *mob*-Gens

(A) Zur Klonierung des Vektors pYTRW01K_0X5 wurden der yTREG-Vektor durch I-SceI und SalI hydrolysiert und die integrierende YT_core-Sequenz via PCR amplifiziert. Anschließend erfolgte die homologe Rekombination beider Fragmente in *S. cerevisiae*. Dabei wurden der verbleibende Teil des Tetracyclinresistenzgens, sowie einige Basen stromaufwärts von I-SceI entfernt. (B) Anschließend erfolgte die Rekonstruktion des *mob*-Gens innerhalb des neuen Vektors. Dazu wurde der Vektor pYTRW01K_0X5 mit Hilfe der Endonuklease BssHII hydrolysiert und so ein Teil der YT_core-Sequenz, welcher an das unvollständige *mob*-Gen grenzte, entfernt. Parallel wurde die YT_core-Sequenz mit Primern amplifiziert, welche das ursprüngliche 3'-Ende der *mob*-Sequenz wiederherstellten. Durch die gerichtete Klonierung dieses Fragments mittels In-Fusion Cloning, konnte im resultierenden pYTRW10K_0x5 das *mob*-Gen zu der im Vektor pBBR1-MCS-3 vorliegenden Sequenz rekonstruiert werden. Schematische, nicht maßstabgetreue Darstellung.

3.3.2.2 Rekonstruktion des *mob*-Gens und Evaluation verschiedener Reporter- und Markergene im Rahmen der Bachelorarbeiten von Aileen Funk und Franziska Kofler

Nachdem bei der Sequenzierung des Vektors pYTRW01K_0x5 die Veränderung des *mob*-Gens aufgefallen war, sollte das Gen folgend wieder in seine native Form rekonstruiert werden. Diese Rekonstruktion wurde von Franziska Kofler in der während dieser Doktorarbeit betreuten Bachelorarbeit durchgeführt (Kofler, 2019).

Zunächst wurden die Hintergründe der Verlängerung des *mob*-Gens beleuchtet: Das *mob*-Gen, welches das Mob-Protein kodiert, ist entscheidend bei der Übertragung von Plasmiden per Konjugation und daher ein essenzieller Bestandteil der Funktionsweise aller *γ*TREX-*Toolbox*-Vektorvarianten. Das Gen kodiert dabei ein 329 Aminosäuren langes Relaxaseprotein, welches an den *oriT* eines mobilisierbaren Plasmids bindet und dort durch die Spaltung einer Phosphodiesterbindung einen Einzelstrangbruch (*nick*) und somit einen Ansatzpunkt in der DNA-Sequenz erzeugt, an welchem die Übertragung beginnt (Szpirer et al., 2001). Ein häufig genutztes Mob-Protein stammt aus dem Plasmid pBBR1 aus dem Bakterium *Bordetella bronchiseptica* (Antoine & Locht, 1992). Um bei den *γ*TREX-Vektoren (Domröse et al., 2017) den Transfers durch Konjugation zu ermöglichen, wurde die *mob*-Sequenz des Plasmids pBBR1-MCS-3 (Kovach et al., 1995) verwendet, welches das *mob*-Gen des Vektors pBBR1 enthält (Abbildung 3-22, A). Allerdings wurde bei der Klonierung des Vektors pBBR1-MCS (Kovach et al., 1995), auf welchem der Vektor pBBR1-MCS-3 basiert, das Stopcodon am 3'-Ende der *mob*-Sequenz des Ursprungsvektors pBBR1 abgetrennt und das Gen – vermutlich unbewusst – bis zu einem neuen, im Leseraster liegenden Stopcodon verlängert (Abbildung 3-22, B). Bei der Erzeugung des *γ*TREX-Vektors wurde jedoch nur die im pBBR1-MCS-3 mit dem pBBR1 übereinstimmende Sequenz des *mob*-Gens als relevant betrachtet und übertragen (Domröse et al., 2017). Dies hatte zur Folge, dass das bereits zu diesem Zeitpunkt rekombinante Stopcodon erneut abgetrennt und die native Sequenz des *mob*-Gens erneut bis zum nächsten im Leseraster liegenden Stopcodon verlängert wurde (Abbildung 3-22, C).

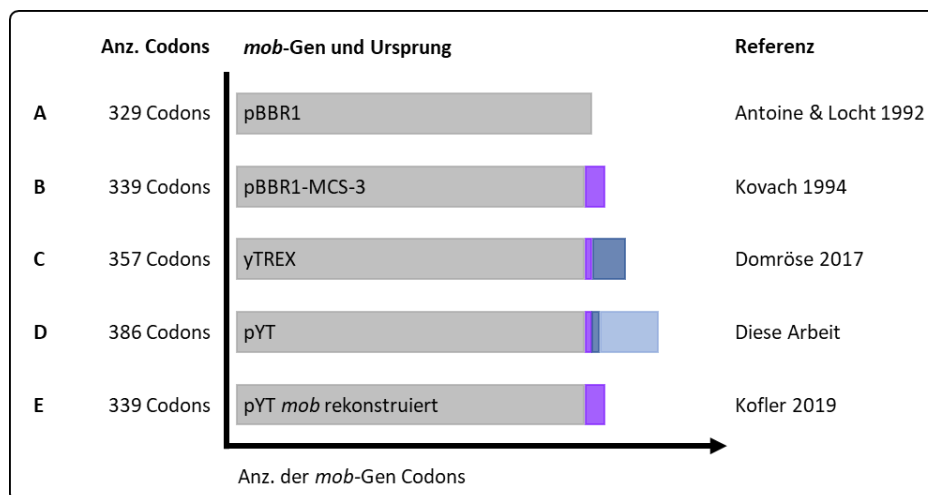


Abbildung 3-22: Gesamtlänge und Codon-Additionen des *mob*-Gens in verschiedenen Arbeiten

(A) Die ursprüngliche Sequenz des *mob*-kodierenden Gens (grau) stammt vom Plasmid pBBR1 aus dem Organismus *Bordetella bronchiseptica*. (B) Mit dem Einfügen einer *multiple cloning site* (MCS) wurde die Gensequenz erstmals am 3'-Ende verlängert (lila Addition). (C) Bei der Konstruktion des *γ*TREX-Vektors wurde die *mob*-Gensequenz des pBBR1-MCS-3 Vektors verwendet, jedoch das Stopcodon nicht mit übertragen und so der offene Leserahmen am 3'-Ende verlängert (blaue Addition). (D) Bei der Konstruktion des *γ*TREX-*Toolbox*-Vektors (pYT) wiederum wurde durch die Verwendung des *γ*TREX-Vektors als Rückgrat zur Klonierung des pYT-Vektors die Sequenz des *mob*-Gens erneut verlängert (hellblaue Addition). (E) Da diese Addition das *mob*-Gen jedoch so weit verlängerte, dass das Stopcodon innerhalb des YT_core in der cluster integration site (CIS) des Vektors lag, wurde darauf aufbauend das *mob*-Gen so rekonstruiert, wie es im pBBR1-MCS-3 Vektor vorliegt, um eine dauerhafte Variabilität des Gens innerhalb des *γ*TREX-*Toolbox*-Systems zu verhindern und dessen Funktionalität sicherzustellen. Schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung.

Sowohl im Fall der Vektoren der pBBR1-MCS Reihe als auch im Fall der γ TREX-Vektoren führten die entstandenen Additionen am 3'-Ende des *mob*-Gens jedoch nicht zu einem Funktionsverlust des Proteins, sodass die Vektoren weiterhin durch Konjugation mobilisierbar waren (Domröse et al., 2017; Szpirer et al., 2001).

Im Fall beider Vektorserien liegt das rekombinante Stopcodon jedoch vor der zur Integration weiterer DNA-Sequenzen vorgesehenen Stelle im Vektor (MCS- bzw. CIS-Sequenz), wodurch das Mob-Protein bei einer DNA-Integration nicht erneut verändert wird.

Im Fall des neu erstellten pYT-Vektors wäre dagegen eine erneute Sequenzveränderung des *mob*-Gens bei einer Genintegration möglich. Daher wurde die *mob*-Sequenz des erprobten Vektors pBBR1-MCS3 (Kovach et al., 1995) rekonstruiert (Abbildung 3-22, E). Die Übertragbarkeit des daraus resultierenden Plasmids pYTRW10K_0x5 (Abbildung 3-21, B) konnte anschließend mehrfach gezeigt werden (Kofler, 2019). In diesem liegt das Stopcodon des *mob*-Gens nun wieder vor der YT_core-Sequenz der γ TREX-*Toolbox*-Vektoren und behält so, unabhängig von weiteren Klonierungen seine ursprüngliche Sequenz und Funktionalität. Der Vektor stellte somit den Ausgangspunkt der pYT-Vektorserie mit Insertionssequenzen des Transposon Tn5 dar.

3.3.2.2.1 Funktionalitätsnachweis der Resistenzmarker

Zum Aufbau einer pYT-Vektorbibliothek wurde zunächst die Funktionalität der verschiedenen Selektionsmarkergene in den neuen pYT-Vektoren *in vivo* überprüft. Diese Evaluation wurde in einer weiteren im Rahmen dieser Doktorarbeit betreuten Bachelorarbeit von Aileen Funk (Funk, 2018) durchgeführt. Einige der Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

Zur Evaluation der Anwendbarkeit der pYT-Vektoren und der Klonierung mit Hilfe der vorgesehenen Rekombinationssequenzen (Kapitel 3.3.1.2) wurden die ausgewählten Resistenzgene an der dafür vorgesehenen Position (*Sall*) in den Tn5-Grundvektor pYTRW10K_0x5 kloniert. So wurde zunächst ein Set an Vektoren erstellt, welche die Gene zur Vermittlung der Resistenzmechanismen gegen die Antibiotika Tetracyclin, Gentamicin, Chloramphenicol und Streptomycin trugen, deren grundsätzliche Funktionalität in *P. putida* KT2440 bereits gezeigt werden konnte (Domröse et al., 2019, 2017; Klein et al., 2017; Prentki & Krisch, 1984). Eine Validierung anhand des Wachstums von transformierten *E. coli* DH5 α -Zellen mit den erzeugten γ TREX-*Toolbox*-Vektoren pYTRW07K_0G5 (Gm^R), pYTRW08K_0C5 (Cm^R), pYTRW09K_0T5 (Tc^R), und pYTRW10K_0x5 (keine Transposonresistenz) bestätigte die Funktionalität der Resistenzmarker in der pYT-Serie (Funk, 2018) (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Resistenzeigenschaften von *E. coli* DH5 α -Zellen mit verschiedenen pYT-Vektoren

Die Transformanten wurden über Nacht bei 37 °C auf Kanamycin-, tetracyclin-, gentamicin-, chloramphenicol-, bzw. streptomycinhaltigen Agarplatten kultiviert und die Ergebnisse tabellarisch aufgetragen. Alle Transformanten zeigten das erwartete Muster mit einer immer vermittelten Kanamycinresistenz aufgrund des Vektorrückgrats und einer spezifischen vermittelten Resistenz durch das jeweils innerhalb des Transposons liegende, unterschiedliche Resistenzgen in den Vektorvarianten (Funk, 2018).

Antibiotikum <i>E. coli</i> DH5 α	Kanamycin	Tetracyclin	Gentamicin	Chloramphenicol	Streptomycin
pYTRW10K_0x5	Resistent	---	---	---	---
pYTRW09K_0xT5	Resistent	Resistent	---	---	---
pYTRW07K_0xG5	Resistent	---	Resistent	---	---
pYTRW08K_0xC5	Resistent	---	---	Resistent	---
pYTRW11K_0xS5	Resistent	---	---	---	Resistent

Es konnte damit erfolgreich sowohl die Funktionalität der ausgewählten Selektionsmarkergene überprüft als auch die in der Konzeption angestrebte, gute Parallelisierbarkeit der Klonierungen unter Verwendung der dafür vorgesehenen Sequenzen in der YT_core-Sequenz bestätigt werden.

3.3.2.2 Evaluation der verschiedenen Reporterproteine

Nach der erfolgreichen Prüfung der Resistenzmarker sollten nun die Gensequenzen einiger im Rahmen der Konzeption beschriebenen Transkriptionsreporter (Kapitel 3.3.1.1) in die verschiedenen *Toolbox*-Vektoren integriert und deren Funktionalität analysiert werden. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse stellen einen weiteren Teil der Bachelorarbeit von Franziska Kofler (Kofler, 2019) vor. Zur Analyse der Reporterenzyme wurden hier die β -Galactosidase (LacZ) und die Polyesterhydrolase (PE-H) sowie zur Darstellung der fluoreszierenden Transkriptionsreporter die Fluoreszenzproteine eYFP und mCherry ausgewählt. Zur Integration der Reportergene wurde der Vektor pYTRW07K_0G5, welcher die Gentamicinresistenz vermittelt, verwendet. Die Klonierung erfolgte an der dafür vorgesehenen Stelle der YT_core-Sequenz (*MauBI*) (Kapitel 3.3.1.2). Die LacZ bzw. PE-H-exprimierenden Klone sollten in geeigneten Assays visuell identifiziert werden, während mit Hilfe der Fluoreszenzproteine sowohl eine visuelles als auch ein FACS-Screening Verfahren demonstriert werden sollte (Francisco et al., 1993; Leary et al., 1996).

Nach der Übertragung der entsprechenden γ TREX-*Toolbox*-Vektoren pYTRW16K_1G5 (Gm^R , *eYFP*), pYTRW13K_3G5 (Gm , *mCherry*), pYTRW14K_7G5 (Gm , *LacZ*) und pYTRW17K_6G5 (Gm , *PE-H*) in den Expressionswirt *P. putida* KT2440 und die folgende Tn5-Transposition an einer zufälligen Stelle des Wirtsgenoms erfolgte die Validierung der Reporter.

Die enzymatische Aktivität der β -Galactosidase wurde durch X-Gal Hydrolyse als Blaufärbung von exprimierenden *P. putida*-Klonen angezeigt (Abbildung 3-23, A); im Fall der Polyesterhydrolase durch die Bildung von Klärhöfen aufgrund der Hydrolyse von Impranil (Abbildung 3-23, B). Die Detektion der Fluoreszenz in einzelnen transposontragenden Klonen erfolgte anhand der Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge, entweder während eines manuellen Plattenscreenings oder automatisiert während eines *FACS*-Screenings. Auch hier konnten sowohl beim manuellen (Abbildung 3-23 D), als auch beim automatisierten *FACS*-Screening fluoreszierende Klone detektiert und gesammelt werden (Abbildung 3-23, E bzw. F), sodass die Funktionalität aller gewählten Reporter in *P. putida* gezeigt werden konnte (Kofler, 2019).

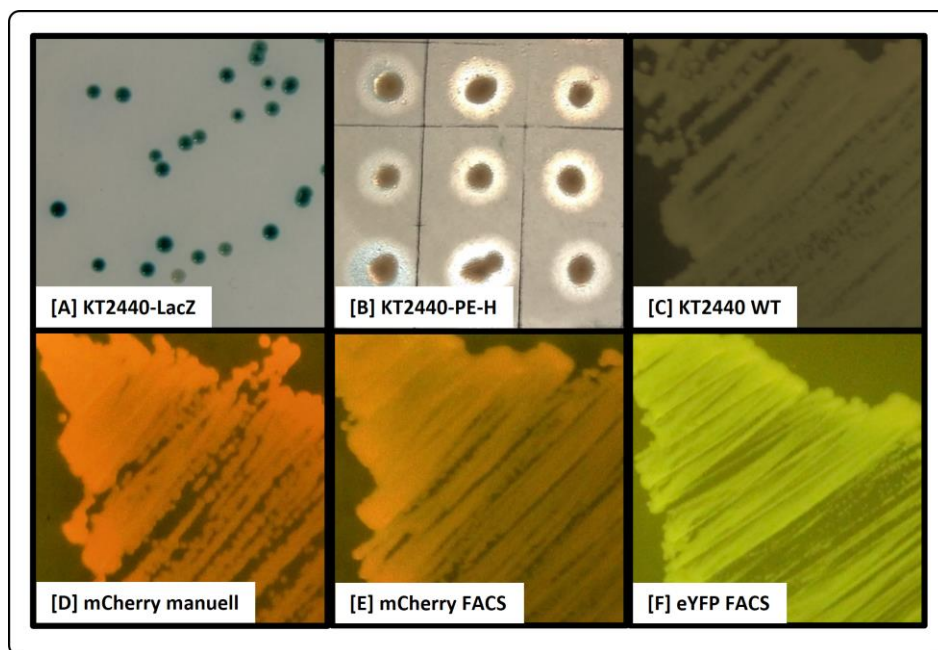


Abbildung 3-23: *P. putida*-Phänotypen nach pYT-vermittelter Tn5-Transposition verschiedener Transkriptionsreportergene Bei den gezeigten Einzelklonen und Ausstrichen handelt es sich jeweils um einzelne Transkonjuganten, die durch den Transfer der Vektoren pYTRW14K_7G5 (Gm^R , *lacZ*), pYTRW17K_6G5 (Gm^R , *PE-H*), pYTRW13K_3G5, (Gm^R , *mCherry*) und pYTRW16K_1G5 (Gm^R , *eYFP*) und anschließende Tn5-Transposition in *P. putida* KT2440 erzeugt wurden (Kofler 2019). Im Fall der beiden Reporterenzyme ist deren Aktivität durch die blaue Färbung der Klone (*lacZ* Expression, (A)) und durch die Bildung von Klärhöfen (*PE-H* Expression, (B)) deutlich zu erkennen. Im Fall der Fluoreszenzreporter ist als Referenz ein *P. putida* KT2440 Wildtyp im Anregungslicht dargestellt, welcher keine Fluoreszenz aufweist (C). Die fluoreszierenden Klone wurden anhand des Screenings von Agarplatten unter Belichtung und visuelle Beurteilung sowie manuelles Picken der Klone (*mCherry* Expression, (D)) oder durch Verwendung eines *FACS*-Geräts isoliert (*mCherry* Expression, (E); *eYFP* Expression, (F)) Die Platte wurde zur Anregung der Fluoreszenzproteine mit Licht eines Wellenlängenspektrums von 480 – 530 nm bestrahlt.

Es konnte somit erfolgreich die Nutzung verschiedener Reporterproteine zur Detektion der Transkription eines pYT-Tn5-Transposons demonstriert werden. Im Zuge dessen wurde die Parallelisierbarkeit standardisierter Klonierungsverfahren zur zügigen Erstellung neuer pYT-Konstrukte bestätigt. Dabei wurde weiterhin mit Hilfe verschiedener agarplattenbasierter Screeningmethoden die Aktivität der ausgewählten Reporter in einzelnen exprimierenden *P. putida* KT2440-Klonen nachgewiesen. Die FACS-Methode ermöglichte zudem eine wesentlich schnellere und automatisierte Sortierung der Zellen.

Konstruktion der yTREG-Toolbox-Vektoren:

Zusammenfassend konnten aufbauend auf der Konzeption der flexiblen yTREG-Toolbox erfolgreich die ersten Vektoren einer pYT-Vektorbibliothek erzeugt werden. Dabei wurden sowohl mögliche Probleme bei der Konjugation identifiziert und beseitigt als auch verschiedene Selektionsmarkergene in die Vektoren kloniert und auf ihre Funktionalität überprüft. Zudem konnten unterschiedliche Reportergene mit dem neuen System exprimiert, die produzierten Proteine in verschiedenen Tests nachgewiesen und dabei geeignete Screeningmethoden geprüft werden, die insbesondere für die Tn5-Anwendung von Bedeutung sind. Die grundsätzliche Funktionalität dieser Transkriptionsreporter konnte so bestätigt werden. Am Beispiel der Fluoreszenzreporter konnten zudem zwei Screeningansätze demonstriert werden, die zeigen, dass sowohl ein händisches wie auch ein automatisiertes Durchmusterungsverfahren von transposontragenden Klonen möglich ist.

3.3.3 Erzeugung von Stämmen und Vektoren zur gezielten rDNA-Integration

3.3.3.1 Konstruktion von Elementen zur gezielten Genintegration in die *rrn*-Operons

Die pYT-basierte Genintegration mittels Tn5-Transposition konnte mit den beschriebenen, etablierten Vektoren (Kapitel 3.3.2.1) bereits unmittelbar erfolgen. Um jedoch die gezielte Genintegration in das 16S-Gen eines der sieben *rrn*-Operons im *P. putida* KT2440 Genom (Kapitel 3.3.1.5) mittels eines pYT-Vektors zu ermöglichen, mussten einige vorbereitende Schritte durchgeführt werden. Die genomische Integration sollte hierbei durch homologe Rekombination realisiert werden. Eine Rekombination über die 16S-Gensequenzen würde jedoch aufgrund der sehr starken Homologie der *rrn*-Operons dazu führen, dass eine Integration ungerichtet in ein zufälliges *rrn*-Operons stattfindet. Um auszuschließen, dass ein Gencluster, welches in ein bestimmtes *rrn*-Operon integriert werden sollte, auch in die anderen Operons integrieren kann, musste daher in einem ersten Schritt dafür gesorgt werden, dass die Sequenzen der *rrn*-Operons sich stärker voneinander unterscheiden.

Um dies zu gewährleisten, wurde folgende Strategie gewählt: Es sollten artifizielle DNA-Sequenzen (folgend als 16S *landing site* bezeichnet) in jeweils eines der *rrn*-Operons integriert werden. Bei diesen handelt es sich um zwei zufällig generierte DNA-Sequenzen (LP_L und LP_R, kurz für *landing pad*), welche ein Gentamicinresistenzgen (Gm^R) erfassen, wodurch auf deren Integration selektiert werden kann. Durch die Integration dieser 16S *landing site* lässt sich in den entstandenen Stämmen ein *rrn*-Operon, welches die Sequenz trägt, eindeutig von den anderen unterscheiden und zur zielgerichteten Integration eines Genclusters nutzen. Die Genclusterintegration soll dabei durch homologe Rekombination zwischen einem entsprechenden pYT-Vektor und den im Genom eingebrachten 16S *landing pads* erfolgen. Im pYT-Vektor wird dabei die YT_core-Sequenz von den artifiziellen 16S *landing pad* Sequenzen flankiert. Bei dem Vorgang der homologen Rekombination mit diesen Sequenzen wird in diesen Stämmen dabei die Gm^R entfernt und durch die innerhalb der YT_core-Sequenz liegende variable Resistenz (Kapitel 3.3.1.1.3) ersetzt.

Um dies zu ermöglichen, wurden zunächst sieben *P. putida* KT2440-basierte Stämme erzeugt, in denen jeweils ein spezifisches *rrn*-Operon durch die Integration der 16S *landing site* markiert war.

3.3.3.2 Klonierung des 16S-rDNA-*landing site* Integrationsvektors

Zur Erzeugung von sieben, sich in den *rrn*-Sequenzen des 16S-Gens unterscheidenden, Stämmen wurde ein Vektor kloniert, der die 16S *landing site* Sequenz und zusätzlich homologe Bereiche zu den *rrn*-Operon Sequenzen trug. Diese dienten dazu, die 16S *landing site* Sequenz mittels homologer Rekombination in die verschiedenen *rrn*-Operons zu integrieren (Abbildung 3-24).

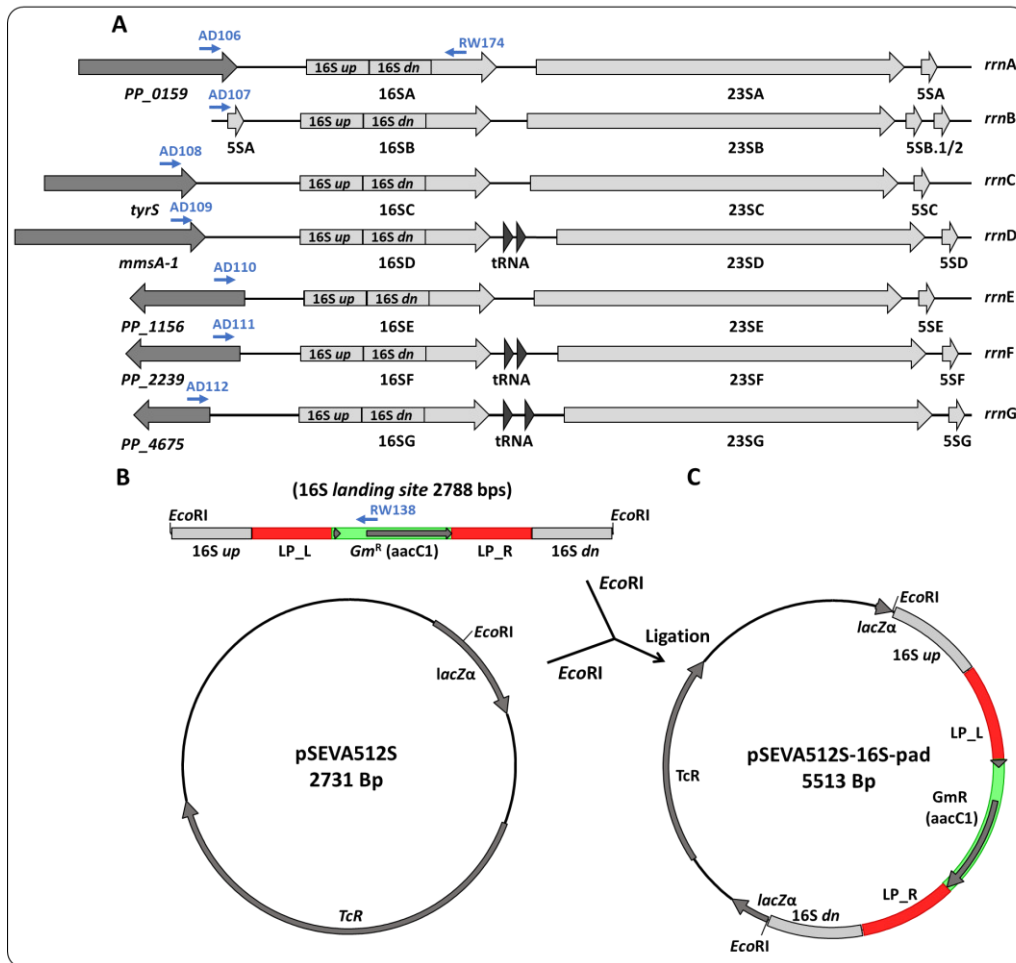


Abbildung 3-24: Klonierung eines Vektors zur Integration der 16S landing site in *P. putida* rrn-Operons

(A) In jedem *rrn*-Operon von *P. putida* KT2440 sind die homologen Regionen, die zur Integration der 16S landing site genutzt werden, durch die Bezeichnung 16S up/dn hervorgehoben. Die Primer, welche zur Sequenzierung genutzt wurden, sind jeweils durch blaue Pfeile gekennzeichnet. (B) Isolierung der 16S landing site Sequenz aus dem Synthesektor und Linearisierung des Vektors pSEVA512S jeweils mit der Endonuklease *Eco*RI. (C) Ligation der 16S landing site und des Vektors pSEVA512S zum Vektor pSEVA512S-16S-pad, welcher zur Integration in die rDNA genutzt werden konnte. Die 16S landing site besteht dabei aus den zum 16S-Gen in den *rrn*-Operons homologen Bereichen (16S up/dn), welche zur genomischen Integration nötig sind. Außerdem beinhaltet sie die beiden künstlichen Sequenzen (LP_L/R), welche ein Gentamicinresistenzgen (*Gm^R*) beidseitig flankieren und später zur Integration eines Genclusters von einem pYT-Vektor aus in ein gewünschtes *rrn*-Operon genutzt werden sollen. Schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung.

Bei der Planung dieses Vektors wurden zuerst die zufälligen DNA-Sequenzen LP_L und LP_R generiert, welche später in den markierten *rrn*-Operons vorliegen sollten, um diesen eine Singularität auf Sequenzebene zu verleihen. Die 500 Bp langen Sequenzen wurden dafür mit Hilfe der *Sequence Manipulation Suite* generiert und der GC Gehalt auf 50 % festgelegt (Kapitel 2.3.2.1). Anschließend wurde mit Hilfe des Programms Clone Manager die 16S landing site virtuell erstellt, in der die beiden künstlichen Sequenzen LP_L und LP_R das Gentamicinresistenzgen beidseitig flankieren. Um eine Integration dieses Konstrukts in jedes *rrn*-Operon im *P. putida* KT2440 Genom zu ermöglichen, wurde nach einem Vergleich aller sieben *rrn*-Operons miteinander eine 1000 Bp lange Sequenz, beginnend ca. 630 Bp hinter dem *rrn*-Operon Promotor (P1), ausgewählt, welche in nahezu allen Operons identisch zueinander war und so eine Integration in jedem Operon an der gleichen Stelle ermöglichen sollte (Abbildung 3-24, A).

Diese Sequenz wurde in der Mitte geteilt, sodass zwei 500 Bp lange Sequenzen entstanden (16S *up* und 16S *down*). Zwischen diese Sequenzen wurde die 16S *landing site* Sequenz so eingefügt, dass eine Integration der Sequenz durch homologe Rekombination nur in der Orientierung möglich ist, in der das Gentamicinresistenzgen in Leserichtung des *rrn*-Operons liegt. Um zu gewährleisten, dass die spätere Integration eines Genclusters relativ nah hinter dem P1 eines spezifischen *rrn*-Operons erfolgt, wurde die Sequenz zur Integration der 16S *landing site* möglichst nah stromabwärts von diesem gewählt. Nach der Integration eines Genclusters liegt die YT_core-Sequenz so immer im Abstand von 1130 Bp zum P1 eines spezifischen *rrn*-Operons. Durch diesen definierten Abstand ist gewährleistet, dass aufgrund der ebenfalls definierten Größe der YT_core-Sequenz ein dort integriertes Gencluster immer einen Abstand von 1395 Bp zum P1 der *rrn*-Operons aufweist. Diese Position im 16S-Gen wurde gewählt, da die Untersuchungen von Domröse et al., 2019 zeigten, dass eine Integration in diesem Bereich eine besonders starke Expression des integrierten Genclusters ins *rrn*-Operon A ermöglicht. Die Untersuchungen zeigten zudem, dass eine kürzere Distanz zum *rrn*-Promotor meistens mit einer höheren Expressionsleistung einhergeht. Der höchste Produktionstiter wurde im Zuge dieser Evaluation von einem Stamm erreicht, in dem das TREX-Transposon 230 Bp stromabwärts des P1 integriert wurde, wodurch das Startcodon des *pig*-Genclusters 2151 Bp hinter dem *rrn*-P1 lag (Domröse et al., 2019). Der bei der Integration der 16S *landing site* erreichte Abstand zum P1 des jeweiligen *rrn*-Operons liegt dabei nur 379 Bp weiter stromabwärts der Integrationsstelle des TREX-Transposons, welches von (Domröse, 2016) beschrieben wird, allerdings liegt das Startcodon eines integrierten Genclusters durch die kürzere YT_core-Sequenz, im Vergleich zum TREX-Transposon, mit einem Abstand von rund 1,4 Kb sogar näher am P1 des *rrn*-Operons. Die etwas größere Distanz der 16S *landing site* Integrationsstelle zum P1 war notwendig, da durch die Integrationsmethode mit Hilfe der homologen Rekombination erst dort ein ausreichend großer homologer Bereich stromaufwärts des Integrationsbereichs vorlag, der innerhalb aller *rrn*-Operons gleich war. Um die Klonierung des 16S *landing site* Vektors zu ermöglichen, wurden sowohl am 5'-, als auch am 3'-Ende der Sequenz Schnittstellen der Endonuklease *EcoRI* angefügt. Die so virtuell erzeugte Sequenz der 16S *landing site* mit ihren zu den *rrn*-Operons homologen Bereichen (Abbildung 3-24, B) wurde anschließend als Gensynthese beauftragt. Anschließend wurde der Synthesektor pEX-K248-16S-up-CIS-A-PGm+GmR-EcoRV-CIS-B-16S-dwn durch *EcoRI* hydrolysiert, sodass die 16S *landing site* mit den flankierenden 16S-Sequenzen als lineares DNA-Fragment vorlag. Parallel wurde der Zielvektor pSEVA512S mit *EcoRI* linearisiert. Im Anschluss erfolgte die Ligation (Kapitel 2.6.1.3) der beiden Fragmente zum Vektor pSEVA512S-16S-up-CIS-A-PGm+GmR-EcoRV-CIS-B-16S-dwn (im Folgenden: pSEVA512S-16S-pad) (Abbildung 3-24, B). Somit stand der Vektor für die nachfolgende Integration der 16S *landing site* durch homologe Rekombination in *P. putida* KT2440 zur Verfügung.

3.3.3.3 Integration der 16S landing site in die *P. putida* *rrn*-Operons

Um die 16S landing site in die verschiedenen *rrn*-Operons zu integrieren, wurde der Vektor pSEVA512S-16S-pad durch Konjugation in wildtypische *P. putida* KT2440-Zellen übertragen. Da der genutzte Vektor aufgrund des Fehlens eines kompatiblen *ori* nicht von *P. putida* repliziert werden kann, lag der Vektor nach der Konjugation als *suicide* Vektor vor (Martínez-García et al., 2015). Innerhalb der Zellen in die das Plasmid übertragen wurde, konnte so die homologe Rekombination zwischen den Sequenzen des Vektors (16S *up/down*) und den nativen Sequenzen innerhalb der 16S-*rrn*-Sequenz im *P. putida*-Genom stattfinden, ohne dass das Plasmid repliziert werden konnte (Wyman et al., 2004) (Abbildung 3-25).

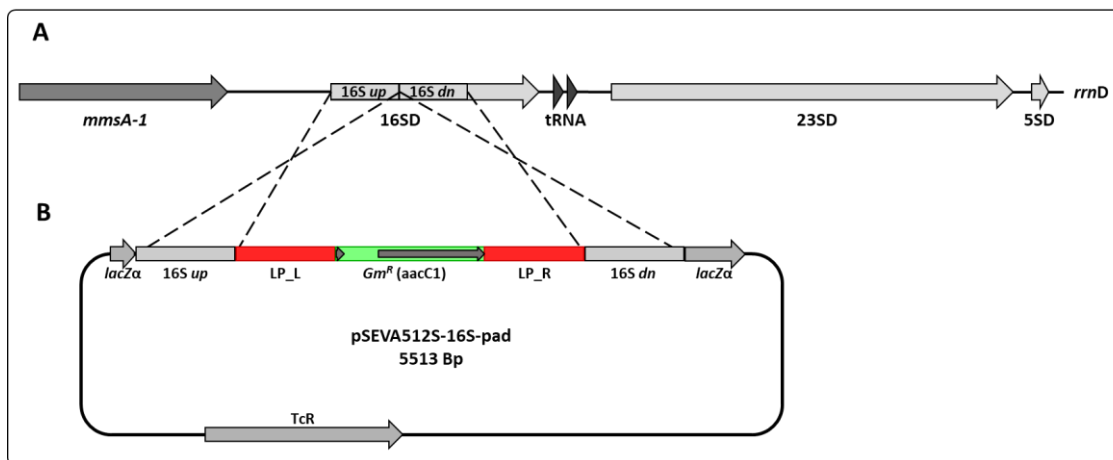


Abbildung 3-25: Integration der 16S landing site in *P. putida* *rrn*-Operons am Beispiel des *rrn*-Operons D

(A) Nach dem Einbringen des Vektors pSEVA512s-16S-pad in die *P. putida* KT2440 Zellen erfolgte die Integration der 16S landing site in die *rrn*-Operons durch homologe Rekombination, hier am Beispiel des *rrn*-Operons D dargestellt. Der Ausschnitt des *P. putida*-Genoms zeigt das *rrn*-Operon D mit dem 16S- und dem 23S-Gen sowie die umliegenden Gene. (B) Am Anfang der Sequenz der 16S-rDNA sind die Bereiche gekennzeichnet (16S *up/dn*) zu denen die 16S *up* und *dn* Flanken des 16S landing site tragenden Vektors homolog sind. Mit diesen erfolgt nach dem natürlichen Mechanismus der homologen Rekombination die Integration der artifiziellen Sequenzen (LP_L/R), die somit dieses *rrn*-Operon spezifisch markieren, sowie des Gentamicinresistenzgens (*Gm^R*), zur Selektion der Stämme, welche die 16S landing site im Genom tragen.

Um folgend festzustellen, welche Klone die 16S landing site korrekt integriert hatten, wurden 2208 Klone mit Hilfe eines QPix Pickroboters zuerst auf tetracyclin- und irgasan- und anschließend erneut auf gentamicin- und irgasanhaltige Omnitray-Agarplatten überimpft. Dieses Replikaplattieren der erhaltenen Transkonjuganten zeigte diejenigen Klone an, bei denen die 16S landing site durch ein *double crossover* Event in eines der sieben *rrn*-Operons integriert wurde, da sie ausschließlich gegen Gentamicin resistent waren und daher nicht auf den tetracyclinhaltigen Platten wachsen konnten. Durch ein unerwünschtes *single crossover* Event hätten die Transkonjuganten dagegen neben dem Gentamicinresistenzgen auch das Tetracyclinresistenzgen integriert, da durch die Rekombination mit nur einem der homologen Bereiche auch das gesamte Vektorrückgrat inklusive dem Tetracyclinresistenzgen ins *P. putida*-Genom integriert worden wäre. Mit dieser Methode konnten aus den 2208 Klonen 92 identifiziert werden, bei denen die 16S landing site durch ein *double crossover* in eines der sieben *rrn*-Operons integriert wurde.

Anschließend erfolgte ein PCR-Screening, um aus den Stämmen mit verifiziertem *double crossover* sieben Stämme zu identifizieren, bei denen jeweils eines der *rrn*-Operons durch die 16S *landing site* spezifisch markiert wurde. Dazu mussten spezifische Test-PCRs mit der gDNA jedes Stamms durchgeführt werden (Abbildung 3-26). Es wurde jeweils einer von sieben vorwärts (*fw*) Primern verwendet, die spezifisch vor je einem definierten Operon binden (AD106-AD112) und ein rückwärts (*rev*) Primer, der innerhalb der 16S *landing site* im Gentamicinresistenzgen bindet (RW138) (Tabelle 2-9) (Abbildung 3-24, A).

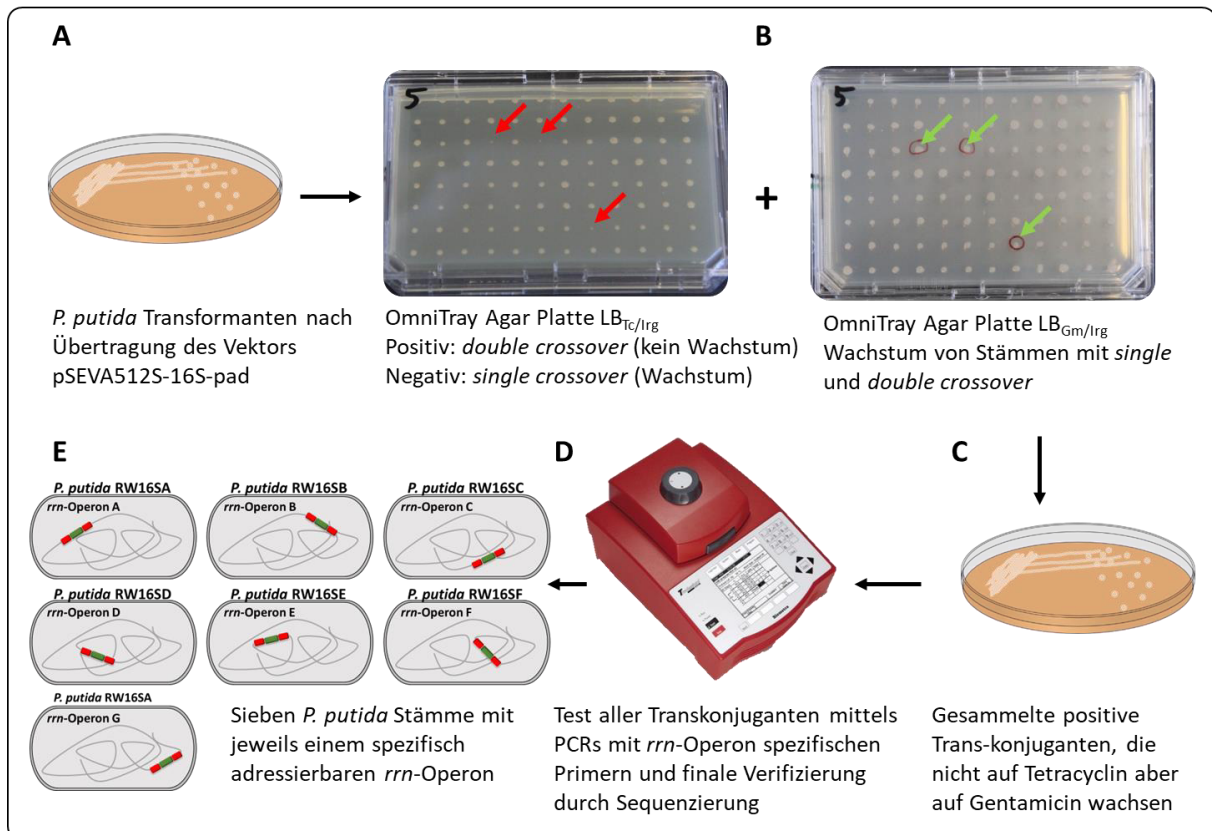


Abbildung 3-26: Schematischer Arbeitsablaufs zur Identifizierung von sieben *P. putida*-Stämmen mit individueller 16S *landing site* Markierung

(A) Nach der Übertragung der Plasmids pSEVA512S-16S-pad wurden die Transkonjuganten auf Agarplatten mit Gentamicin und Irgasan ausplattiert und inkubiert. (B) Anschließend wurden 2208 Klone mit Hilfe eines Pickroboters erst auf Agarplatten mit Tetracyclin/Irgasan und anschließend auf solchen mit Gentamicin/Irgasan replikaplattiert. (C) Die Platten wurden miteinander verglichen und die Klone gesammelt, welche auf gentamicin/irgasan-, nicht aber auf tetracyclin/irgasanhaltigem Agar wachsen konnten und bei denen es sich somit wahrscheinlich um *double crossover* Stämme handelte. (D) Anschließend wurden diese Klone durch verschiedene PCR-Tests auf die Integration der 16S *landing site* in ein spezifisches *rrn*-Operon untersucht. Nach diesem ersten Test wurde jeweils ein Stamm ausgewählt und das PCR-Produkt der Integrationsstelle sequenziert. (E) Mit diesem Arbeitsablauf wurden sieben *P. putida*-Stämme identifiziert, in denen jeweils ein spezifisches *rrn*-Operon mit der 16S *landing site* markiert ist und somit spezifisch adressiert werden kann.

Mit dieser Methode wurden alle 92 Stämme in *colony* PCRs getestet. Ein entstehendes Produkt einer Größe zwischen 1724 Bp und 2031 Bp zeigte spezifisch die Stämme an, bei denen die *16S landing site* in das durch den vorwärts Primer definierte *rrn*-Operon integriert wurde. Die getesteten Stämme konnten so jeweils den verschiedenen *rrn*-Operons zugeordnet werden, welche durch die *16S landing site* markiert wurden. Innerhalb der 92 Stämme mit *double crossover* konnten dabei neun Stämme identifiziert werden, die die *16S landing site* in *rrn*-Operon A trugen, 5 in Operon B, 11 in Operon C, 7 in Operon D, 8 in Operon E, 16 in Operon F und 11 in Operon G. Alle verbleibenden Stämme mit vermeintlichem *double crossover* (25 Stämme) konnten keinem Operon zugeordnet werden. Aus den positiv getesteten Stämmen wurde jeweils einer ausgewählt.

Zur Verifizierung der ausgewählten Stämme wurde zudem deren gDNA extrahiert, um die PCRs zur Identifizierung des *rrn*-Operons, in welches die *16S landing site* integriert wurde, zu wiederholen. Nach dieser Bestätigung der Integration wurde die Integrationsstelle innerhalb der *rrn*-Operons sowie die eingebrachte Sequenz zusätzlich sequenziert. Dazu wurden die Sequenzen der *rrn*-Operons welche die *16S landing site* tragen mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde dazu mit einer Kombination aus den jeweils spezifischen *rrn*-Operon vorwärts Primern (AD106-AD112), sowie einem rückwärts Primer (RW174) erzeugt (Tabelle 2-9), welcher stromabwärts der eingebrachten *landing site* im homologen Bereich des 16S-Gen bindet (Abbildung 3-24,A). Die resultierenden DNA-Fragmente hatten eine Größe von 2838 Bp bis 3145 Bp und deckten den gesamten Bereich der *16S landing site* ab. Die DNA-Fragmente wurden anschließend sequenziert, wo mit den Sequenzierungsprimern RW196(2) und RW197 jeweils die LP_L und LP_R vollständig bestätigt wurden.

Die korrekt erzeugten *P. putida*-Stämme zur gezielten Integration genetischer Elemente in ein gewähltes *rrn*-Operon im Zuge der *yTRES-Toolbox*-Anwendung wurden abschließend mit *P. putida* RW16SA (markiertes *rrn*-Operon A) bis *P. putida* RW16SG (markiertes *rrn*-Operon G) benannt.

3.3.3.4 Klonierung eines pYT-Vektors zur 16S-rDNA-Integration

Nach der erfolgreichen Erzeugung der *P. putida*-Stämme mit individuell markierten *rrn*-Operons (Kapitel 3.3.3.3) wurde abschließend ein pYT-Vektor kloniert, der es ermöglichen soll, die YT_core-Sequenz gezielt in die *16S landing site* dieser Stämme zu integrieren. Dieser Vektor wurde auf Basis des Vektors pYTRW09K_OT5 erstellt, welcher bereits das Tetrazyklinresistenzgen enthielt. Alle zur Klonierung notwendigen Fragmente des neuen Vektors wurden dazu mittels PCR amplifiziert (Abbildung 3-27).

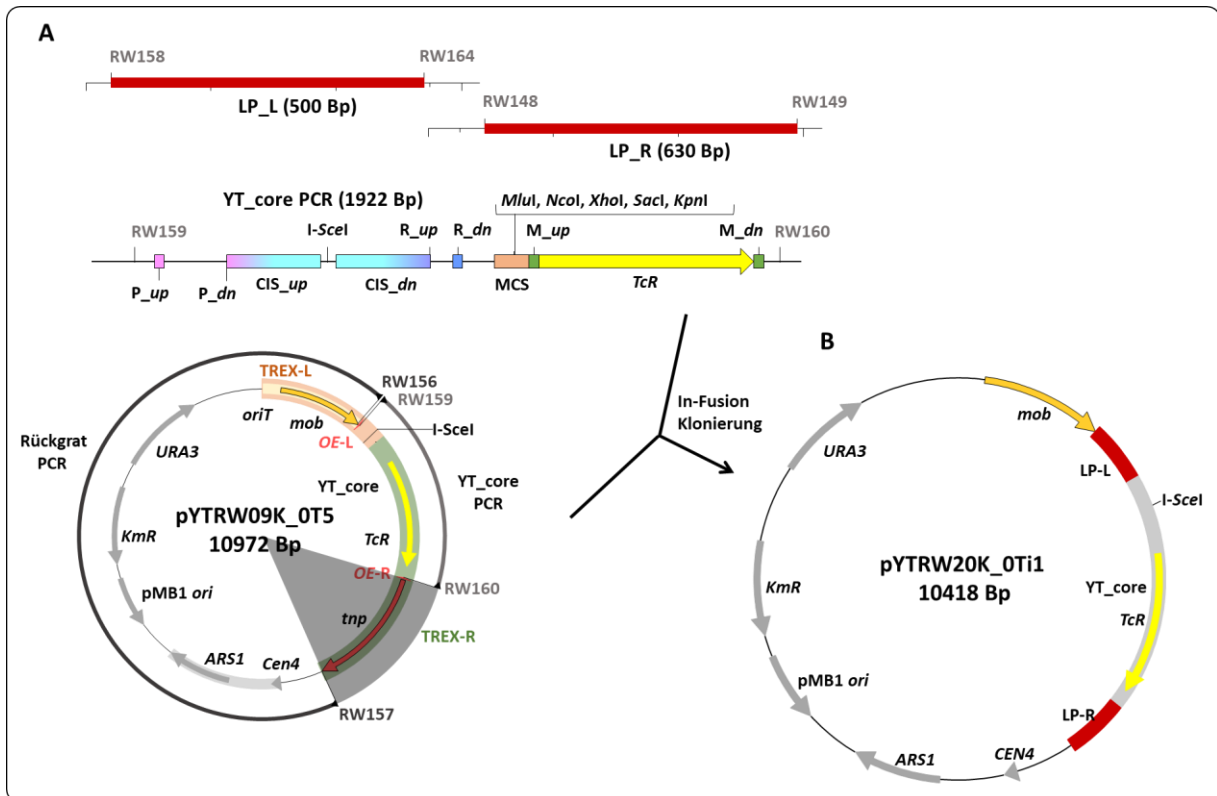


Abbildung 3-27: Klonierung eines pYT-Vektors zur chromosomalen Genintegration in die 16S landing site

(A) Zur Klonierung des Vektors pYTRW20K_OTi1 wurden alle Fragmente *via* PCR amplifiziert. Zur Amplifikation der YT_core-Sequenz, wie auch zur Amplifikation des Vektorrückgrats wurde der bestehende Vektor pYTRW09K_OT5 als *Template* verwendet. Der ausgegraute Teil entspricht dem Tn5-Transposasegen, welches nicht amplifiziert wurde. Die beiden *landing pads* (LP_L/R) wurden ausgehend vom Synthesektor pEX-K248-16S-up-CIS-A-PGm+GmR-EcoRV-CIS-B-16S-dwn amplifiziert. (B) Durch eine Klonierung mit dem In-Fusion Cloning Kit wurde schließlich der erste pYT Vektor zur 16S-Integration aus 4 Fragmenten assembliert. Schematische, nicht maßstabgetreue Darstellung.

Die LP_L und die LP_R Sequenz wurden mit den Primern RW158/RW164 bzw. RW148/149 amplifiziert (Tabelle 2-9) (Abbildung 3-27, A). Als *Template*-DNA wurde der Synthesektor pEX-K248-16S-up-CIS-A-PGm+GmR-EcoRV-CIS-B-16S-dwn genutzt. Um die YT_core-Sequenz ohne angrenzende OEs zu amplifizieren, wurden die Primer RW159 und RW160, sowie der Vektor pYTRW09K_OT5 als *Template*-DNA verwendet. Auch das Vektorrückgrat wurde auf Basis dieses Vektors mit dem Primerpaar RW156/RW157 amplifiziert (Abbildung 3-27, B). Durch die Wahl des genannten *Template*-Vektors, befand sich damit schon ein Resistenzgen in der YT_core-Sequenz, womit der entstehende Vektor sofort in den erzeugten Stämmen *P. putida* RW16SA-RW16SG anwendbar war. Sollte später ein anderes Resistenzgen benötigt werden, ist dieses aufgrund des yTREG-Toolbox-Konzepts (Kapitel 0) leicht austauschbar. Die vier amplifizierten Fragmente wurden anschließend in einem Schritt, mit dem In-Fusion Cloning Kit kloniert, wodurch der Vektor pYTRW20K_OTi1 erzeugt werden konnte (Abbildung 3-27, C).

Erzeugung von Stämmen und Vektoren zur gezielten rDNA-Integration:

Aufbauend auf den Kenntnissen zur unterschiedlichen Expressionsstärke der *rrn*-Operons konnten *P. putida*-Stämme erzeugt werden, welche die direkte Integration eines Genclusters in diese erlauben. In diesen Stämmen wurde jeweils eines der sieben *rrn*-Operons mit einer einzigartigen DNA-Sequenz markiert, welche nun zur gezielten Integration in das gewünschte Operon genutzt werden kann. Somit kann nun durch die Auswahl des Stammes das entsprechend zur Integration gewünschte *rrn*-Operon gewählt werden, wodurch die Expressionsstärke des integrierten Genclusters beeinflusst werden kann.

3.4 Anwendung des *y*TREX-*Toolbox*-Systems zur Violaceinproduktion

In den vorherigen Kapiteln wurde die Planung und erfolgreiche Klonierung verschiedener pYT-Grundvektoren zur Integration *via* Tn5-Transposition gezeigt. Zudem konnte die Funktion verschiedener Reporterproteine bestätigt werden. Des Weiteren wurden spezielle *P. putida*-Stämme zur direkten Integration in ausgewählte *rrn*-Operons erzeugt, in die mit pYT-Vektoren zur 16S-Integration gezielt die YT_core-Sequenz integriert werden kann.

Abschließend sollte im dritten Teil dieser Arbeit, die Funktionalität des erzeugten *y*TREX-*Toolbox*-Systems, anhand der Varianten zur Integration *via* Tn5-Transposition und der gezielten 16S-rDNA-Integration, am Beispiel eines Biosynthesegenclusters demonstriert werden.

Als Gencluster wurde dazu das Violacein-Gencluster (*vio*-Gencluster) ausgewählt. Die durch das Gencluster kodierten Enzyme führen dabei zur Bildung des biologisch aktiven Sekundärmetabolits Violacein. Aufgrund der u.a. antimikrobiellen und antitumoralen Eigenschaften dieser Substanz (Choi et al., 2021; Durán & Menck, 2001) eignet sich *P. putida* hier möglicherweise besonders gut, um eine Überexpression der entsprechenden Biosynthesegene im Allgemeinen, aber insbesondere in den *rrn*-Operons zu testen, da die Widerstandsfähigkeit dieses Bakteriums gegen bioaktive Substanzen bereits häufig gezeigt werden konnte (Domröse et al., 2017; Eltoukhy et al., 2020; Loeschcke & Thies, 2020). Dabei bietet Violacein auch aufgrund seiner Eigenschaften als Pigment den Vorteil, dass produzierende Klone nach der Insertion des Genclusters leicht visuell erkennbar sind und es unkompliziert quantifizierbar ist. Aufgrund dieser einfachen Detektierbarkeit wurde das Gencluster auch bereits als Reporter-gencluster zur Expressionstoolentwicklung verwendet (Choi et al., 2018).

3.4.1 Klonierung von *vio*-Genen in pYT-Vektoren zur Tn5- und 16S-Integration

Um Gencluster in die *y*TREX-*Toolbox*-Vektoren zu klonieren, soll mit der zunehmenden Nutzung des *y*TREX-*Toolbox*-Systems und der daraus resultierend wachsenden Vektorbibliothek nur noch der geeignete Vektor ausgesucht und ein Gencluster in diesen eingebracht werden müssen. In diesem Sinne wurden aus dem Bestand der erstellten Vektoren der Vektor pYTRW09K_OT5 zur Tn5-Integration, sowie der Vektor pYTRW21K_1Ti1 zur 16S-Integration ausgesucht. Um folgend jeweils das Violacein-Gencluster einzuklonieren, wurden die genannten Vektoren mittels der *homing*-Endonuklease I-SceI linearisiert (Abbildung 3-28, A). Parallel wurde das *vio*-Gencluster durch PCR ausgehend vom Vektor pAra-VioABCDE amplifiziert (Abbildung 3-28, B). Beim Design der Primer wurden dabei komplementäre Bereiche zu den beiden zur Klonierung vorgesehenen CIS-Sequenzen des *y*TREX-*Toolbox*-Vektors angefügt, um die Fragmente anschließend mit Hilfe des In-Fusion Cloning Kits zu verbinden.

Aufgrund der zur Klonierung vorgesehenen artifizialen Sequenzen innerhalb der YT_core-Sequenz konnte hier das gleiche amplifizierte DNA-Fragment des *vio*-Genclusters für beide Vektoren verwendet werden (Kapitel 3.3.1.2), sodass, wie in der Konzeption vorgesehen, die Arbeiten dabei gut parallelisierbar sind (Abbildung 3-28). So konnten beide Vektoren pYTRW19K_OT5 (Tn5) und pYTRW24K_1Ti1 (*rrn*) erzeugt werden (Abbildung 3-28, C). Restriktionskontrollen ergaben die erwarteten Bandenmuster, sodass die Vektoren folgend zu einer ersten Anwendung verwendet wurden. Auf eine Sequenzierung aller integrierten Gene wurde hier aufgrund der Größe des Genclusters verzichtet.

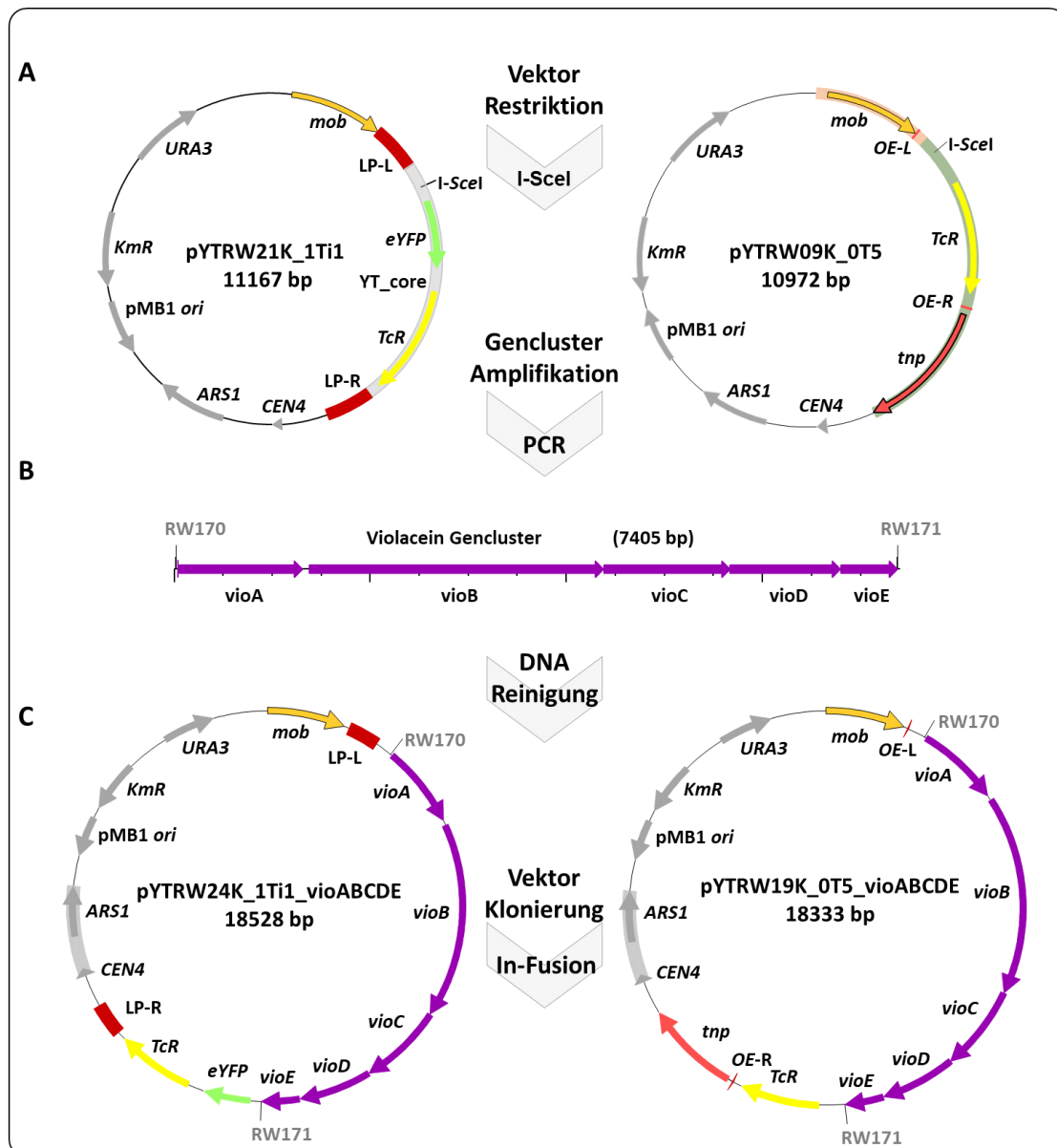


Abbildung 3-28: Parallele Klonierung von *vio*-Genen in pYT-Vektoren zur Tn5- und 16S-Integration

(A) Im ersten Schritt wurden die Vektoren mit der *homing*-Endonuklease *I-SceI* innerhalb der YT_core-Sequenz linearisiert. (B) Parallel wurde das Violacein-Gencluster mittels PCR amplifiziert. (C) Anschließend wurden die linearisierten Vektoren mit Hilfe des In-Fusion Cloning Kits mit dem *vio*-Gencluster Fragment zu den Vektoren pYTRW24K_1Ti1 und pYTRW19K_OT5 kloniert. Durch die universelle Verwendung der YT_core-Sequenz in jedem Vektor der pYT-Serie konnten die Klonierungen parallelisiert und für beide Klonierungen das gleiche PCR-Fragment verwendet werden. Durch die unterschiedlichen Bereiche, welche die YT_core-Sequenz einfassen (LP_L/R) bzw. *outer ends* (OE-L/R) können die entstandenen Vektoren jeweils zur 16S-Integration oder zur Tn5-Transposition genutzt werden. Schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung.

3.4.2 Funktionsvalidierung eines pYT-Vektors zur Tn5-Integration

Um nun die Anwendbarkeit des neuen *yTREX-Toolbox*-Systems in der Praxis zu testen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Vektor pYTRW19K_0T5_vio durch Konjugation in wildtypische Zellen des Produktionswirtes *P. putida* KT2440 übertragen. Nach der Konjugation konnte aufgrund des Selektionsmarkergens Tetracyclin auf eine erfolgreiche Transposition des pYT-Transposons selektiert werden. Im darauffolgenden Screening wurden von den erhaltenen Klonen sechs ausgewählt, die visuell unterschiedliche lila Färbungen aufwiesen. Der Anteil dieser Klone mit lila Färbung wurde nicht gezielt untersucht, kann aber grob im Bereich um 15 % eingeordnet werden, was dem Anteil bei Nutzung des *yTREX*-Systems in vorangegangenen Arbeiten entspricht (Domröse et al., 2017). Der Aufwand der Anwendung konnte aufgrund der komfortableren Klonierung und höheren Anpassbarkeit erfolgreich verringert werden. Die sechs ausgewählten Klone wurden mit RW19-1-6 benannt. Der Terminus RW19 dient dabei dem Verweis auf das Plasmid der pYT-Vektorserie, mit dem die entsprechenden Stämme erzeugt wurden. Nach dem isolierten Überstreichen der einzelnen Klone wurden die verschiedenen Stämme in Flowerplates in TB-Medium unter Standardbedingungen kultiviert (Kapitel 2.5.4.2), um in den Kulturen eine Violaceinbildung nachzuweisen. Anschließend wurden die Zellen mit reinem Ethanol extrahiert (Kapitel 2.8.1.1). Zur Validierung der Violaceinproduktion wurden die produzierten Pigmente zunächst qualitativ analysiert. Erwartet wurde dabei ein Gemisch aus Violacein und Deoxyviolacein, wie es auch im nativen Produzenten gebildet wird (Hoshino, 2011; Rodrigues et al., 2012). Dazu wurden Aliquots der zuvor erzeugten Extrakte mittels Umkehrphasen-HPLC mit einem angeschlossenen PDA-Detektor analysiert (Kapitel 2.8.3.1) (Abbildung 3-29). Anhand der relativen Retentionszeiten und spektralen Eigenschaften konnte so durch den Vergleich mit vormals publizierten Daten eine Zuordnung der Hauptsignale zu Violacein und Deoxyviolacein erfolgen (Lee et al. 2013; Sánchez et al. 2006; Domröse et al. 2017).

Es ergab sich ein gemischtes Bild. Während die Stämme RW19-2, 4 und 5 das erwartete Signalverhältnis von viel Violacein- zu vergleichsweise wenig Deoxyviolaceinsignal zeigten, produzierten die Stämme RW19-1 und RW19-3 fast ausschließlich Deoxyviolacein. Dies war ungewöhnlich, da das Verhältnis beider Substanzen gewöhnlich zugunsten von Violacein verschoben ist (Hoshino, 2011). Zudem wurden bei der Analyse dieser Stämme kleine Mengen an Prodeoxyviolacein, einem Nebenprodukt der Deoxyviolaceinbiosynthese, gefunden. Dieses kann durch eine nichtenzymatische Umsetzung aus Protodeoxyviolaceinsäure, welche die unmittelbare biosynthetische Vorstufe von Deoxyviolacein darstellt, gebildet werden (Lee et al., 2013). Der Stamm RW19-6 zeigte wie die Stämme RW19-2, 4 und 5 das typische Verhältnis der beiden Substanzen Violacein und Deoxyviolacein zueinander, jedoch eine wesentlich geringere Signalstärke (Abbildung 3-29).

Aufgrund der bekannten Abfolge der Enzymreaktionen des Biosynthesewegs, welcher zur Produktion von Violacein führt (Lee et al., 2013), scheint in den Stämmen, welche eine deutlich höhere Menge Deoxyviolacein produzieren, eine Veränderung der Gensequenz des Gens *vioD* erfolgt zu sein. Dieses kodiert eine Monoxygenase, welche die Hydroxylierung eines aromatischen Rings von Protodeoxyviolaceinsäure katalysiert, wodurch Violacein gebildet werden kann. Die nur einzeln aufgetretene Abweichung innerhalb der Stichprobe der Stämme legte nahe, dass die Mutationen erst bei oder nach der Integration in das *P. putida* KT2440 Genom entstanden sind. Eine Sequenzierung des Gens *vioD* auf dem Plasmid pYTRW19K_0T5, die eine vollkommen intakte Sequenz des Gens aufzeigte, bestätigte zudem, dass die Mutationen nicht vor der genomischen Integration stattgefunden haben. Um die in den Bakterien vorliegenden Sequenzen zu prüfen, wurde die genomische DNA der beiden starken Deoxyviolaceinproduzenten isoliert und das Violacein-Gencluster durch eine PCR mit den Primern RW170/171 von der genomischen DNA amplifiziert. In dem erhaltenen PCR-Fragment wurde anschließend das gesamte Gen *vioD* inklusive der angrenzenden Sequenzen mit den Primern RW220, 221 und 223 sequenziert (Tabelle 2-9). Dabei zeigte sich, dass beide Stämme RW19-1 und RW19-3 eine Deletion im Gen *vioD* aufwiesen, welche im natürlichen Leserahmen lagen und so nicht zu einer Leserahmenverschiebung führten. Im Stamm RW19-1 wurden dabei vier Aminosäuren (AS) deletiert, während im Stamm RW19-3, 12 AS deletiert waren (Abbildung 7-7).

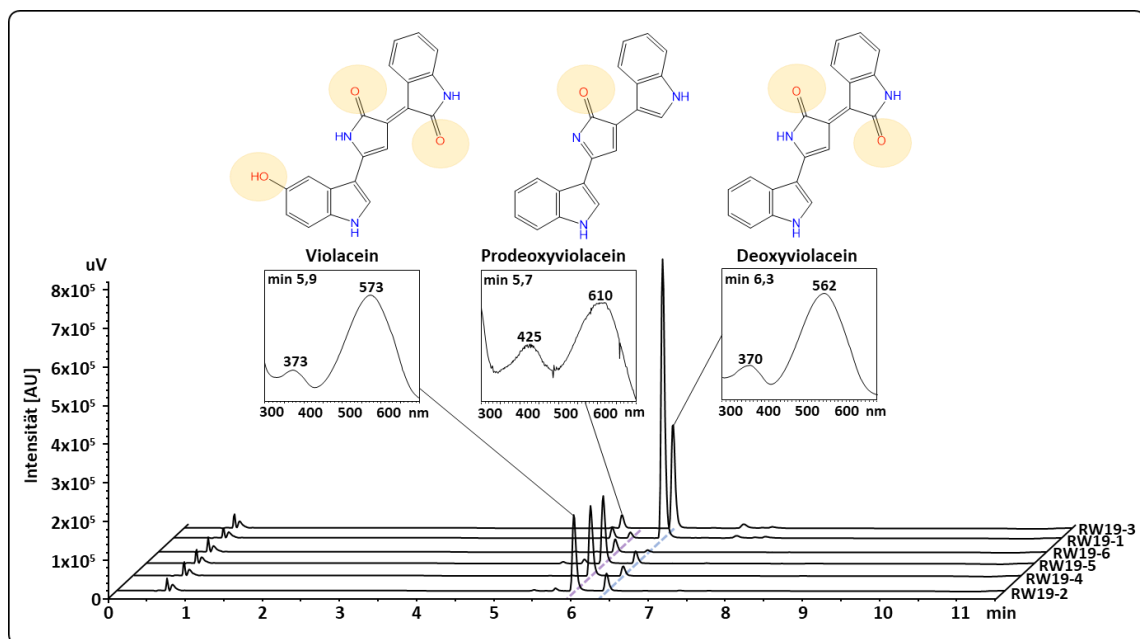


Abbildung 3-29: Analyse der produzierten Pigmente in *P. putida*-Stämmen nach pYT-vermittelter Tn5-Integration von *vio*-Genen

Gezeigt sind Violacein und Deoxyviolacein sowie deren funktionelle Gruppen, die eine unterschiedliche Polarität der beiden Substanzen bedingen. Die Violaceinpigmente wurden aus Zellen der Stämme *P. putida*-RW19-1-6 nach Kultivierung in Flowerplates mit Ethanol extrahiert. Bei einer Analyse der Extrakte mittels HPLC-PDA wurden Chromatogramme bei 600 nm aufgenommen und UV/Vis-Spektren der Analyten extrahiert. Dabei konnte die typischen Maxima von Violacein (573 nm), Deoxyviolacein (562 nm), sowie das des Nebenprodukts Prodeoxyviolacein (610 nm) zu den für die Verbindungen erwarteten Retentionszeiten detektiert werden. Die Stämme zeigten nicht nur eine unterschiedlich starke Produktion der Violaceine, sondern auch unterschiedliche Verhältnisse zwischen den Produkten. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von $n \geq 3$ Versuchen.

Nach der qualitativen Analyse der produzierten Pigmente aus den erstellten Expressionsstämmen wurde der Titer der Kulturen bestimmt. Dazu wurden die Extrakte 1:10 in Ethanol verdünnt und die Absorption der erzeugten Proben bei einer Wellenlänge von 575 nm im Photometer gemessen. Der Titer des produzierten Violaceins wurde im Anschluss mit Hilfe der bestimmten Absorption und Verrechnung mit dem Extinktionskoeffizienten von Deoxyviolacein und Violacein (Rodrigues et al., 2013, 2012) in Ethanol, näherungsweise bestimmt (Abbildung 3-30).

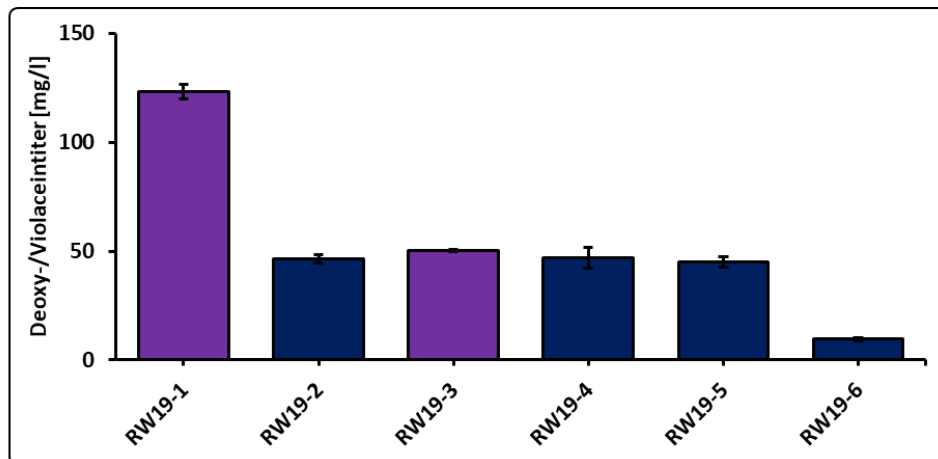


Abbildung 3-30: Deoxy-/Violaceintiter verschiedener *P. putida*-Stämme nach pYT-vermittelter Tn5-Transposition von *vio*-Genen

Die Stämme wurden in einer biologischen Mehrfachbestimmung ($n \geq 3$) in Flowerplates bei 30 °C über 24 h bei 1400 UpM in 800 μ l TB-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Extraktion und photometrische Analyse der Sekundärmetaboliten in Ethanol bei 575 nm und die Kalkulation der Titer in mg/l. Bei der qualitativen Kontrolle zeigte sich, dass die Stämme RW19-1 und RW19-3 hauptsächlich Deoxyviolacein produzierten, weshalb in diesen beiden Fällen die Kalkulation der Produkttiter mit dem Extinktionskoeffizienten und dem Molekulargewicht dieses Stoffes durchgeführt wurden (lila Säulen). Die Titer der Stämme, welche eine Mischung von Violacein mit Deoxyviolacein als Nebenprodukt bildeten, wurden mit dem Extinktionskoeffizienten von Violacein berechnet (blaue Säulen). Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angegeben.

Der bestproduzierendste Stamm RW19-1 erreichte einen Titer von etwa 123 mg/l, während die Stämme RW19-2-5 sehr ähnliche Titer im Bereich zwischen etwa um 25 mg/l aufwiesen. Der Stamm RW19-6 erreichte dagegen mit einem Titer von etwa 7 mg/l einen sehr geringen Wert. Wie aus der Anwendung des γ TREX-Systems bekannt, zeigten somit auch die anhand der Anwendung der γ TREX-*Toolbox* (zur Tn5-Integration) erzeugten violacein- bzw. deoxyviolaceinproduzierenden Stämme sehr verschiedene Produkttiter. Diese liegen in einem ähnlichen Bereich wie die dort beschriebenen, deren Werte in einem Bereich zwischen 36 und 105 mg/l lagen (Domröse et al., 2017).

Nach der Klonierung und Anwendung eines pYT-Vektors zur Tn5-Integration, mit dem das Violacein-Gencluster integriert wurde, zeigte sich, dass die Erzeugung von Violacein produzierenden Stämmen auch mit dem neuen γ TREX-*Toolbox*-System vergleichbar möglich ist. Die Klonierungen der Vektoren sind dabei allerdings komfortabler möglich.

3.4.3 Funktionsvalidierung eines pYT-Vektors zur 16S-Integration

Nach der erfolgreichen Anwendung des *yTREX-Toolbox*-Systems zur Tn5-Integration, sollte nun erstmals die direkte Integration eines Genclusters in die 16S-rDNA von *P. putida* getestet werden. Dazu wurden die Stämme *P. putida* RW16SA-RW16SF, in denen jeweils ein *rrn*-Operon mit der 16S *landing site* markiert wurde (Kapitel 3.3.1.2) und ein pYT-Vektor zur 16S-Integration verwendet (Kapitel 3.4.1). Mit dem verwendeten Vektor pYTRW24K_1Ti1 sollte dabei erneut das *vio*-Gencluster genomisch integriert werden. Die Übertragung des Vektors in die Stämme RW16SA-RW16SF erfolgte durch Konjugation. Die Transkonjuganten wurden anschließend zur Selektion der Stämme, die das Integron inklusive des *Violacein*-Genclusters und der *Tc^R* trugen, auf tetracyclinhaltigem Agar ausplattiert. Die Nutzung der homologen Rekombination bringt die Möglichkeit des Auftretens von *single crossover* Ereignissen mit sich. Im Fall einer korrekten *double crossover* Integration werden die *vio*-Gene schließlich vom Promotor des 16S-Operons abgelesen, weshalb sie eine lila Färbung aufweisen sollten. Anschließend erfolgte daher zunächst eine visuelle Analyse der erhaltenen Klone auf solche, die diesen Phänotyp aufwiesen. Dabei fiel auf, dass die Anzahl der Transkonjuganten mit einem solchen Phänotyp sehr gering war. Auch konnten nicht nach der ersten Konjugation Stämme mit einer Integration für jedes *rrn*-Operons gesammelt werden, sodass die Stammerzeugung mehrfach wiederholt wurde. Die erhaltenen lila Klone zeigten dabei bei einer Integration in das gleiche *rrn*-Operon wie erwartet keine Varianz in der Farbtintensität, wie es bei den Klonen mit Tn5-Transposition der Fall war. Auffällig war jedoch, dass zusätzlich zu den farbigen Klonen auch einige ganz ohne eine Färbung auftraten. Diese Klone entsprachen dabei der Erwartung, dass es auch zu *single crossover* Ereignissen kommen würde. Alle Klone wurden im Anschluss auf tetracyclin- und gentamicinhaltigen Agarplatten replikaplattiert, um Stämme mit *single crossover* auszuschließen. Solche Klone wären weiterhin gentamicinresistent, da das Resistenzgen in der 16S *landing site* weiter vorhanden ist. Bei einem *double crossover* würde dieses durch die Rekombination verloren gehen.

Es zeigte sich also schließlich, dass es sich bei fast allen Stämmen um *single crossover* Integrationen in unterschiedlichen Orientierungen (Keseler & Kaiser, 1997) handelte, bei denen das Vektorrückgrat im Zuge der homologen Rekombination mit ins Genom integriert wurde und die daher sowohl auf tetracyclin- als auch auf gentamicinhaltigen Agarplatten wachsen konnten. Einzig in einem Stamm *P. putida* RW16SA, in dem das *rrn*-Operon A durch die 16S *landing site* markiert ist, wurde das Gencluster korrekt durch ein *double crossover* integriert und so der Stamm RW24-A erzeugt. Auch in diesem Fall steht der Terminus RW24 für das Plasmid, welches zur Erzeugung eingesetzt wurde. Dies zeigte trotz der schlechten Effizienz, dass das angewandte Verfahren zur Integration in das 16S-Gen grundsätzlich möglich war, dass jedoch das Screening nach korrekt erzeugten Stämmen in dieser Form sehr aufwendig sein kann.

Um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von *single crossovers* zu reduzieren, sollten die pYT-Vektoren zur 16S-Integration in einem nächsten Schritt mit einem Marker zur Gegenselektion im Vektorrückgrat ausgestattet werden, mit dem ein Selektionsdruck gegen *single crossover* aufgebaut werden sollte.

3.4.3.1 SacB als Kontraselektionsmarker bei pYT-basierter 16S-rDNA-Integration

Um mehr *double crossover* zu erhalten, wurde die Levansucrase SacB des Bakteriums *Bacillus subtilis* als Kontraselektionsmarker gewählt. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Saccharose bei gleichzeitiger Synthese von Levan. Levan ist ein verzweigtes Polymer welches aus bei der Hydrolyse von Saccharose frei werdenden Fructosylresten besteht (Steinmetz et al., 1985). Die Expression des Gens *sacB* bei Verfügbarkeit von Saccharose und die damit einhergehenden Synthese der Levanpolymere ist bei gramnegativen und einigen grampositiven Bakterien letal (Hmelo et al., 2015). Es ist bekannt, dass SacB in den meisten grampositiven Bakterien sekretiert wird, wohingegen es in gramnegativen Bakterien hauptsächlich im Periplasma verbleibt. Der genaue Mechanismus der Toxizität ist jedoch bisher unbekannt (Hmelo et al., 2015). Aufgrund der weiten Verbreitung und leichten Anwendbarkeit von *sacB* als Kontraselektionsmarker, insbesondere in Pseudomonaden (Choi et al., 2018; Hmelo et al., 2015), sollte *sacB* auch in den pYT-Vektoren zur 16S-Integration, zur Gegenselektion genutzt werden, um die Häufigkeit des Auftretens von *single crossovers* zu verringern. Als Teil des Vektorrückgrats wird das Gen bei jedem *single crossover* Event zusammen mit diesem ins Wirtsgenom integriert und führt durch seine Expression bei Zusatz von Saccharose zum Kulturmedium, schließlich zum Tod der Zellen. Somit sollte eine Anreicherung von Zellen, in denen die YT_core-Sequenz per *double crossover* genomisch integriert und *sacB* daher nicht ins Genom integriert wird, erreicht werden.

Zur Erzeugung des neuen pYT-Vektors mit *sacB* als Selektionsmarker wurde der bereits klonierte Vektor pYTRW24K_1Ti1 mit bereits eingefügtem Violacein-Gencluster als Vektorrückgrat verwendet. Dazu wurde der Vektor mit der Endonuklease *SpeI* linearisiert und das Gen *sacB* mit den Primern RW194/RW195 mittels PCR amplifiziert (Tabelle 2-9) (Kapitel 2.6.2.6). Als *Template* wurde das Plasmid pK19-mobSacB verwendet. Anschließend wurden beide DNA-Fragmente unter Anwendung des In-Fusion Cloning Kits zum fertigen Plasmid pYTRW25K_1Ti1 kloniert (Abbildung 7-6) (Kapitel 2.6.1.2). Zur Integration des Violacein-Genclusters in die *rrn*-Operons der *P. putida*-Stämme RW16SA-RW16SF wurde nach dem gleichen Schema wie in Kapitel 3.4.3 verfahren. Im Unterschied zum oben beschriebenen Vorgehen wurden die Transkonjuganten in Flüssigmedium mit den entsprechenden Antibiotika und Saccharose kultiviert, wodurch das Wachstum von Stämmen mit *single crossover* Rekombination verhindert werden sollte (Kapitel 2.5.3.2). Anschließend wurden Zellen aus diesen Kulturen auf Selektionsagarplatten, ebenfalls versetzt mit geeigneten Antibiotika und Saccharose ausplattiert.

Bereits bei der Ansicht der Agarplatten fiel auf, dass die Anzahl der Klone im Vergleich zur Anwendung des pYT-Vektors ohne *sacB* deutlich geringer war. Zudem war auffällig, dass im Gegensatz zur Anwendung des Plasmids ohne *sacB* (Kapitel 3.4.3) alle Klone eine lila Färbung aufwiesen.

Damit konnte die ursprüngliche Erwartung bestätigt werden, dass durch die Integration der YT_core-Sequenz in ein *rrn*-Operon das enthaltene Gencluster gezielt zur Expression gebracht werden kann. Von den erhaltenen Klonen wurde folgend jeweils ein Klon eines *rrn*-Operons ausgewählt und auf tetracyclin- und gentamicinhaltigen Agarplatten replikaplattiert, um Stämme mit *single crossover* auszuschließen. Für alle Klone konnte das *double crossover* bestätigt und so die Stämme RW25-A bis RW25-F erzeugt werden.

Einzig im Stamm *P. putida* RW16SG, in welchem die YT_core-Sequenz in das rDNA-Operon G integriert werden sollte, konnten auch nach mehreren Versuchen keine Stämme mit einer lila Färbung erzeugt werden. Weiterhin wurde die genomische DNA der Stämme RW25-A bis RW25-F extrahiert, um abschließend sicherzustellen, dass die YT_core-Sequenz an der vorgesehenen Stelle in die 16S *landing site* und damit in das jeweils geplante Operon integriert wurde. Dazu wurden ähnliche PCR-Tests durchgeführt wie schon zur Überprüfung der korrekten Integration der 16S *landing site* in die verschiedenen *rrn*-Operons (Kapitel 3.3.3.3). Auch hier wurden die Primer AD106-AD112 zur Definition des jeweiligen *rrn*-Operons verwendet und in diesem Fall aber mit dem Primer RW217 kombiniert (Tabelle 2-9), welcher innerhalb des Violacein-Genclusters bindet. Diese Kombination sollte bei korrekter Integration ins jeweilige *rrn*-Operon zu PCR-Produkten zwischen 3856 Bp und 4004 Bp führen. In allen Fällen konnte so eine Integration an der gewünschten Stelle nachgewiesen werden. Im Vergleich mit dem Versuch der Integration in die 16S *landing sites* der *P. putida*-Stämme RW16SA-RW16SF mit Hilfe des pYT-Vektors zur 16S-Integration ohne *sacB* (Kapitel 3.4.3) konnte gezeigt werden, dass eine Zielausrichtung in gewünschte Orte im Wirtsgenom, mit Hilfe des neuen yTRES-Toolbox-Systems möglich ist. Mit dem Kontraselektionsmarker SacB konnte der Selektionsdruck auf die erzeugten Transkonjuganten so stark erhöht werden, dass eine Ausbeute von nahezu 100 % *double crossover* Stämmen erreicht werden konnte.

Aufgrund dieses erfolgreichen Tests wurde nach dem gleichen Schema auch in alle weiteren im Rahmen dieser Arbeit klonierten pYT-Vektoren zur 16S-Integration das Gen *sacB* einkloniert, um auch für diese Anwendung ein einsatzfähiges Vektorset zu etablieren (Tabelle 7-4).

3.4.3.2 Analyse der Violaceinproduktion nach 16S-Integration

Zunächst wurden die mit den rDNA-Integrationsstämmen produzierten Pigmente qualitativ untersucht. Dazu wurden die verschiedenen Stämme nach Standardbedingungen kultiviert (Kapitel 2.5.4.2) und anschließend die Zellen extrahiert (Kapitel 2.8.1.1). Als einfache, zusätzliche Methode zu HPLC-PDA-Analysen wurde in diesem Fall auch die Dünnschicht-chromatographie (DC) eingesetzt, um die Metabolitkomposition zu untersuchen.

Dabei wurden mittels eines DC-Automaten (CAMAG Automatic TLC Sampler 4) geringe Mengen der unverdünnten Proben auf eine Kieselgel DC Platte aufgetragen und durch ein unpolares Laufmittel nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt (Abbildung 3-31, A). Als Referenz wurde ein Gemisch aus Violacein und Deoxyviolacein aufgetragen, das von Fabienne Hilgers während ihrer Masterarbeit in *E. coli* mit dem Plasmid pAraVio produziert und extrahiert wurde (Hilgers, 2016). Dabei läuft Deoxyviolacein auf der polaren Kieselgel DC Platte im unpolaren Laufmittel weiter als Violacein, da es weniger polar ist. In sämtlichen Proben waren ausschließlich Banden auf der Höhe von Deoxyviolacein nachweisbar. Anschließend wurden zur weiteren Überprüfung die Aliquots der Extrakte mittels Umkehrphasen-HPLC mit einem PDA-Detektor analysiert (Kapitel 2.8.3.1) (Abbildung 3-31, B).

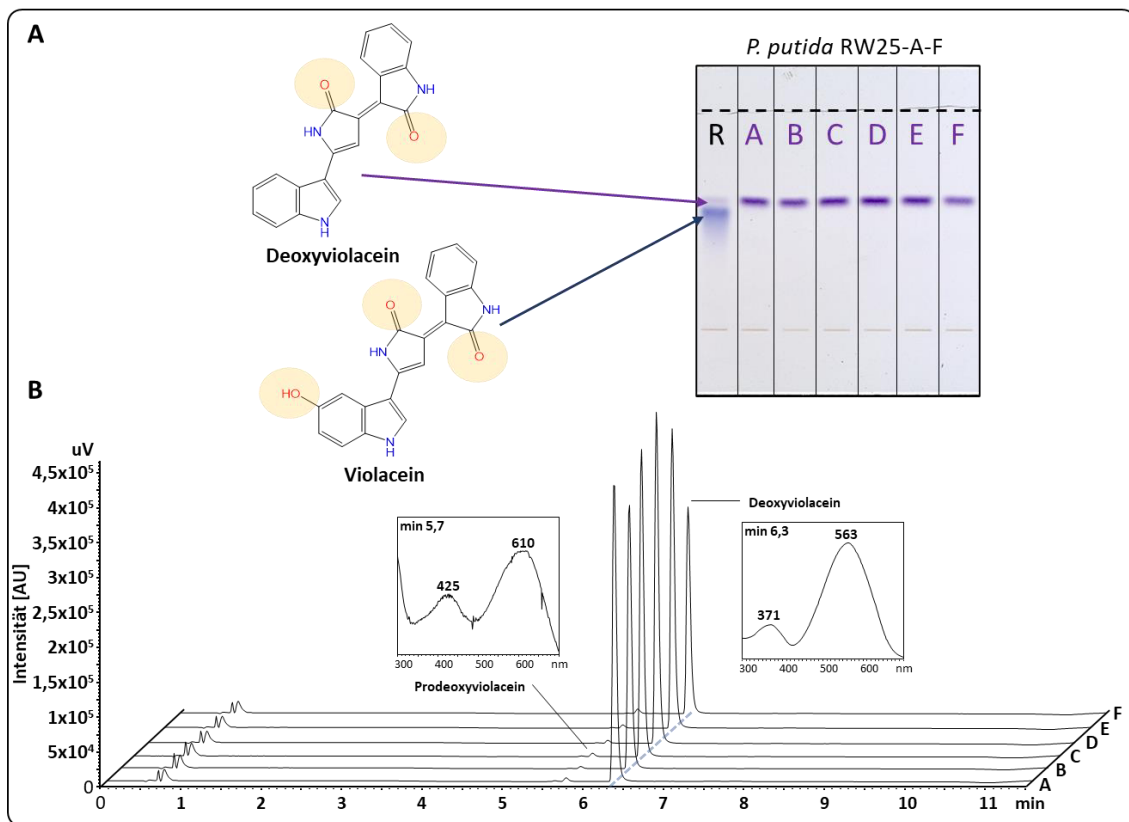


Abbildung 3-31 Analyse der produzierten Pigmente in *P. putida*-Stämmen nach pYT-vermittelter 16S-Integration von *vio*-Genen

(A) Gezeigt sind Violacein und Deoxyviolacein, hervorgehoben sind deren funktionelle Gruppen, die eine unterschiedliche Polarität der beiden Substanzen bedingen. Es wurden Proben der Stämme RW25-A bis -F (für die *rrn*-Operons, in welchen die *vio*-Gene vorliegen) nach Kultivierung in Flowerplates bei 30 °C über 24 h bei 1400 µM in TB-Medium mit Ethanol extrahiert. Eine Analyse der Extrakte mittels DC zeigt den direkten Vergleich mit einer Referenz-Mixtur (R). (B) Mittels HPLC-PDA-Analyse wurden Chromatogramme bei 600 nm aufgenommen und UV/Vis-Spektren der Analyten extrahiert. Es wurde das typische Maximum von Deoxyviolacein (563 nm), sowie das des Nebenprodukts Prodeoxyviolacein (610 nm) zu den für die Verbindungen erwarteten Retentionszeiten detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von $n \geq 3$ Versuchen.

Es konnte in allen Stämmen eine Zuordnung des Hauptsignals zu Deoxyviolacein erfolgen (Domröse et al., 2017; Lee et al., 2013; Sánchez et al., 2006). Es konnten hier also die Ergebnisse der DC-Analyse bestätigt werden. Zudem konnten bei dieser Analyse kleinste Mengen an Prodeoxyviolacein detektiert werden, das durch Autooxidation aus Protodeoxyviolaceinsäure, der unmittelbaren biosynthetischen Vorstufe von Deoxyviolacein, gebildet wird.

Durch dieses Ergebnis und aufgrund des Violaceinbiosynthesewegs (Abbildung 7-5) konnte daher geschlossen werden, dass auch hier ein Defekt des Gens *vioD* vorlag, der zu dessen vollständigem Funktionsverlust geführt haben musste (Lee et al., 2013; Sánchez et al., 2006). Auch hier musste die Mutation, wie in den Stämmen mit Tn5-vermittelter genomischer Integration nach der Klonierung passiert sein, da aufgrund der parallelen Klonierung der Vektoren pYTRW19K_OT5 und pYTRW25K_1Ti1 das gleiche DNA-Fragment des *vio*-Genclusters verwendet wurde (Kapitel 3.4.1). Im Fall der Integration in die *rrn*-Operons zeigten bei der qualitativen Analyse der produzierten Substanzen jedoch alle Stämme ausschließlich Deoxyviolaceinproduktion, wogegen es unter den Stämmen mit Tn5-vermittelter Integration nur zwei waren (Kapitel 3.4.2).

Um dennoch möglicherweise bei der Amplifikation der Vektoren aufgetretene Mutationen ausschließen zu können, wurde auch auf dem hier genutzten Plasmid das Gen *vioD* mit den Primern RW220, 221 und 223 sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten, dass keine Mutationen in diesem Gen vorlagen, was belegt, dass auch in diesem Fall die vermuteten Mutationen erst in *P. putida* auftraten.

Um *vioD* auch in den erzeugten Stämmen mit rDNA-Integration zur sequenzieren, wurde wie im Fall der Stämme mit Tn5-vermittelter Integration, die genomische DNA isoliert, das gesamte Violacein-Gencluster von der genomischen DNA amplifiziert und *vioD* mit den Primern RW220, 221 und 223 sequenziert (Tabelle 2-9). Die Analyse zeigte verschiedene Mutationen des Gens *vioD*, welche in jedem Stamm unterschiedliche Aminosäuren betrafen. Der Stamm *P. putida* RW25-A zeigte eine Deletion von 5 AS ab Position 177, welche im Leseraster lag und daher zu keiner Veränderung der nachfolgenden AS-Sequenz führt. Im Stamm RW25-B dagegen zeigte sich eine Deletion ab AS Position 240, welche zu einer Leserastermutation führte, wodurch alle folgenden AS verändert wurden und ein Stopcodon an Position 248 auftrat. Im Stamm RW25-C trat dagegen erneut eine Deletion ab AS Position 96 auf, bei der 5 AS deletiert waren, die jedoch im Leseraster lag. Gleiches zeigte sich in den Stämmen RW25-D (ab AS Position 277, 4 AS deletiert), RW25-E (ab AS Position 94, 4 AS deletiert) und RW25-F (ab AS Position 348, 18 AS deletiert) (Abbildung 7-7). Obwohl die Deletionen überwiegend im Leseraster lagen, zerstörten sie offenbar die Aktivität des Enzyms VioD, da sie möglicherweise zu ausgeprägten Störungen der Proteinstruktur in der Rossman-Faltungsdomäne (Hanukoglu, 2015) oder dem reaktiven Zentrum führten (Abbildung 7-8). Nach der qualitativen Analyse der produzierten Pigmente sollte deren Produktionsleistung ermittelt werden. Es wurde also der Titer des produzierten Deoxyviolaceins durch die Messung der Absorption des Extraktes und Berechnung anhand des Extinktionskoeffizienten von Deoxyviolacein in Ethanol näherungsweise bestimmt (Kapitel 2.8.2.3) (Abbildung 3-32). Die Werte der Stämme *P. putida* RW25-A, -C, -D und -E lagen sehr nah beieinander und erreichten mit ~92, 95, 100 und 95 mg/l die höchsten Titer. Mit ~80 mg/l lag der Stamm *P. putida* RW25-B im mittleren Bereich und der Stamm *P. putida* RW14 mit ~66 mg/l zeigte den geringsten Titer.

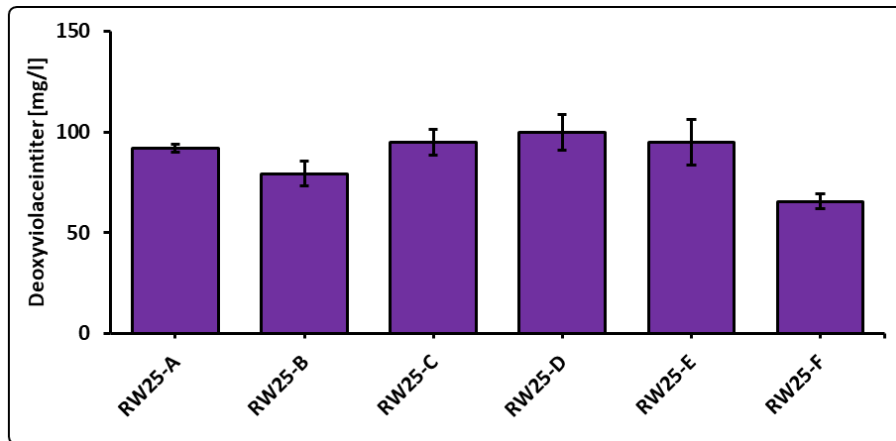


Abbildung 3-32: Deoxyviolaceintiter verschiedener *P. putida*-Stämme nach pYT-vermittelter 16S-Integration von *vio*-Genen

Die Stämme wurden in einer biologischen Mehrfachbestimmung ($n > 3$) in Flowerplates bei 30 °C über 24 h bei 1400 UpM in 800 μ l TB-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Extraktion und photometrische Messung der Absorption des Deoxyviolaceins in Ethanol bei 575 nm, sowie die Kalkulation der Titer in mg/l. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angegeben.

Im Vergleich der *P. putida*-Stämme nach 16S-Integration der *vio*-Gene mit den durch Tn5-Transposition erzeugten Stämmen fällt auf, dass nur der Stamm *P. putida* RW19-1, der ebenfalls Deoxyviolacein bildete, einen Titer von über 100 mg/l erreichte (Abbildung 3-30). Die Violaceintiter nach der Tn5-Transposition lagen dagegen lediglich zwischen 42 und 50 mg/l. Es scheint möglich, dass in diesem Stamm das Transposon auch in eines der *rrn*-Operons integriert wurde, was zu einer besonders starken Expression und einer ähnlichen Mutation wie in den rDNA-Integrationsstämmen geführt haben könnte. Da eine Lokalisierung und genaue Sequenzierung nach der zufälligen genomischen Integration im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht unternommen wurde, kann eine rDNA-Integration der *vio*-Gene in diesen Stämmen nur vermutet werden. Die geringe Häufigkeit der deoxyviolaceinbildenden Stämme nach der Tn5-Transposition sowie die starke Produktionsleistung des Stammes RW19-1, sprechen jedoch für eine rDNA-Integration.

Betrachtet man die Expressionsleistung der einzelnen Stämme mit rDNA-Integration, zeigte sich, dass diese, den Erwartungen entsprechend, mit dem in Domröse et al. 2019 beschriebenen Muster weitgehend übereinstimmt. Dieses stellte insbesondere eine starke Produktion bei Genclusterintegration in das *rrn*-Operon A, C und D dar und eine geringere bei Integration in die übrigen, B, E, F und G. Für die Integration in *rrn*-Operon A, C und D wurden dementsprechend hohe und für B und F niedrigere Produkttiter gemessen. Ein Stamm mit *vio*-Genintegration in das Operon G lag nicht vor, sodass kein Vergleich angestellt werden kann. Einzig das Ergebnis bei Integration in das *rrn*-Operon E entspricht nicht den Erwartungen, da dies nach den in dieser Arbeit erzeugten Daten zu einem der höchsten Produkttiter führte, zuvor jedoch als ein *rrn*-Operon mit eher geringer Expressionsstärke charakterisiert wurde (Domröse et al., 2019).

Sowohl die im Vergleich mit den Prodigiosinproduktionsstämmen gemessenen Produktionsunterschiede generell, als auch der höhere Produkttiter des Stammes, bei dem das *vio*-Gencluster in das *rrn*-Operon E integriert vorliegt, können möglicherweise auf die deutlich geringere Größe des *vio*-Genclusters zurückgeführt werden. Die deutlich geringere Größe des Violacein-Genclusters könnte dabei dazu geführt haben, dass Unterschiede der Promotorstärke der verschiedenen *rrn*-Operons, hier weniger ins Gewicht fallen. Aufgrund der scheinbar spezifisch auftretenden Mutationen in der DNA-Sequenz des Gens *vioD*, welche immer zu einem Funktionsverlust des Enzyms führten, scheint es möglich, dass eine starke Produktion von Violacein toxisch für die Zellen ist, eine starke Produktion von Deoxyviolacein jedoch nicht bzw. weniger. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die molekulare Struktur des Deoxyviolaceins, welches keine Hydroxylgruppe am aromatischen Ring besitzt und daher weniger polar ist als Violacein. Dies könnte wiederum dazu führen, dass Deoxyviolacein leichter über die Membran von *P. putida* aus der Zelle transportiert werden kann. So könnte die Zelltoxizität, bei einer hohen Produktion, gegenüber der von Violacein reduziert sein, da sie intrazellulär geringer gehalten werden kann. Gegen diese Hypothese sprechen jedoch die hohen Violaceinprodukttitere in den Stämmen nach Tn5-vermittelter Integration, welche von Domröse *et al.*, 2017 beschrieben wurden und mit 105 mg/l einen ähnlich hohen Titer erreichen wie die in dieser Arbeit beschriebenen Deoxyviolacein produzierenden Stämme. Auch in der Literatur beschriebene Studien zur Überproduktion von Violacein zeichnen ein gemischtes Bild. Manche Studien zeigen, dass Violacein nicht zwingend schädlich für bakterielle Zellen wie *E. coli* sein muss (Fang *et al.*, 2015), während andere beschreiben, dass Deoxyviolacein weniger toxisch für die Zellen ist (Bilsland *et al.*, 2018).

Dies könnte im Zusammenhang damit stehen, dass bei natürlicherweise violaceinbildenden Bakterien eine gewisse Instabilität von stärkeren Produzenten bereits beschrieben wurde (Jiang *et al.*, 2010; Matz *et al.*, 2008). Jedoch wurde auch die heterologe Violaceinproduktion in bakteriellen Wirten bereits mehrfach erfolgreich gezeigt (Choi *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2010). Dabei konnte allerdings auch die Instabilität einiger Plasmide in *E. coli* im Zusammenhang mit der Expression von Violaceinbiosynthesegenen festgestellt werden (Ahmetagic & Pemberton, 2010; Sarovich & Pemberton, 2007). Auch bei der Expression in *P. putida*, in dieser Arbeit vorangegangenen Studien, wurde das Auftreten unterschiedlich gefärbter Klone nach dem Einbringen des Violacein-Genclusters beobachtet (Domröse *et al.*, 2017), sodass eine Toxizität und ein daraus folgender Mutationsdruck bei höheren Violaceinkonzentrationen auch hier denkbar erscheint. Die MIC (minimale inhibitorische Konzentration) von Violacein wurde bei *Pseudomonas aeruginosa* im Bereich von 18,5 mg/l, bei *E. coli* im Bereich von 28,7 mg/l beschrieben (Priya *et al.*, 2018; Subramaniam *et al.*, 2014), sodass auch *P. putida*, trotz seiner sehr hohen Toleranz gegen verschiedene Xenobiotika, beeinträchtigt sein könnte (Eltoukhy *et al.*, 2020; Loeschcke & Thies, 2015).

Eine alternative Erklärung könnte auch die rDNA als Insertionsort sein, welcher als essenzieller Locus, der die ribosomale RNA kodiert, stark konserviert ist und geschützt werden muss.

Auch hier zeigen Studien jedoch, dass bakterielle Stämme auch nach dem gezielten Ausschalten mehrerer *rrn*-Operons weiter überlebensfähig sind und der Selektionsdruck zur Aufrechterhaltung der Kopien dieser *rrn*-Operons vor allem in der Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen besteht (Condon et al., 1995, 1993; Kurylo et al., 2018). Auch *P. putida* ist nach dem Verlust einzelner der sieben *rrn*-Operons, weiter überlebensfähig (Domröse et al., 2019; Otto et al., 2019).

Dennoch wäre diese Hypothese ein denkbarer Erklärungsansatz, da bei den in der Literatur beschriebenen Ansätzen meist eine vollständige Deletion den *rrn*-Operons durchgeführt wurde, wohingegen in dieser Arbeit eine Insertion vorgenommen wurde, was wiederum zur Bildung funktionsloser ribosomaler Komplexe führen könnte, da die ribosomale RNA dieser Operons unbrauchbar ist. Diese Insertion könnte daher DNA-Reparaturmechanismen ausgelöst haben, welche wiederum zu den Deletionen geführt haben könnten. Gegen diese These spricht wiederum, dass die äußerst stabile Erhaltung der *pig*-Gene in der rDNA gezeigt wurde (Domröse et al., 2019) und dass keine anderen Gene neben *vioD* betroffen waren. Interessanterweise wurde ebenfalls gezeigt, dass die Insertion eines kleinen Gens wie *eYFP* offenbar keine Mutationen auslöst, da dieses exprimiert werden konnte. In diesem Fall war sogar die Integration einer Ribozymschnittsequenz stromaufwärts des *rrn*-Operons mit *eYFP* Integration der Expression des Gens förderlich (Otto et al., 2019). Dies legte nahe, dass die Transkription des Gens beeinträchtigt war, wenn dessen mRNA zu beiden Seiten von rRNA umschlossen war, was möglicherweise auf Sekundärstrukturen zurückgeführt werden könnte. So könnte ein Abtrennen eines Teils der rRNA die Expression in diesem Fall begünstigen. Insbesondere im Fall größerer, inserierter Gencluster könnte dagegen das Transkript aufgrund der stromaufwärts und stromabwärts gelegenen *rrn*-Sequenzen möglicherweise langsamer degradiert werden, was zu einer höheren Transkriptlebensdauer und damit schließlich zu vermehrter Translation und eventuell mehr Produkt führen könnte.

Violacein und dessen Derivate wurden bisher selten in *P. putida*-Stämmen produziert (Loeschcke & Thies, 2020, 2015), weshalb wenige Referenzen zur Einordnung der in dieser Arbeit erzielten Produktmengen zur Verfügung stehen. Zwar wurde ein *P. putida*-Stamm beschrieben, welcher einen Titer von 1,5 g/l Deoxyviolacein erreicht, jedoch sind aufgrund der Patentierung keine weiteren Informationen zur Konstruktion oder Optimierungen dieses Stammes bekannt (Xing & Jiang, 2014). Grundsätzlich denkbare Optimierungen, die auch zur weiteren Entwicklung der hier präsentierten Stämme in Zukunft implementiert werden könnten, betreffen z.B. den Serin-, Chorismat- oder Tryptophanbiosyntheseweg, welche auch bereits in *E. coli* zu signifikanten Verbesserungen der Violaceinproduktion führten (Fang et al., 2015; Rodrigues et al., 2013).

Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass die Integration von Biosynthesegenen in die rDNA von *P. putida* zu einer besonders hohen Produktion führen kann.

Anwendung des γ TREX-Toolbox-Systems

Anhand der ersten Anwendung des γ TREX-Toolbox-Systems konnte am Beispiel des Violacein-Genclusters gezeigt werden, dass das System (I) gut zur unkomplizierten Erzeugung genomischer Integrationsstämme mit zufälligem Integrationsort geeignet ist. Darüber hinaus können nun jedoch (II) auch Stämme erzeugt werden, bei denen ein Gencluster gezielt in eines der 16S-*rrn*-Operons integriert wird. Die Klonierung der für beide Techniken erforderlichen Vektoren kann dabei aufgrund der gemeinsamen YT_core Vektorbasis gut parallelisiert werden. Die erste Anwendung zeigt dabei die gute Eignung des Tn5-Konzepts als genomweite Screeningmethode mit der Chance auf sehr gute Produzenten bei unbekanntem Insertionsort, während die direkte Integration in die *rrn*-Operons von *P. putida* mit hoher Wahrscheinlichkeit zur sofortigen Erzeugung starker Produktionsstämme führt.

3.5 Allgemeine Anwendungsmöglichkeiten des *y*TREX-*Toolbox*-Systems

Es wurde demonstriert, dass das *y*TREX-*Toolbox*-System mit allen Neuerungen zur Erzeugung von heterologen Produktionsstämmen einsetzbar und funktional ist. Dabei stellt es als modulare Plattform (Abbildung 3-33) eine sinnvolle Erweiterung bzw. Weiterentwicklung des zuvor bestehenden *y*TREX-Systems (Domröse et al., 2017) dar. Die Möglichkeit zur Klonierung durch homologe Rekombination in Hefe und die Tn5-Transposition als Integrationsmechanismus wurden dabei vom *y*TREX-System übernommen. Eine grundlegende Erweiterung des Systems besteht in der Ergänzung der möglichen genomischen Integrationsmechanismen, welche mit dem System anwendbar sind. Dazu stehen nun, zusätzlich zur Tn5-Transposition, die Tn7-Transposition und die Möglichkeit zur direkten Integration in eines der sieben *rrn*-Operons von *P. putida* zur Verfügung.

Die Tn5-Transposition erfolgt analog zum *y*TREX-System und konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich zur Erzeugung von *P. putida*-Stämmen zur Violaceinproduktion eingesetzt werden. Das Violacein-Gencluster wurde so an einer zufälligen Stelle in das Wirtsgenom integriert (Kapitel 3.4.2). Die Tn5-Transposition bietet dabei eine unkomplizierte Methode der genomischen Integration, mit der es gleichzeitig möglich ist, gut geeignete genomischen Loci zur Überexpression der Biosynthesegene bioaktiver Substanz zu identifizieren. Ein Set an Vektoren, die hierzu unmittelbar eingesetzt werden können, wurde erstellt. Die in Kapitel 3.4.2 beschriebene Anwendung bestätigte dabei die Funktionsfähigkeit dieser Methode im neuen System sowie vergleichbare Resultate mit der Anwendung des bisher genutzten *y*TREX-Systems (Domröse et al., 2017).

Um ein Gencluster *via* Transposition am immer gleichen Ort zu integrieren, wurde ein ergänzendes Set von Basisvektoren im Rahmen der Dissertation von Sonja Kubicki erzeugt. Mit diesen Vektoren ist es möglich, Gene gezielt in die *attTn7 site* von *P. putida* zu integrieren, welche dort nur einmal vorkommt. So ist es beispielsweise möglich, verschiedene Promotorsysteme vergleichend miteinander zu testen, wie es am Beispiel der Gene *rhlAB* aus *P. aeruginosa* demonstriert wurde (Kubicki, 2020). Da diese Vektoren auch Teil des *y*TREX-*Toolbox*-Systems sind, basieren sie ebenfalls auf der in dieser Arbeit detailliert beschriebenen YT_core-Sequenz als zentralem Baustein, welche eine standardisierte Klonierung ermöglicht (Kapitel 3.3.1.2).

Die dritte Methode zur Integration von Genen bietet, in Kombination mit speziell hergestellten *P. putida*-Stämmen (Kapitel 3.3.3.3), die Möglichkeit Gene direkt in die *rrn*-Operons zu integrieren. Diese genomischen Regionen haben sich in der Vergangenheit bereits als besonders gut geeignete Integrationsorte für eine Überproduktion bioaktiver Substanzen herausgestellt (Domröse et al. 2019). In diesem Fall erfolgt die Integration durch homologe Rekombination mit speziell gestalteten, artifiziellen Sequenzen. Diese wurden im Zuge der Entwicklung dieses Systems im Rahmen dieser Arbeit in die einzelnen *rrn*-Operons von *P. putida* KT2440 integriert.

Durch diese Individualisierung der Stämme kann nun anhand der Auswahl des Stammes das gewünschte *rrn*-Operon zur Integration gewählt werden. Auch diese Methode der Integration von Genen konnte dabei bereits erfolgreich angewandt werden (Kapitel 3.4.3) und zeigte ein vergleichbares, übergeordnetes Expressionsmuster wie von Domröse et al., 2019 beschrieben. Jeder beschriebene Integrationsmechanismus wird dabei durch eine Vektorserie repräsentiert.

Übergreifend über alle Möglichkeiten der Genintegration bietet die YT_core-Sequenz, als zentraler Baustein des Systems, erhebliche Vorteile bei der Klonierung. So können mit Hilfe dieser Sequenz verschiedene Selektionsmarker, Promotorsequenzen sowie Transkriptionsreporter unkompliziert in das System integriert werden. Auch ein Austausch der zu integrierenden Gene zwischen den Vektoren ist möglich, da die Kernelemente, wie Endonukleaseschnittstellen und artifizielle Sequenzen zur Klonierung in allen Vektoren gleich sind.

Mit zunehmender Anwendung des *Toolbox*-Systems wird dabei eine Vektorbibliothek aufgebaut, welche viele der meistverwendeten Selektionsmarker und Transkriptionsreporter, sowie deren Kombinationen bereits enthält und so die Anwendung des Systems weiter erleichtert. Dies verringert den Klonierungsaufwand und sorgt so weiter für eine zeitsparende und komfortable Anwendbarkeit. Es konnte also das yTRES-System zu einer sehr flexibel anwendbaren yTRES-*Toolbox* weiterentwickelt werden, mit der viele verschiedene Fragestellungen adressiert und langfristig eine umfangreiche Vektorbibliothek aufgebaut werden kann, welche den Forschungsfortschritt folgender Projekte weiter beschleunigen soll.

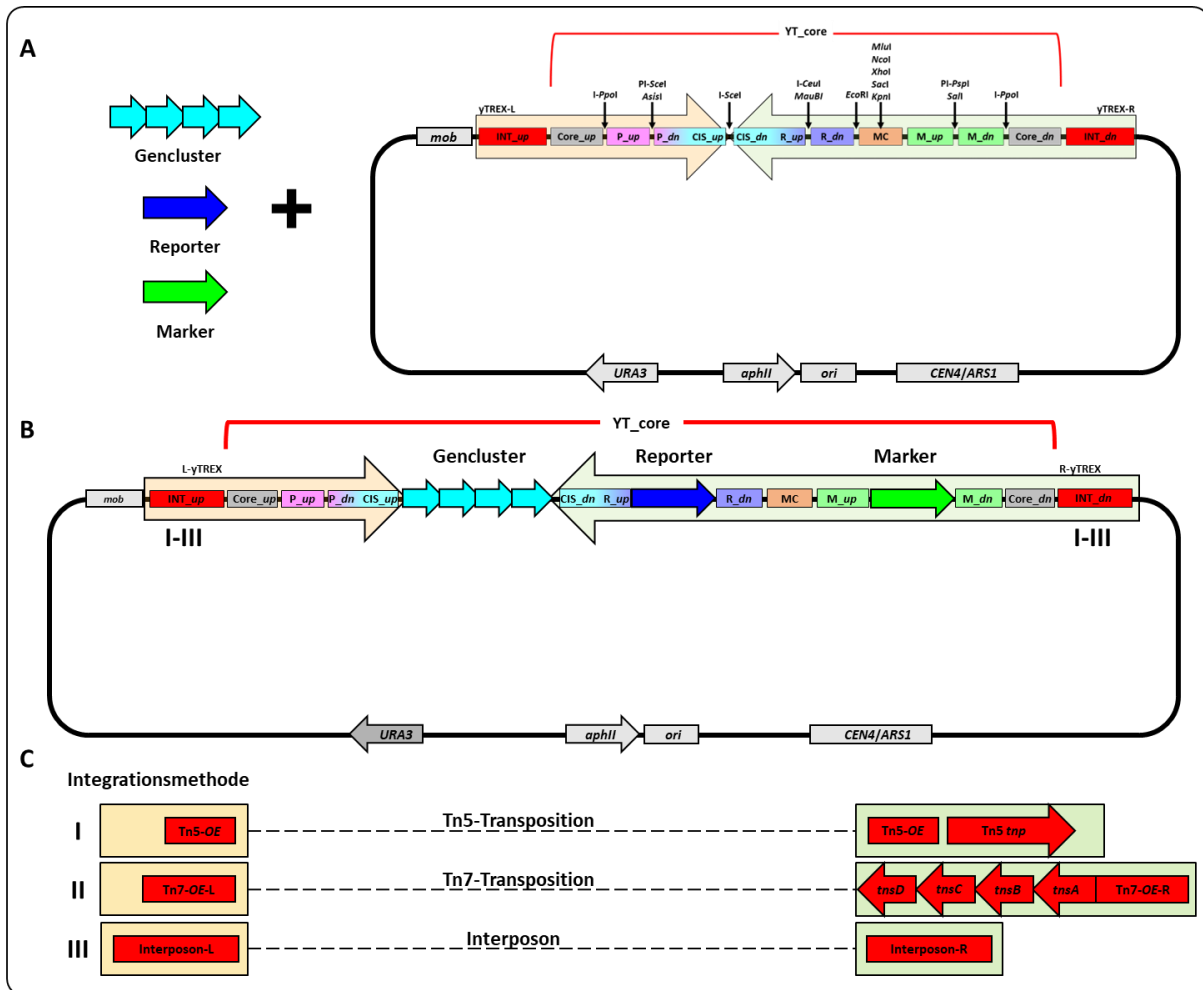


Abbildung 3-33: Schematische Abbildung des modularen yTREX-Toolbox-Systems

(A) Als flexibel austauschbare Teile der *Toolbox* stehen verschiedene Transkriptionsreporter und Selektionsmarker zur Klonierung in den yTREX-*Toolbox*-Grundvektor zur Verfügung; zudem kann die Funktionsweise des Systems z.B. durch regulatorische Elemente erweitert werden. Das Gencluster kann ebenfalls frei gewählt werden, es müssen jedoch zur homologiebasierten Klonierung zuvor passende homologe Bereiche angefügt werden. Zum Einbringen der verschiedenen *Toolbox*-Komponenten oder des Genclusters kann der Vektor an den vorgesehenen Stellen durch die eingetragenen Endonukleasen geöffnet werden. (B) Die für die verschiedenen funktionalen, genetischen Elemente vorgesehenen Rekombinationssequenzen sind in den gleichen Farben gehalten, wie die einklonierbaren Elemente und zur Veranschaulichung in den Vektor eingefügt, gezeigt. (C) Abhängig von dem gewählten Vektor unterscheiden sich die Integrationssequenzen (INT_up und _dn), was durch die römischen Zahlen angezeigt ist. Zugehörig sind die Elemente zur Realisierung verschiedener Mechanismen dargestellt, welche zur genomischen Integration der YT_core-Sequenz verwendet werden können und auf verschiedenen Vektoren vorliegen, in die, nach dem gezeigten Schema, die funktionellen Elemente und Gencluster integriert werden können. Andere, dargestellte, genetische Elemente: *mob* = *plasmid mobilisation protein*, *aphII* = Kanamycinresistenzgen, *ori* = *origin of replication*, *CEN4/ARS1* = Centromer des IV Chromosoms und autonom replizierende Sequenz I. Schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung.

4 Zusammenfassung

Mikrobielle Sekundärmetabolite stellen eine reiche Quelle potenziell pharmazeutisch nutzbarer Naturstoffe dar, weshalb sie die wissenschaftliche Aufmerksamkeit schon lange auf sich ziehen. Das bioaktive Tripyrrolalkaloid Prodigiosin ist beispielsweise bereits gut untersucht. Allerdings umfasst die Klasse der Prodiginine noch weitere Substanzen mit ähnlichem Aufbau, die weit weniger untersucht wurden, da kein Zugang durch heterologe Produktion bestand. Entscheidend ist bei der entsprechenden Forschung unter anderem die Effektivität der Expressionssysteme.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das γ TREX-System daher genutzt, um heterologe Produktionsstämme bisher nicht produzierbarer Prodiginine sowie Stämme zur Effektivitätssteigerung der Mutasythese zu erzeugen. Es konnte dabei durch die Expression der Zykase Prub680 aus *P. rubra* in einem Prodigiosin produzierenden *P. putida*-Stamm die *in vivo* Umwandlung zu Cycloprodigiosin, sowie durch die Integration eines artifiziellen Genclusters aus *pig*-Genen von *S. marcescens* zur Biosynthese von Norprodigiosin, ebenfalls in *P. putida* die erstmalige heterologe Produktion von Norprodigiosin gezeigt werden. Zudem konnten, ebenfalls durch die Integration eines artifiziellen *pig*-Genclusters, Stämme erzeugt werden, welche aufgrund ihrer deutlich erhöhten Produktionsleistung der Bipyrrolvorstufe MBC die Effektivität der Mutasythese im Vergleich zum bisher genutzten Stamm erheblich steigern konnten.

Zudem konnte das bisher zur heterologen Expression genutzte γ TREX-System zu einer breit und flexibel anwendbaren γ TREX-*Toolbox* weiterentwickelt werden, welche die Handhabung und Anwendungsmöglichkeiten des Systems deutlich verbessern bzw. erweitern. Das System ermöglicht dabei eine einfache Klonierung sowie die Integration verschiedener genetischer Elemente nach standardisierten Verfahren. Durch die Auswahl aufeinander abgestimmter Gene, welche als Transkriptionsreporter und Selektionsmarker eingesetzt werden, können diese nach dem Modularitätsprinzip einzeln ausgetauscht werden, um eine maximale Flexibilität sowie die Auswahl zwischen händischem wie auch automatisiertem Screening zu ermöglichen. Außerdem kann durch die Wahl einer von drei Varianten des Grundvektors der gewünschte Integrationsmodus in das bakterielle Genom definiert werden, sodass die Anpassbarkeit des Systems an verschiedene Anforderungen der synthetischen Biologie hoch ist. Abschließend konnte die Funktionalität des Systems am Beispiel des Violacein-Genclusters demonstriert werden. Dabei konnte das Gencluster erfolgreich an zufälligen Orten, wie auch in spezifische 16S-Gene der *rrn*-Operons von *P. putida* genomisch integriert werden. Die erste Anwendung zeigte dabei die gute Eignung des Tn5-Konzepts als genomweite Screening-Methode, während die direkte Integration in die *rrn*-Operons von *P. putida* zur direkten Erzeugung von Stämmen mit hoher Produktionsleistung um 100 mg/l Deoxyviolacein führte.

5 Summary

Microbial secondary metabolites represent a rich source of potentially pharmaceutically useful natural products, which have attracted high scientific attention. The bioactive tripyrrole alkaloid prodigiosin, for example, has been well studied, but the class of prodiginins includes other substances with similar structures that have been studied much less, due to lack of access through heterologous production. Among other things, the effectiveness of the expression systems is crucial.

In this work, the γ TREX-System was used to generate heterologous production strains of previously inaccessible prodiginins, as well as strains to increase the efficiency of mutasynthesis. The expression of cyclase Prub680 from *P. rubra* in prodigiosin-producing *P. putida* strains was shown to lead to *in vivo* conversion to cycloprodigiosin. Moreover, the integration of an artificial cluster of prodigiosin genes from *S. marcescens* for the biosynthesis of norprodigiosin, also in *P. putida*, resulted in the first heterologous production of norprodigiosin. In addition, by integrating an artificial gene cluster, strains with significantly increased production capacity of the bipyrrrole precursor MBC were successfully constructed. These strains showed a considerably increased efficiency of mutasynthesis compared to the previously used strain.

The γ TREX-System previously used for heterologous expression was further developed into a broadly and flexibly applicable γ TREX-toolbox, which significantly improves and expands the handling and application of the system. The system allows easy cloning and integration of different genetic elements according to standardized procedures. Specifically selected genes, which are used as transcription reporters and selection markers, can be exchanged individually according to the modularity principle to allow maximum flexibility and the choice between manual and automated screening. In addition, by choosing one of three variants of the basic vector, the desired mode of integration into the bacterial genome can be defined, which facilitates high adaptability of the system to different requirements of synthetic biology. Finally, the functionality of the system was demonstrated using the violacein gene cluster as an example. The gene cluster was successfully genomically integrated into random sites as well as into specific 16S genes of the *rrn*-operons of *P. putida*. The first application thereby demonstrated the good suitability of the Tn5 concept as a genome-wide screening method, while the direct integration into the *rrn*-operons of *P. putida* led to the generation of strains with high production levels of around 100 mg/l deoxyviolacein.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Ahmetagic, Pemberton, 2010. Stable high level expression of the violacein indolocarbazole anti-tumour gene cluster and the *Streptomyces lividans amyA* gene in *E. coli* K12. Plasmid 63, 2, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2009.11.004>
- [2] AkadWi Hamburg, Academia Leopoldina, 2012. Antibiotika-Forschung: Probleme und Perspektiven. De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110306897>
- [3] Akkaya, Pérez-Pantoja, et al., 2018. The metabolic redox regime of *Pseudomonas putida* tunes its evolvability toward novel xenobiotic substrates. mBio 9, 4, e01512-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01512-18>
- [4] Akondi, Lakshmi, 2013. Emerging trends in genomic approaches for microbial bioprospecting. Omi. A J. Integr. Biol. 17, 2, 61–70. <https://doi.org/10.1089/omi.2012.0082>
- [5] Alihosseini, Lango, et al., 2009. Mutation of bacterium *Vibrio gazogenes* for selective preparation of colorants. Biotechnol. Prog. 26, 2, 352–360. <https://doi.org/10.1002/btpr.346>
- [6] Amann, Ludwig, et al., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59, 1, 143–169. <https://doi.org/10.1128/mr.59.1.143-169.1995>
- [7] Angov, 2011. Codon usage: Nature’s roadmap to expression and folding of proteins. Biotechnol. J. 6, 6, 650–659. <https://doi.org/10.1002/biot.201000332>
- [8] Antoine, Loch, 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from Gram-positive organisms. Mol. Microbiol. 6, 13, 1785–1799. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01351.x>
- [9] Aparicio, Jensen, et al., 2016. The Ssr protein (T1E_1405) from *Pseudomonas putida* DOT-T1E enables oligonucleotide-based recombineering in platform strain *P. putida* EM42. Biotechnol. J. 11, 10, 1309–1319. <https://doi.org/10.1002/biot.201600317>
- [10] Arciszewska, Drake, et al., 1989. Transposon Tn7. J. Mol. Biol. 207, 1, 35–52. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90439-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90439-7)
- [11] Austin, 2017. The value of cultures to modern microbiology. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. 110, 10, 1247–1256. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0840-8>
- [12] Bachmann, Van Lanen, et al., 2014. Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making? J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 41, 2, 175–184. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1389-9>
- [13] Backman, Ptashne, 1978. Maximizing gene expression on a plasmid using recombination *in vitro*. Cell 13, 1, 65–71. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90138-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90138-1)
- [14] Bagdasarian, Lurz, et al., 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. Gene 16, 1–3, 237–247. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(81\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(81)90080-9)

-
- [15] Belasco, 2010. All things must pass: contrasts and commonalities in eukaryotic and bacterial mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 7, 467–478. <https://doi.org/10.1038/nrm2917>
- [16] Bennett, Bentley, 2000. Seeing red: The story of prodigiosin, *Advances in Applied Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(00\)47000-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(00)47000-0)
- [17] Bernaudat, Frelet-Barrand, et al., 2011. Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host. *PLoS One* 6, 12, e29191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029191>
- [18] Bertani, 1951. Studies on Lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62, 3, 293–300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
- [19] Bhambhani, Kondhare, et al., 2021. Diversity in chemical structures and biological properties of plant alkaloids. *Molecules* 26, 11, 3374. <https://doi.org/10.3390/molecules26113374>
- [20] Bilsland, Tavella, et al., 2018. Antiplasmodial and trypanocidal activity of violacein and deoxyviolacein produced from synthetic operons. *BMC Biotechnol.* 18, 22. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0428-z>
- [21] Binder, Bier, et al., 2016. Photocaged arabinose: A novel optogenetic switch for rapid and gradual control of microbial gene expression. *ChemBioChem* 17, 4, 296–299. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500609>
- [22] Birch, 1963. The biosynthesis of antibiotics. *Pure Appl. Chem.* 7, 4, 527–537. <https://doi.org/10.1351/pac196307040527>
- [23] Birnboim, Doly, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 6, 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- [24] Bitzenhofer, Kruse, et al., 2021. Towards robust *Pseudomonas* cell factories to harbour novel biosynthetic pathways. *Essays Biochem.* 65, 2, 319–336. <https://doi.org/10.1042/EBC20200173>
- [25] Bodor, Bounedjoum, et al., 2020. Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 19, 1, 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4>
- [26] Bollinger, Thies, et al., 2020a. A novel polyester hydrolase from the marine bacterium *Pseudomonas aestusnigri* – structural and functional insights. *Front. Microbiol.* 11, 114. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00114>
- [27] Bollinger, Thies, et al., 2020b. The biotechnological potential of marine bacteria in the novel lineage of *Pseudomonas pertucinogena*. *Microb. Biotechnol.* 13, 1, 19–31. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13288>
- [28] Bonsall, Weller, et al., 1997. Quantification of 2,4-Diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. *In vitro* and in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3, 951–955. <https://doi.org/10.1128/aem.63.3.951-955.1997>
- [29] Boucher, Talbot, et al., 2009. Bad bugs, No drugs: no escape! An update from the infectious diseases society of america. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1, 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>
-

-
- [30] Bourgaud, Gravot, et al., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 161, 5, 839–851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- [31] Brands, Brass, et al., 2021a. KnowVolution of prodigiosin ligase PigC towards condensation of short-chain prodiginines. *Catal. Sci. Technol.* 11, 8, 2805–2815. <https://doi.org/10.1039/D0CY02297G>
- [32] Brands, Brass, et al., 2020. A colourimetric high-throughput screening system for directed evolution of prodigiosin ligase PigC. *Chem. Commun.* 56, 61, 8631–8634. <https://doi.org/10.1039/D0CC02181D>
- [33] Brands, Sikkens, et al., 2021b. Understanding substrate binding and the role of gatekeeping residues in PigC access tunnels. *Chem. Commun.* 57, 21, 2681–2684. <https://doi.org/10.1039/D0CC08226K>
- [34] Brass, Klein, et al., 2019. Condensing enzymes from *Pseudoalteromonadaceae* for prodiginine synthesis. *Adv. Synth. Catal.* 361, 11, 2659–2667. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900183>
- [35] Brieke, Kratzig, et al., 2015. Rapid access to glycopeptide antibiotic precursor peptides coupled with cytochrome P450-mediated catalysis: towards a biomimetic synthesis of glycopeptide antibiotics. *Org. Biomol. Chem.* 13, 7, 2012–2021. <https://doi.org/10.1039/C4OB02452D>
- [36] Brigulla, Wackernagel, 2010. Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 4, 1027–1041. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2489-3>
- [37] Brosius, Dull, et al., 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148, 2, 107–127. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90508-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90508-8)
- [38] Caretto, Linsalata, et al., 2015. Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 11, 26378–26394. <https://doi.org/10.3390/ijms161125967>
- [39] Chaves, Wilton, et al., 2020. Evaluation of chromosomal insertion loci in the *Pseudomonas putida* KT2440 genome for predictable biosystems design. *Metab. Eng. Commun.* 11, December 2020, e00139. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00139>
- [40] Chávez-Castilla, Aguilar, 2016. An integrated process for the in situ recovery of prodigiosin using micellar ATPS from a culture of *Serratia marcescens*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 11, 2896–2903. <https://doi.org/10.1002/jctb.4906>
- [41] Chawrai, Williamson, et al., 2012. Characterisation of PigC and HapC, the prodigiosin synthetases from *Serratia sp.* and *Hahella chejuensis* with potential for biocatalytic production of anticancer agents. *Chem. Sci.* 3, 2, 447–454. <https://doi.org/10.1039/C1SC00588J>
- [42] Chawrai, Williamson, et al., 2008. Chemoenzymatic synthesis of prodigiosin analogues—exploring the substrate specificity of PigC. *Chem. Commun.* 2008, 16, 1862–1864. <https://doi.org/10.1039/b719353j>

-
- [43] Choi, Cho, et al., 2018. Markerless gene knockout and integration to express heterologous biosynthetic gene clusters in *Pseudomonas putida*. *Metab. Eng.* 47, May 2018, 463–474. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.003>
- [44] Choi, Gaynor, et al., 2005. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* 2, 6, 443–448. <https://doi.org/10.1038/nmeth765>
- [45] Choi, Lim, et al., 2021. Biotechnological activities and applications of bacterial pigments violacein and prodigiosin. *J. Biol. Eng.* 15, 10. <https://doi.org/10.1186/s13036-021-00262-9>
- [46] Choi, Yoon, et al., 2015. Violacein: properties and production of a versatile bacterial pigment. *Biomed Res. Int.* August 2015, Special Issue, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/465056>
- [47] Chung, Lee, 2012. Computational codon optimization of synthetic gene for protein expression. *BMC Syst. Biol.* 6, 134. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-134>
- [48] Condon, French, et al., 1993. Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies. *EMBO J.* 12, 11, 4305–4315. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06115.x>
- [49] Condon, Liveris, et al., 1995. rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of rrn inactivation. *J. Bacteriol.* 177, 14, 4152–4156. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4152-4156.1995>
- [50] Cook, Jacobson, et al., 2021. Stepwise genetic engineering of *Pseudomonas putida* enables robust heterologous production of prodigiosin and glidobactin A. *Metab. Eng.* 67, September 2021, 112–124. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.06.004>
- [51] Cordell, Quinn-Beattie, et al., 2001. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phyther. Res.* 15, 3, 183–205. <https://doi.org/10.1002/ptr.890>
- [52] Cragg, Newman, 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 6, 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- [53] da Cunha, Zoio, et al., 2021. Technologies for high-throughput identification of antibiotic mechanism of action. *Antibiotics* 10, 5, 565. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050565>
- [54] Darshan, Manonmani, 2016. Prodigiosin inhibits motility and activates bacterial cell death revealing molecular biomarkers of programmed cell death. *AMB Express* 6, 50, 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0222-z>
- [55] Darshan, Manonmani, 2015. Prodigiosin and its potential applications. *J. Food Sci. Technol.* 52, 9, 5393–5407. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1740-4>
- [56] de Lorenzo, Eltis, et al., 1993. Analysis of *Pseudomonas* gene products using lacIq/P_{trp}-lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* 123, 1, 17–24. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90533-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90533-9)
- [57] de Lorenzo, Herrero, et al., 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172, 11, 6568–6572. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6568-6572.1990>
-

- [58] de Rond, Stow, et al., 2017. Oxidative cyclization of prodigiosin by an alkylglycerol monooxygenase-like enzyme. *Nat. Chem. Biol.* 13, Brief Communication, 1155–1157. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2471>
- [59] Demain, 1974. How do antibiotic-producing microorganisms avoid suicide? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235, 1, 601–612. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1974.tb43294.x>
- [60] Deutscher, 2015. How bacterial cells keep ribonucleases under control. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 3, 350–361. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv012>
- [61] Domínguez-Cuevas, González-Pastor, et al., 2006. Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J. Biol. Chem.* 281, 17, 11981–11991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509848200>
- [62] Domröse, 2016. Anwendung und Optimierung des TRES-Systems zur effektiven heterologen Sekundärmetabolit-Produktion in *Pseudomonas putida*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [63] Domröse, Hage-Hülsmann, et al., 2019. *Pseudomonas putida* rDNA is a favored site for the expression of biosynthetic genes. *Sci. Rep.* 9, 7028, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43405-1>
- [64] Domröse, Klein, et al., 2015. Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*. *Front. Microbiol.* 6, 972. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00972>
- [65] Domröse, Weihmann, et al., 2017. Rapid generation of recombinant *Pseudomonas putida* secondary metabolite producers using γ TRES. *Synth. Syst. Biotechnol.* 2, 4, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.11.001>
- [66] Duan, Reimer, et al., 2014. Differential expression of the seven rRNA operon promoters from the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *FEMS Microbiol. Lett.* 361, 2, 181–189. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12629>
- [67] Durán, Justo, et al., 2016. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein- its main secondary metabolite: A review. *Biotechnol. Adv.* 34, 5, 1030–1045. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.003>
- [68] Durán, Menck, 2001. *Chromobacterium violaceum* : A review of pharmacological and industrial perspectives. *Crit. Rev. Microbiol.* 27, 3, 201–222. <https://doi.org/10.1080/20014091096747>
- [69] Eichner, Knobloch, et al., 2012. The interplay between mutasynthesis and semisynthesis: generation and evaluation of an ansamitocin library. *Angew. Chemie Int. Ed.* 51, 3, 752–757. <https://doi.org/10.1002/anie.201106249>
- [70] Eltoukhy, Jia, et al., 2020. Biodegradation of endocrine disruptor bisphenol A by *Pseudomonas putida* strain YC-AE1 isolated from polluted soil, Guangdong, China. *BMC Microbiol.* 20, 11, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-1699-9>
- [71] Fair, Tor, 2014. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect. Medicin. Chem.* 6, 2014. <https://doi.org/10.4137/PMC.S14459>

- [72] Fang, Zhang, et al., 2015. High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway. *Microb. Cell Fact.* 14, 8. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0192-x>
- [73] Feitelson, Hopwood, 1983. Cloning of a *Streptomyces* gene for an O-methyltransferase involved in antibiotic biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* MGG 190, 3, 394–398. <https://doi.org/10.1007/BF00331065>
- [74] Feitelson, Malpartida, et al., 1985. Genetic and biochemical characterization of the red gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 131, 9, 2431–41. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-9-2431>
- [75] Fernández, Conde, et al., 2012. Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2, 1001–1009. <https://doi.org/10.1128/AAC.05398-11>
- [76] Fernández, Duque, et al., 2009. Microbial responses to xenobiotic compounds. Identification of genes that allow *Pseudomonas putida* KT2440 to cope with 2,4,6-trinitrotoluene. *Microb. Biotechnol.* 2, 2, 287–294. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00085.x>
- [77] Fernández, Pizarro, 1997. High-performance liquid chromatographic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *J. Chromatogr. A* 771, 1–2, 99–104. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00092-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00092-7)
- [78] Firn, Jones, 2003. Natural products - a simple model to explain chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.* 20, 4, 382–391. <https://doi.org/10.1039/b208815k>
- [79] Francisco, Campbell, et al., 1993. Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 22, 10444–10448. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10444>
- [80] Friedrich, 2006. Die Geschichte der β -Lactam-Antibiotika: Zwischen Zufall und gezielter Entwicklung. *Pharm. Unserer Zeit* 35, 5, 392–398. <https://doi.org/10.1002/pauz.200600184>
- [81] Fu, Wenzel, et al., 2008. Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition. *Nucleic Acids Res.* 36, 17, e113. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn499>
- [82] Fuglsang, 2003. Codon optimizer: a freeware tool for codon optimization. *Protein Expr. Purif.* 31, 2, 247–249. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00213-4](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00213-4)
- [83] Funk A., 2018. Anwendung der yTREX Toolbox zur heterologen Biosynthese von Naturstoffen in *Pseudomonas putida*. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [84] Fürstner, 2003. Chemie und Biologie des Roseophilins und der Prodigiosin-Alkaloide: 2500 Jahre im Überblick. *Angew. Chemie* 115, 31, 3706–3728. <https://doi.org/10.1002/ange.200300582>
- [85] Galm, Shen, 2006. Expression of biosynthetic gene clusters in heterologous hosts for natural product production and combinatorial biosynthesis. *Expert Opin. Drug Discov.* 1, 5, 409–437. <https://doi.org/10.1517/17460441.1.5.409>

-
- [86] Garlaschelli, 1999. Chemie der Wunder. Chemie unserer Zeit 33, 3, 152–157. <https://doi.org/10.1002/ciuz.19990330304>
- [87] Garrett, Grisham, 2009. Biochemistry, 4th ed. Cengage Learning Services.
- [88] Gätgens F., 2022. Evaluierung eines neuen Mutasyntesystems mit verbesserter Bipyrrrol-Synthesekapazität zur optimierten Gewinnung von Prodigininen. Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [89] Gauthier, 1976. *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 4, 459–466. <https://doi.org/10.1099/00207713-26-4-459>
- [90] Gay, Le Coq, et al., 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 164, 2, 918–921. <https://doi.org/10.1128/jb.164.2.918-921.1985>
- [91] Ge, Huang, et al., 2004. Phenazine-1-carboxylic acid is negatively regulated and pyoluteorin positively regulated by *gacA* in *Pseudomonas* sp. M18. FEMS Microbiol. Lett. 237, 1, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.028>
- [92] Gerber, 1983. Cycloprodigiosin from *beneckeia gazogenes*. Tetrahedron Lett. 24, 27, 2797–2798. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)88026-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)88026-0)
- [93] Gerber, 1975. Prodigiosin-like pigments. CRC Crit. Rev. Microbiol. 3, 4, 469–485. <https://doi.org/10.3109/10408417509108758>
- [94] Gerber, Gauthier, 1979. New prodigiosin-like pigment from *Alteromonas rubra*. Appl. Environ. Microbiol. 37, 6, 1176–1179. <https://doi.org/10.1128/aem.37.6.1176-1179.1979>
- [95] Gershenzon, Dudareva, 2007. The function of terpene natural products in the natural world. Nat. Chem. Biol. 3, 7, 408–414. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>
- [96] Gibson, 2014. Programming biological operating systems: genome design, assembly and activation. Nat. Methods 11, 5, 521–526. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2894>
- [97] Gibson, Benders, et al., 2008. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 51, 20404–20409. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811011106>
- [98] Gietz, Schiestl, 2007. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nat. Protoc. 2, 1, 35–37. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.14>
- [99] Goryshin, Reznikoff, 1998. Tn5 *in vitro* transposition. J. Biol. Chem. 273, 13, 7367–7374. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7367>
- [100] Gradmann, 2014. Antibiotika und Antibiotikaresistenz – Infektionskrankheiten und ihre Kontrolle im 20. Jahrhundert. Krankenhaushygiene up2date 09, 02, 109–121. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1377297>
- [101] Grant, Jessee, et al., 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 12, 4645–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4645>

-
- [102]Green, R, Sambrook, 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [103]Green, Bouchier, et al., 2012. Insertion site preference of mu, Tn5, and Tn7 transposons. *Mob. DNA* 3, 3, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-3-3>
- [104]Grimont, Grimont, 1978. The genus *serratia*. *Annu. Rev. Microbiol.* 32, 1978, 221–248. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.32.100178.001253>
- [105]Grohmann, Muth, et al., 2003. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 2, 277–301. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.2.277-301.2003>
- [106]Haavik, 1979. On the physiological meaning of secondary metabolism. *Folia Microbiol. (Praha)*. 24, 4, 365–367.
- [107]Han, Xiang, et al., 2021. High-level production of microbial prodigiosin: A review. *J. Basic Microbiol.* 61, 6, 506–523. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100101>
- [108]Hanahan, 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 4, 557–580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
- [109]Handelsman, 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 4, 669–685. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>
- [110]Hanson, 2003. The classes of natural product and their isolation, in: Hanson (Ed.), *Natural Products: The Secondary Metabolites*. pp. 1–34. <https://doi.org/10.1039/9781847551535-00001>
- [111]Hanukoglu, 2015. Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 43, 3, 206–209. <https://doi.org/10.1002/bmb.20849>
- [112]Hearn, Worthington, et al., 1964. Norprodigiosin: Occurrence in a mutant of *Serratia marcescens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 5, 517–520. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(64\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(64)90057-9)
- [113]Heyer, Kanaar, 2004. Recombination mechanisms: Fortieth anniversary meeting of the holliday model. *Mol. Cell* 16, 1, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.09.025>
- [114]Hilgers, F. 2016. Light-controlled production of bacterial secondary metabolites. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [115]Hiraoka, Yang, et al., 2016. Metagenomics and bioinformatics in microbial ecology: current status and beyond. *Microbes Environ.* 31, 3, 204–212. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME16024>
- [116]Hmelo, Borlee, et al., 2015. Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. *Nat. Protoc.* 10, 11, 1820–1841. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.115>
- [117]Horwitz, Chua, et al., 1964. Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-Indolyl- β -D-glycopyranosides 1a. *J. Med. Chem.* 7, 4, 574–575. <https://doi.org/10.1021/jm00334a044>

- [118]Hoshino, 2011. Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. Appl. Microbiol. Biotechnol. 91, 6, 1463–1475. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3468-z>
- [119]Hu, Withall, et al., 2016. Structure, chemical synthesis, and biosynthesis of prodiginine natural products. Chem. Rev. 116, 14, 7818–7853. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00024>
- [120]Huang, Rehm, et al., 2009. Recovery of DNA sequences flanking P-element insertions in *Drosophila*: Inverse PCR and plasmid rescue. Cold Spring Harb. Protoc. 2009, 4, 1–6. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5199>
- [121]Huang, Wilks, 2017. A rapid seamless method for gene knockout in *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiol. 17, 1, 199. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1112-5>
- [122]Huo, Hug, et al., 2019. Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways. Nat. Prod. Rep. 36, 10, 1412–1436. <https://doi.org/10.1039/C8NP00091C>
- [123]Ibrahim, 2019. Identifizierung von Zwischen- und Endprodukten der Prodiginin-Biosynthese in rekombinanten *Pseudomonas putida* Stämmen. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [124]Iqbal, Low-Beinart, et al., 2016. Natural product discovery through improved functional metagenomics in *Streptomyces*. J. Am. Chem. Soc. 138, 30, 9341–9344. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b02921>
- [125]Jasin, 1996. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. Trends Genet. 12, 6, 224–228. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(96\)10019-6](https://doi.org/10.1016/0168-9525(96)10019-6)
- [126]Jefferson, Burgess, et al., 1986. *beta*-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 22, 8447–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.22.8447>
- [127]Jiang, Wang, et al., 2010. Reconstruction of the violacein biosynthetic pathway from *Duganella* sp. B2 in different heterologous hosts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 4, 1077–88. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2375-z>
- [128]Johnson, de Rond, et al., 2015. Synthesis of cycloprodiginosin identifies the natural isolate as a scalemic mixture. Org. Lett. 17, 14, 3474–3477. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01527>
- [129]Jones, Firn, 1991. On the evolution of plant secondary chemical diversity. Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci. 333, 1267, 273–280. <https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0077>
- [130]Juers, Matthews, et al., 2012. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. Protein Sci. 21, 12, 1792–1807. <https://doi.org/10.1002/pro.2165>
- [131]Kaiser, 1994. Methods in yeast genetics a cold spring harbor laboratory course manual. Cold Spring Harb. Lab. Press 9, 2.
- [132]Karibasappa, Singh, et al., 2021. Concept of effectors and receptors in improving plant immunity, in: Emerging trends in plant pathology. Springer Singapore, Singapore, pp. 475–497. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6275-4_22

- [133]Katz, Hover, et al., 2016. Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 2–3, 129–141. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1706-6>
- [134]Katzke, Arvani, et al., 2010. A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Expr. Purif.* 69, 2, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.08.008>
- [135]Kawauchi, Shibutani, et al., 1997. A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 3, 543–547. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7186>
- [136]Kennedy, 2008. Mutasynthesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products. *Nat. Prod. Rep.* 25, 1, 25–34. <https://doi.org/10.1039/B707678A>
- [137]Kenshole, Herisse, et al., 2021. Natural product discovery through microbial genome mining. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 60, Omics, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.07.010>
- [138]Keseler, Kaiser, 1997. σ 54 , a vital protein for *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5, 1979–1984. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1979>
- [139]Kessler, de Lorenzo, et al., 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the *Pm* promoter of the *TOL* plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* 233, 1–2, 293–301. <https://doi.org/10.1007/BF00587591>
- [140]Kiessling, Platzer, et al., 1984. Plasmid rescue - a tool for reproducible recovery of genes from transfected mammalian cells? *Mol. Gen. Genet.* 193, 3, 513–519. <https://doi.org/10.1007/BF00382092>
- [141]Kim, Feng, et al., 2010. Cloning large natural product gene clusters from the environment: piecing environmental DNA gene clusters back together with TAR. *Biopolymers* 93, 9, 833–844. <https://doi.org/10.1002/bip.21450>
- [142]Kim, Hayashi, et al., 1999. Cycloprodigiosin hydrochloride obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans* is a potent antimalarial agent. *Biol. Pharm. Bull.* 22, 5, 532–534. <https://doi.org/10.1248/bpb.22.532>
- [143]Kim, Lee, et al., 2007. Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *J. Appl. Microbiol.* 102, 4, 937–944. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03172.x>
- [144]Kirschning, Hahn, 2012. Merging chemical synthesis and biosynthesis: A new chapter in the total synthesis of natural products and natural product libraries. *Angew. Chemie Int. Ed.* 51, 17, 4012–4022. <https://doi.org/10.1002/anie.201107386>
- [145]Kirschning, Taft, et al., 2007. Total synthesis approaches to natural product derivatives based on the combination of chemical synthesis and metabolic engineering. *Org. Biomol. Chem.* 5, 20, 3245–3259. <https://doi.org/10.1039/b709549j>

- [146] Klein, Brass, et al., 2018. Preparation of cyclic prodiginines by mutasynthesis in *Pseudomonas putida* KT2440. *ChemBioChem* 19, 14, 1545–1552. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800154>
- [147] Klein, Domröse, et al., 2017. New prodigiosin derivatives obtained by mutasynthesis in *Pseudomonas putida*. *ACS Synth. Biol.* 6, 9, 1757–1765. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00099>
- [148] Kloepfer, 1973. Struktur und Funktion von Ribosomen. *Chemie unserer Zeit* 7, 2, 49–58. <https://doi.org/10.1002/ciuz.19730070204>
- [149] Kodaka, Ishikawa, et al., 1995. Evaluation of new medium with chromogenic substrates for members of the family *Enterobacteriaceae* in urine samples. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1, 199–201. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.1.199-201.1995>
- [150] Kofler, F. 2019. Erstellung einer Toolbox von integrativen Vektoren zur heterologen Genexpression in *Pseudomonas putida*. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [151] Koh, 2013. Chapter two - storage of bacteria and yeast., in: *Methods in enzymology*. Elsevier Inc., pp. 15–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00002-7>
- [152] Kossel, 1891. Über die chemische Zusammensetzung der Zelle. *Arch. für Physiol.* 181–186.
- [153] Kouprina, Annab, et al., 1998. Functional copies of a human gene can be directly isolated by transformation-associated recombination cloning with a small 3' end target sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8, 4469–4474. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4469>
- [154] Kouprina, Larionov, 2006. TAR cloning: insights into gene function, long-range haplotypes and genome structure and evolution. *Nat. Rev. Genet.* 7, 10, 805–812. <https://doi.org/10.1038/nrg1943>
- [155] Kovach, Elzer, et al., 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 1, 175–176. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00584-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00584-1)
- [156] Krishna, Vani, et al., 2013. In – silico molecular docking analysis of prodigiosin and cycloprodigiosin as COX-2 inhibitors. *Springerplus* 2, 2013, 172. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-172>
- [157] Kruse, L. 2017. TREX-vermittelte Integration des pig -Genclusters in *Pseudomonas putida* - Abhängigkeit der Prodigiosin-Produktion vom Insertionsort im rRNA-Operon. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [158] Kubicki, 2020. *Pseudomonas putida* als Zellfabrik zur Produktion von Rhamnolipiden. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [159] Kurylo, Parks, et al., 2018. Endogenous rRNA sequence variation can regulate stress response gene expression and phenotype. *Cell Rep.* 25, 1, 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.093>
- [160] Labrum, Bunting, 1953. Spontaneous and induced color-variation of the HY strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 65, 4, 394–404. <https://doi.org/10.1128/jb.65.4.394-404.1953>

-
- [161] Leary, McLaughlin, et al., 1996. New methods for detection, analysis, and isolation of rare cell populations, in: Farkas, Leif, et al. (Eds.), *Optical diagnostics of living cells and biofluids*. pp. 240–253. <https://doi.org/10.1117/12.239512>
- [162] Lee, Aswani, et al., 2013. Expression-level optimization of a multi-enzyme pathway in the absence of a high-throughput assay. *Nucleic Acids Res.* 41, 22, 10668–10678. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt809>
- [163] Lee, Kim, et al., 2011. Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 14, 4967–4973. <https://doi.org/10.1128/AEM.01986-10>
- [164] Lieder, Jahn, et al., 2014. Subpopulation-proteomics reveal growth rate, but not cell cycling, as a major impact on protein composition in *Pseudomonas putida* KT2440. *AMB Express* 4, 71, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0071-6>
- [165] Locey, Lennon, 2016. Scaling laws predict global microbial diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 21, 5970–5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>
- [166] Loeschcke, 2012. Funktionelle Koexpression geclusterter Gene in verschiedenen Bakterien mithilfe des TREX-Systems. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [167] Loeschcke, Markert, et al., 2013. TREX: A universal tool for the transfer and expression of biosynthetic pathways in bacteria. *ACS Synth. Biol.* 2, 1, 22–33. <https://doi.org/10.1021/sb3000657>
- [168] Loeschcke, Thies, 2020. Engineering of natural product biosynthesis in *Pseudomonas putida*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 65, Pharmaceutical Biotechnology, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.03.007>
- [169] Loeschcke, Thies, 2015. *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 15, 6197–6214. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6745-4>
- [170] Ma, Kunes, et al., 1987. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* 58, 2–3, 201–216. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90376-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90376-3)
- [171] Maeda, Shimada, et al., 2015. Strength and regulation of seven rRNA promoters in *Escherichia coli*. *PLoS One* 10, 12, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144697>
- [172] Mahoney, Smith, et al., 2014. Access to high value natural and unnatural products through hyphenating chemical synthesis and biosynthesis. *Synthesis (Stuttg)*. 46, 16, 2122–2132. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1378359>
- [173] Mairhofer, Scharl, et al., 2013. Comparative transcription profiling and in-depth characterization of plasmid-based and plasmid-free *Escherichia coli* expression systems under production conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 12, 3802–3812. <https://doi.org/10.1128/AEM.00365-13>
- [174] Martínez-García, Aparicio, et al., 2015. SEVA 2.0: An update of the standard european vector architecture for de-/re-construction of bacterial functionalities. *Nucleic Acids Res.* 43, D1, D1183–D1189. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1114>
-

-
- [175] Martínez-García, de Lorenzo, 2011. Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 13, 10, 2702–2716. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x>
- [176] Martínez-García, Nickel, et al., 2014. *Pseudomonas* 2.0: genetic upgrading of *P. putida* KT2440 as an enhanced host for heterologous gene expression. *Microb. Cell Fact.* 13, 159, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0159-3>
- [177] Matz, Webb, et al., 2008. Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. *PLoS One* 3, 7, e2744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002744>
- [178] McAllister, Morris, et al., 1981. Utilization of bacteriophage T7 late promoters in recombinant plasmids during infection. *J. Mol. Biol.* 153, 3, 527–544. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90406-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90406-x)
- [179] Medema, Blin, et al., 2011a. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* 39, Issue suppl_2, W339-346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
- [180] Medema, Breitling, et al., 2011b. Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 2, 131–137. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2478>
- [181] Medema, van Raaphorst, et al., 2012. Computational tools for the synthetic design of biochemical pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 3, 191–202. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2717>
- [182] Medina-Castro, 1969. Norprodigiosin. Iowa State University, Digital Repository, Ames. <https://doi.org/10.31274/rtd-180813-3360>
- [183] Melo, 2003. Violacein and its β -cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. *Toxicology* 186, 3, 217–225. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00751-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00751-5)
- [184] Melvin, Tomlinson, et al., 2002. Influence of the A-ring on the proton affinity and anticancer properties of the prodigiosins. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 5, 734–741. <https://doi.org/10.1021/tx025507x>
- [185] Menzella, 2011. Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 10, 15, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-15>
- [186] Mi, Becher, et al., 2014. De novo production of the monoterpenoid geranic acid by metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Microb. Cell Fact.* 13, 170, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0170-8>
- [187] Mignon, Mariano, et al., 2018. Codon harmonization – going beyond the speed limit for protein expression. *FEBS Lett.* 592, 9, 1554–1564. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13046>
- [188] Miller, Jeffrey H., 1972. β -galactosidase assay, *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, pp. 352–355
- [189] Miller, J. H., 1972. *Experiments in molecular genetics*. pp. 328–330

- [190] Mody, Heidarynejad, et al., 1990. Isolation and characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in prodigiosin biosynthesis. *Curr. Microbiol.* 20, 2, 95–103. <https://doi.org/10.1007/BF02092880>
- [191] Molitor, Bollinger, et al., 2020. Agar plate-based screening methods for the identification of polyester hydrolysis by *Pseudomonas* species. *Microb. Biotechnol.* 13, 1, 274–284. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13418>
- [192] Momen, Mizuoka, et al., 1998. Studies on the biosynthesis of violacein. Part 9.1 green pigments possessing tetraindole and dipyrromethene moieties, chromoviridans and deoxychromoviridans, produced by a cell-free extract of *Chromobacterium violaceum* and their biosynthetic origin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1, 18, 3087–3092. <https://doi.org/10.1039/a803617i>
- [193] Monteilhet, Perrin, et al., 1990. Purification and characterization of the *in vitro* activity of I-SceI, a novel and highly specific endonuclease encoded by a group I intron. *Nucleic Acids Res.* 18, 6, 1407–1413. <https://doi.org/10.1093/nar/18.6.1407>
- [194] Mullis, Faloona, 1987. [21] Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction, in: *Methods in Enzymology*. pp. 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- [195] Naville, Ghuillot-Gaudeffroy, et al., 2011. ARNold: A web tool for the prediction of *Rho*-independent transcription terminators. *RNA Biol.* 8, 1, 11–13. <https://doi.org/10.4161/rna.8.1.13346>
- [196] Nazareno, Acharya, et al., 2021. A mini-Tn5-derived transposon with reportable and selectable markers enables rapid generation and screening of insertional mutants in Gram-negative bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 72, 3, 283–291. <https://doi.org/10.1111/lam.13423>
- [197] Nelson, Weinel, et al., 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4, 12, 799–808. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>
- [198] Newman, Cragg, 2020. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 83, 3, 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- [199] Newman, Cragg, 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 3, 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- [200] Ngo, Nakata, et al., 2016. Spatially organized enzymes drive cofactor-coupled cascade reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 9, 3012–3021. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b10198>
- [201] Nogales, Mueller, et al., 2020. High-quality genome-scale metabolic modelling of *Pseudomonas putida* highlights its broad metabolic capabilities. *Environ. Microbiol.* 22, 1, 255–269. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14843>
- [202] Oldenburg, 1997. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. *Nucleic Acids Res.* 25, 2, 451–452. <https://doi.org/10.1093/nar/25.2.451>

- [203] Ongley, Bian, et al., 2013. Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways. *Nat. Prod. Rep.* 30, 8, 1121–1138. <https://doi.org/10.1039/c3np70034h>
- [204] Otto, Wynands, et al., 2019. Targeting 16S rDNA for stable recombinant gene expression in *Pseudomonas*. *ACS Synth. Biol.* 8, 8, 1901–1912. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00195>
- [205] Overbye, Barrett, 2005. Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov. Today* 10, 1, 45–52. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03285-4](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03285-4)
- [206] Owen, Reddy, et al., 2013. Mapping gene clusters within arrayed metagenomic libraries to expand the structural diversity of biomedically relevant natural products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 29, 11797–11802. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222159110>
- [207] Park, Throop, et al., 2015. Site-specific recombinational cloning using gateway and in-fusion cloning schemes. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 110, 1, 3–20. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0320s110>
- [208] Paul, Cortez, et al., 2016. Metagenomic analysis of microbial community of an amazonian geothermal spring in Peru. *Genomics Data* 9, 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.06.013>
- [209] Perucho, Hanahan, et al., 1980. Isolation of the chicken thymidine kinase gene by plasmid rescue. *Nature* 285, 5762, 207–210. <https://doi.org/10.1038/285207a0>
- [210] Peters, Craig, 2001. Tn7: smarter than we thought. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 11, 806–814. <https://doi.org/10.1038/35099006>
- [211] Prentki, Krisch, 1984. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29, 3, 303–313. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(84\)90059-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(84)90059-3)
- [212] Pridmore, 1987. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* 56, 2–3, 309–312. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90149-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90149-1)
- [213] Priya, Srinivasa, et al., 2018. Production of violacein pigment from *Chromobacterium violaceum* and its antibacterial activity and synergism on *E. coli* from UTI samples. *Int. J. Recent Sci. Res.* 10, 2, 24479–24484. <https://doi.org/10.24327/IJRSR>
- [214] Projan, 2003. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 5, 427–430. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.08.003>
- [215] Qadri, Williams, 1973. Role of methionine in biosynthesis of prodigiosin by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 116, 3, 1191–1198. <https://doi.org/10.1128/jb.116.3.1191-1198.1973>
- [216] Quin, Wallin, et al., 2017. Spatial organization of multi-enzyme biocatalytic cascades. *Org. Biomol. Chem.* 15, 20, 4260–4271. <https://doi.org/10.1039/c7ob00391a>
- [217] Raghavan, Vivekanandan, 1999. Bioremediation of oil-spilled sites through seeding of naturally adapted *Pseudomonas putida*. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 44, 1, 29–32. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(99\)00048-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(99)00048-7)

- [218] Ramaprasad, Bharti, et al., 2015. *Zooshikella marina* sp. nov. a cycloprodigiosin- and prodigiosin-producing marine bacterium isolated from beach sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 12, 4669–4673. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000630>
- [219] Ramos-Díaz, Ramos, 1998. Combined physical and genetic map of the *Pseudomonas putida* KT2440 Chromosome. *J. Bacteriol.* 180, 23, 6352–6363. <https://doi.org/10.1128/JB.180.23.6352-6363.1998>
- [220] Rapoport, Holden, 1962. The synthesis of prodigiosin. *J. Am. Chem. Soc.* 84, 4, 635–642. <https://doi.org/10.1021/ja00863a026>
- [221] Ray, Rice, 2004. Wildcatters welcome: the need for new antimicrobial agents. *Therapy* 1, 1.
- [222] Reyrat, Pelicic, et al., 1998. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect. Immun.* 66, 9, 4011–4017. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.9.4011-4017.1998>
- [223] Reznikoff, 2008. Transposon Tn5. *Annu. Rev. Genet.* 42, 1, 269–286. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091656>
- [224] Reznikoff, 1993. The Tn5-Transposon. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 1, 945–963. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.47.1.945>
- [225] Rinehart, 1977. Mutasynthesis of new antibiotics. *Pure Appl. Chem.* 49, 9, 1361–1384. <https://doi.org/10.1351/pac197749091361>
- [226] Roca, Rodríguez-Herva, et al., 2008. Physiological responses of *Pseudomonas putida* to formaldehyde during detoxification. *Microb. Biotechnol.* 1, 2, 158–169. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2007.00014.x>
- [227] Rodrigues, Göcke, et al., 2012. Microbial production of the drugs violacein and deoxyviolacein: analytical development and strain comparison. *Biotechnol. Lett.* 34, 4, 717–20. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0827-x>
- [228] Rodrigues, Reker, et al., 2016. Counting on natural products for drug design. *Nat. Chem.* 8, 6, 531–41. <https://doi.org/10.1038/nchem.2479>
- [229] Rodrigues, Trachtmann, et al., 2013. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein. *Metab. Eng.* 20, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.08.004>
- [230] Roy, 2017. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants Antibacterial studies of medicinal plant View project. *Int. J. Plant Biotechnol.* 3, 2, 1–9.
- [231] Running, Bansal, 2016. Oxygen transfer rates in shaken culture vessels from Fernbach flasks to microtiter plates. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 8, 1729–35. <https://doi.org/10.1002/bit.25938>
- [232] Russell, Cook, 1995. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* 59, 1, 48–62. <https://doi.org/10.1128/mr.59.1.48-62.1995>
- [233] Saavedra, Schwartzman, et al., 2017. Mapping transposon insertions in bacterial genomes by arbitrarily primed PCR. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 118, 1, 15.15.1-15.15.15. <https://doi.org/10.1002/cpmb.38>

- [234]Saiki, Gelfand, et al., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 4839, 487–91. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- [235]Samad, Razak, et al., 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *J. Microbiol. Methods* 9, 1, 51–56. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(89\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0167-7012(89)90030-4)
- [236]Sánchez, Braña, et al., 2006. Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationship to indolocarbazole biosynthesis. *Chembiochem* 7, 8, 1231–40. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600029>
- [237]Sarovich, Pemberton, 2007. pPSX: A novel vector for the cloning and heterologous expression of antitumor antibiotic gene clusters. *Plasmid* 57, 3, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2006.11.004>
- [238]Schäberle, Hack, 2014. Overcoming the current deadlock in antibiotic research. *Trends Microbiol.* 22, 4, 165–7. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.007>
- [239]Schäfer, Tauch, et al., 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 1, 69–73. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7)
- [240]Schloss, Allen, et al., 2010. Psychrotrophic strain of *Janthinobacterium lividum* from a cold Alaskan soil produces prodigiosin. *DNA Cell Biol.* 29, 9, 533–41. <https://doi.org/10.1089/dna.2010.1020>
- [241]Schulz, Reznikoff, 1991. Translation initiation of IS50R read-through transcripts. *J. Mol. Biol.* 221, 1, 65–80. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)80205-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)80205-9)
- [242]Schwecke, Aparicio, et al., 1995. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 17, 7839–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7839>
- [243]Selinger, Saxena, et al., 2003. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res.* 13, 2, 216–23. <https://doi.org/10.1101/gr.912603>
- [244]Sester, Stür-Patowsky, et al., 2020. Biosynthetic plasticity enables production of fluorinated aurachins. *Chembiochem* 21, 16, 2268–2273. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000166>
- [245]Setiyono, Adhiwibawa, et al., 2020. An Indonesian marine bacterium, *Pseudoalteromonas rubra*, produces antimicrobial prodiginine pigments. *ACS Omega* 5, 9, 4626–4635. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04322>
- [246]Shaner, Campbell, et al., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 12, 1567–72. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>
- [247]Shaw, 1983. Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 14, 1, 1–46. <https://doi.org/10.3109/10409238309102789>

- [248]Shendure, Balasubramanian, et al., 2017. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature* 550, 7676, 345–353. <https://doi.org/10.1038/nature24286>
- [249]Sherman, 1991. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 194, 2002, 3–21. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94004-v](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94004-v)
- [250]Shlaes, 2010. Antibiotics the perfect storm. Springer Dordrecht, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9057-7>
- [251]Simon, O’Connell, et al., 1986. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* 118, 640–59. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)18106-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)18106-7)
- [252]Simon, Priefer, et al., 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* Genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1, 9, 784–791. <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>
- [253]Sipahi, 2008. Economics of antibiotic resistance. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 6, 4, 523–39. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.4.523>
- [254]Slager, Veening, 2016. Hard-wired control of bacterial processes by chromosomal gene location. *Trends Microbiol.* 24, 10, 788–800. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.003>
- [255]Solovyev, Salamov, 2011. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences, in: *Metagenomics and Its Applications in Agriculture, Biomedicine, and Environmental Studies*. Nova Science Publisher’s, pp. 61–78.
- [256]Song, Bae, et al., 2006. Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 2, 157–161. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.157>
- [257]Song, Woo, et al., 2016. 3’-UTR engineering to improve soluble expression and fine-tuning of activity of cascade enzymes in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 6, 29406. <https://doi.org/10.1038/srep29406>
- [258]Spellberg, Powers, et al., 2004. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin. Infect. Dis.* 38, 9, 1279–86. <https://doi.org/10.1086/420937>
- [259]Spiess, Bestvater, et al., 2005. Two-photon excitation and emission spectra of the green fluorescent protein variants ECFP, EGFP and EYFP. *J. Microsc.* 217, Pt 3, 200–4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2005.01437.x>
- [260]Springer, Kidan, et al., 2001. Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 10, 2877–84. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2877-2884.2001>
- [261]Stankovic, Senerovic, et al., 2014. Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9, 3841–58. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5590-1>
- [262]Steiniger, Adams, et al., 2006. Defining characteristics of Tn5 Transposase non-specific DNA binding. *Nucleic Acids Res.* 34, 9, 2820–32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl179>

- [263] Steinmetz, Le Coq, et al., 1985. The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol. Gen. Genet.* 200, 2, 220–8. <https://doi.org/10.1007/BF00425427>
- [264] Stevens, Hari, et al., 2013. The role of transcription in heterologous expression of polyketides in bacterial hosts. *Nat. Prod. Rep.* 30, 11, 1391–1411. <https://doi.org/10.1039/c3np70060g>
- [265] Stothard, 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28, 6, 1102–1104. <https://doi.org/10.2144/00286ir01>
- [266] Subach, Cranfill, et al., 2011. An enhanced monomeric blue fluorescent protein with the high chemical stability of the chromophore. *PLoS One* 6, 12, e28674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028674>
- [267] Subramaniam, Ravi, et al., 2014. Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic micro-organisms. *Pharm. Biol.* 52, 1, 86–90. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.815634>
- [268] Sun, Wang, et al., 2021. Enhanced prodigiosin production in *Serratia marcescens* JNB5-1 by introduction of a polynucleotide fragment into the pigN 3' untranslated region and disulfide bonds into O-methyl transferase (PigF). *Appl. Environ. Microbiol.* 87, 18, e0054321. <https://doi.org/10.1128/AEM.00543-21>
- [269] Sydor, Barry, et al., 2011. Regio- and stereodivergent antibiotic oxidative carbocyclizations catalysed by Rieske oxygenase-like enzymes. *Nat. Chem.* 3, 5, 388–392. <https://doi.org/10.1038/nchem.1024>
- [270] Szpirer, Faelen, et al., 2001. Mobilization function of the pBHR1 plasmid, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1. *J. Bacteriol.* 183, 6, 2101–10. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.2101-2110.2001>
- [271] Tabor, Richardson, 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4, 1074–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.4.1074>
- [272] Tan, Fu, et al., 2020. Genetic analysis and immunoelectron microscopy of wild and mutant strains of the rubber tree endophytic bacterium *Serratia marcescens* strain ITBB B5-1 reveal key roles of a macrovesicle in storage and secretion of prodigiosin. *J. Agric. Food Chem.* 68, 20, 5606–5615. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00078>
- [273] Tartoff, Hobbs, 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab.* 9, 12.
- [274] Thomas, Nielsen, 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 9, 711–21. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
- [275] Timmis, 2002. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ. Microbiol.* 4, 12, 779–781. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00365.x>

- [276]Tiso, Ihling, et al., 2020. Integration of genetic and process engineering for optimized rhamnolipid production using *Pseudomonas putida*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 976, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00976>
- [277]Tsao, Rudd, et al., 1985. Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 38, 1, 128–31. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.38.128>
- [278]Tu, Yin, et al., 2016. Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency. *Sci. Rep.* 6, 24648. <https://doi.org/10.1038/srep24648>
- [279]Tyo, Ajikumar, et al., 2009. Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. *Nat. Biotechnol.* 27, 8, 760–5. <https://doi.org/10.1038/nbt.1555>
- [280]Vaishnav, Demain, 2011. Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 29, 2, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.006>
- [281]Van Leeuwen, Andrews, et al., 2015. Construction of multifragment plasmids by homologous recombination in yeast. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2015, 9, 796–800. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084111>
- [282]Verpoorte, 2005. ALKALOIDS, *Encyclopedia of analytical science*. Elsevier, pp. 56–61. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00010-8>
- [283]Vogelstein, Gillespie, 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 2, 615–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.615>
- [284]von Nussbaum, Brands, et al., 2006. Antibakterielle Naturstoffe in der medizinischen Chemie – Exodus oder Renaissance? *Angew. Chemie* 118, 31, 5194–5254. <https://doi.org/10.1002/ange.200600350>
- [285]Wang, Li, et al., 2018. Bacteriophage T7 transcription system: an enabling tool in synthetic biology. *Biotechnol. Adv.* 36, 8, 2129–2137. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.001>
- [286]Wang, Stillman, 1993. Transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae* by a SIN3-LexA fusion protein. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3, 1805–1814. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.3.1805-1814.1993>
- [287]Wasserman, McKeon, et al., 1960. Prodigiosin. Structure and partial synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 82, 2, 506–507. <https://doi.org/10.1021/ja01487a075>
- [288]Weihmann, Domröse, et al., 2020. Protocols for yTREX/Tn5-based gene cluster expression in *Pseudomonas putida*. *Microb. Biotechnol.* 13, 1, 250–262. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13402>
- [289]Weimer, Kohlstedt, et al., 2020. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 18, 7745–7766. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10811-9>

- [290] Weiss, Jacquemin-Sablon, et al., 1968. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 243, 17, 4543–4555. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)93227-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)93227-8)
- [291] Weissman, 2007. Mutasyntesis – uniting chemistry and genetics for drug discovery. *Trends Biotechnol.* 25, 4, 139–142. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.02.004>
- [292] Weist, Süssmuth, 2005. Mutational biosynthesis--a tool for the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 2, 141–50. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1891-8>
- [293] Willems, De Mol, et al., 2020. Alkaloids from marine fungi: Promising antimicrobials. *Antibiotics* 9, 6, 340. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060340>
- [294] Williams, 1973. Biosynthesis of prodigiosin , a secondary metabolite of *Serratia marcescens* 25, 3, 396–402.
- [295] Williams, Goldschmidt, et al., 1965. Inhibition by temperature of the terminal step in biosynthesis of prodigiosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 2, 177–181. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(65\)90500-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(65)90500-0)
- [296] Williams, Green, 1956. Studies on pigmentation of *Serratia marcescense* III. The characteristics of an orange variant. *J. Bacteriol.* 72, 4, 537–542. <https://doi.org/10.1128/jb.72.4.537-542.1956>
- [297] Williamson, Fineran, et al., 2007. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. *Future Microbiol.* 2, 6, 605–18. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.6.605>
- [298] Williamson, Fineran, et al., 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 12, 887–899. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1531>
- [299] Williamson, Simonsen, et al., 2005. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylyl-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Mol. Microbiol.* 56, 4, 971–89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04602.x>
- [300] Wilson, Nierhaus, 2007. The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42, 3, 187–219. <https://doi.org/10.1080/10409230701360843>
- [301] Winand, Sester, et al., 2021. Bioengineering of anti-inflammatory natural products. *ChemMedChem* 16, 5, 767–776. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000771>
- [302] Winsor, Griffiths, et al., 2016. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* 44, D1, D646–53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227>
- [303] Wood, 1995. Marker proteins for gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 1, 50–8. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80009-3](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80009-3)
- [304] Wu, Chappell, 2008. Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 2, 145–52. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.007>
- [305] Wu, Yan, et al., 2016. Metabolic burden: Cornerstones in synthetic biology and metabolic engineering applications. *Trends Biotechnol.* 34, 8, 652–664.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.010>

- [306]Wyman, Ristic, et al., 2004. Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. 3, 8–9, 827–33. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.037>
- [307]Xing, Jiang, 2014. Recombinant bacteria for producing deoxyviolacein and uses thereof. Patent No US20110183384 A1 2, 12.
- [308]Yip, Mahalingam, et al., 2021. Prodigiosin inhibits bacterial growth and virulence factors as a potential physiological response to interspecies competition. *PLoS One* 16, 6, e0253445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253445>
- [309]You, Liu, et al., 2018. Characterization of a prodigiosin synthetase PigC from *Serratia marcescens* jx-1 and its application in prodigiosin analogue synthesis. *Biochem. Eng. J.* 134, 10, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.01.034>
- [310]Zhang, Tang, et al., 2017. Broad-host-range expression reveals native and host regulatory elements that influence heterologous antibiotic production in gram-negative bacteria. *MBio* 8, 5. <https://doi.org/10.1128/mBio.01291-17>
- [311]Zhang, Wang, et al., 2008. Bacterial hosts for natural product production. *Mol. Pharm.* 5, 2, 212–25. <https://doi.org/10.1021/mp7001329>
- [312]Zhou, Lancaster, et al., 2014. How the ribosome hands the A-site tRNA to the P-site during EF-G–catalyzed translocation. *Science* (80-.). 345, 6201, 1188–1191. <https://doi.org/10.1126/science.1255030>
- [313]Ziemert, Alanjary, et al., 2016. The evolution of genome mining in microbes - a review. *Nat. Prod. Rep.* 33, 8, 988–1005. <https://doi.org/10.1039/c6np00025h>

7 Anhang

7.1 Massenspektren der Rohextrakte von *P. putida*, *P. putida* pig21 und *P. putida* pig21-Prub680 im Rahmen der Cycloprodigiosinproduktion

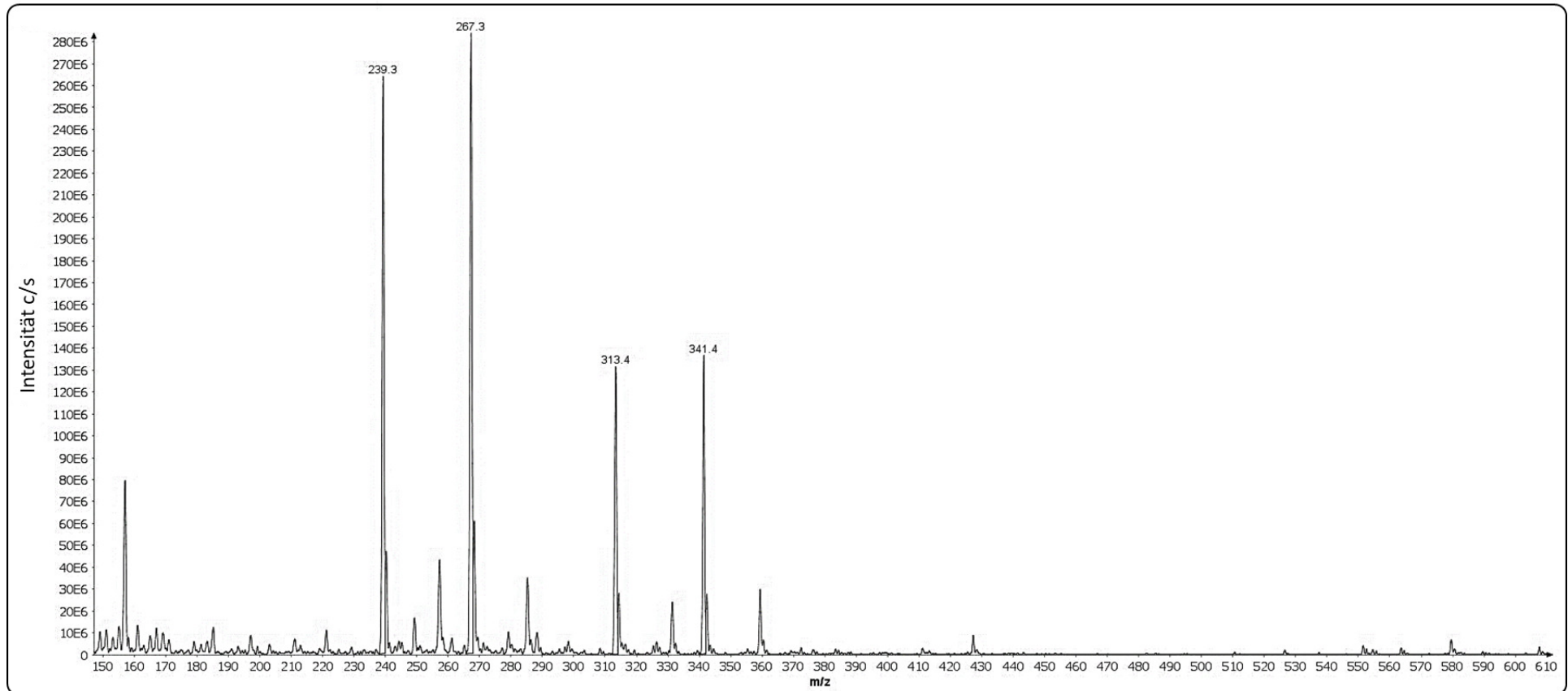


Abbildung 7-1: Massenspektrum eines Rohextrakts einer wildtypischen Negativkontrolle von *P. putida*

Zu sehen sind unspezifische Hintergrundsignale des Wildtypextrakts, während keine spezifischen Massen von Prodigiosin oder Cycloprodigiosin detektiert werden konnten.

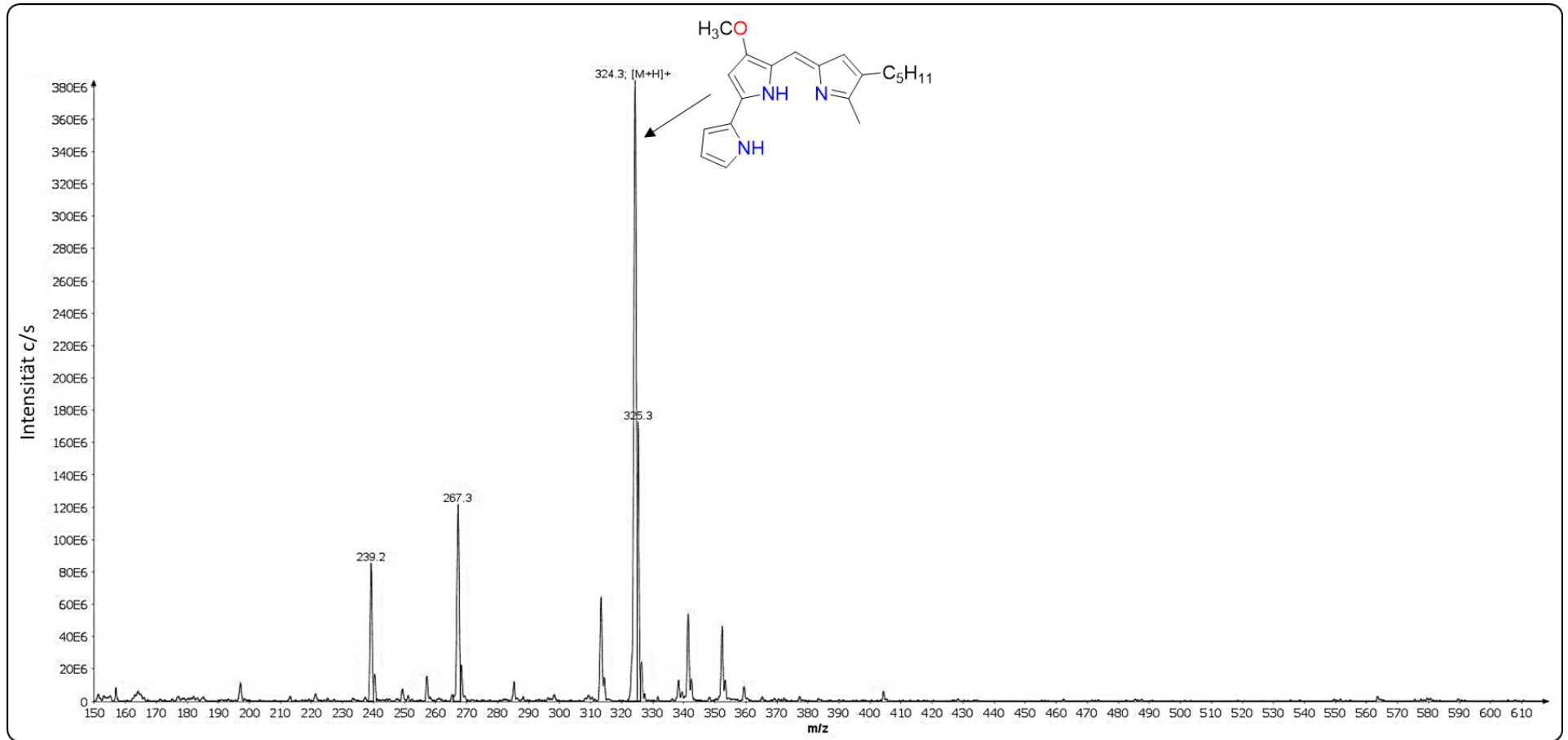


Abbildung 7-2: Massenspektrum eines Rohextrakts des Stammes *P. putida* pig21

Zu sehen sind erneut die unspezifische Hintergrundsignale des Wildtypextrakts, während in dieser Probe mit deutlich höherer Intensität die spezifische Masse von Prodigiosin (324,3 [M+H]⁺) detektiert werden konnte.

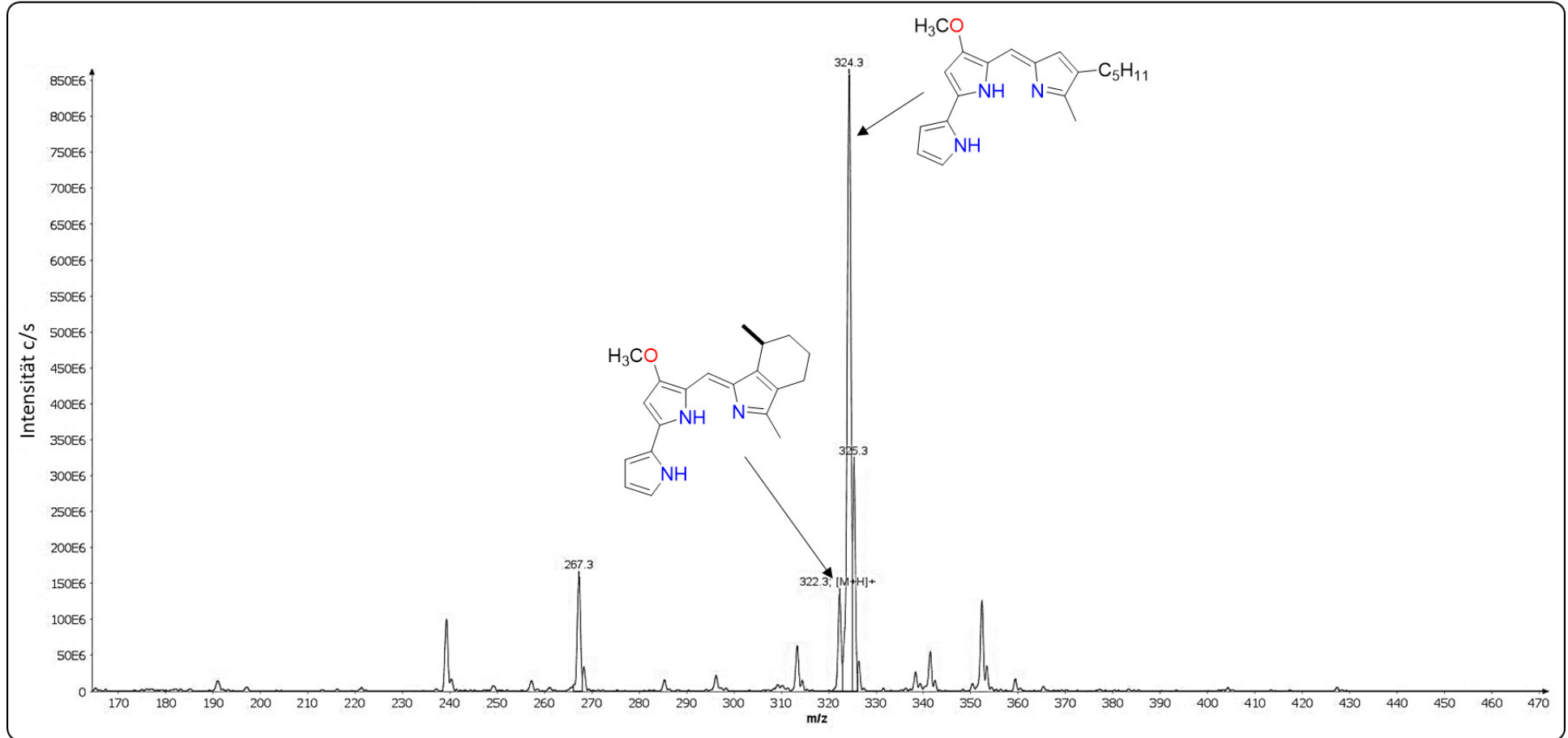


Abbildung 7-3: Massenspektrum eines Rohextrakts des Stammes *P. putida* pig21 bei gleichzeitiger Expression der Zykklase Prub680

Zu sehen sind erneut die unspezifische Hintergrundsignale des Wildtypextrakts, während in dieser Probe mit deutlich höherer Intensität die spezifischen Massen von Prodigiosin (324,3 [M+H]⁺) und Cycloprodigiosin (322,3 [M+H]⁺) detektiert werden konnten.

7.2 Chromatographie-Tests mit Isaspher C18-AQ Material

Die analytischen HPLC-Trennungen wurden im Rahmen dieser Arbeit grundsätzlich mit einer Accucore C18-Säule der Firma Thermo Scientific durchgeführt wie im Methodenteil beschrieben. Daneben wurden im Vorfeld zur chromatographischen äktabasierten Umkehrphasentrennung von Cycloprodigosin und Prodigiosin und der Isolierung einer norprodigosinhaltigen Fraktion zunächst Tests unterschiedlicher Laufmittelzusammensetzungen im kleinen Maßstab durchgeführt. Die hierzu genutzte Säule der Firma Isera (125 x 4 mm) war ebenso wie die zur äktabasierten Chromatographie verwendete Säule (150 x 20 mm) mit Isaspher C18-AQ Material (5 µm Partikelgröße) befüllt und lediglich kleiner dimensioniert. Ziel der Vorversuche, die an einer HPLC-Anlage mit PDA-Detektor (LC10Ai, Shimadzu) bei 35 °C Säulenofen und 1 ml/min Flussrate durchgeführt wurden, war eine möglichst hohe Trennauflösung bei möglichst geringem Druck. Daher sind die Drücke sowie die erhaltenen Signale aufgeführt. Die auf Basis dieser Ergebnisse zur Äkta-Chromatographie im größeren Maßstab übertragenen Bedingungen sind jeweils fett markiert.

Tabelle 7-1: Vortests zur Festlegung von Äkta-Chromatographiebedingungen zu Trennung von Prodigininen

Analysen von Extrakten aus cycloprodigosin-/prodigosinbildenden Zellen				
Laufmittel-Zusammensetzung Acetonitril : Wasser (jeweils + 0,1 % Formiat)	Druck (bar)	Retentionszeit Cycloprodigosin (λ_{\max} 537 nm) (min)	Retentionszeit Prodigosin (λ_{\max} 534 nm) (min)	Δ zwischen Peaks (min)
60 : 40	65	3,1	3,5	0,4
50 : 50	72	2,6	3,3	0,7
40 : 60	78	7,9	12,6	4,7
Analysen von Extrakten aus norprodigosinbildenden Zellen				
Laufmittel-Zusammensetzung Acetonitril : Wasser (jeweils + 0,1 % Formiat)	Druck (bar)	Retentionszeit Signal 1 (min)	Retentionszeit Signal 2 (Hauptsignal) (min)	Δ zwischen Peaks (min)
60 : 40	65	3,3	5,3	2
50 : 50	72	2,9	7,2	4,3
40 : 60	78	unklar	15	-

7.3 Die YT_core-Sequenz als Basis des yTREX-Toolbox-Systems

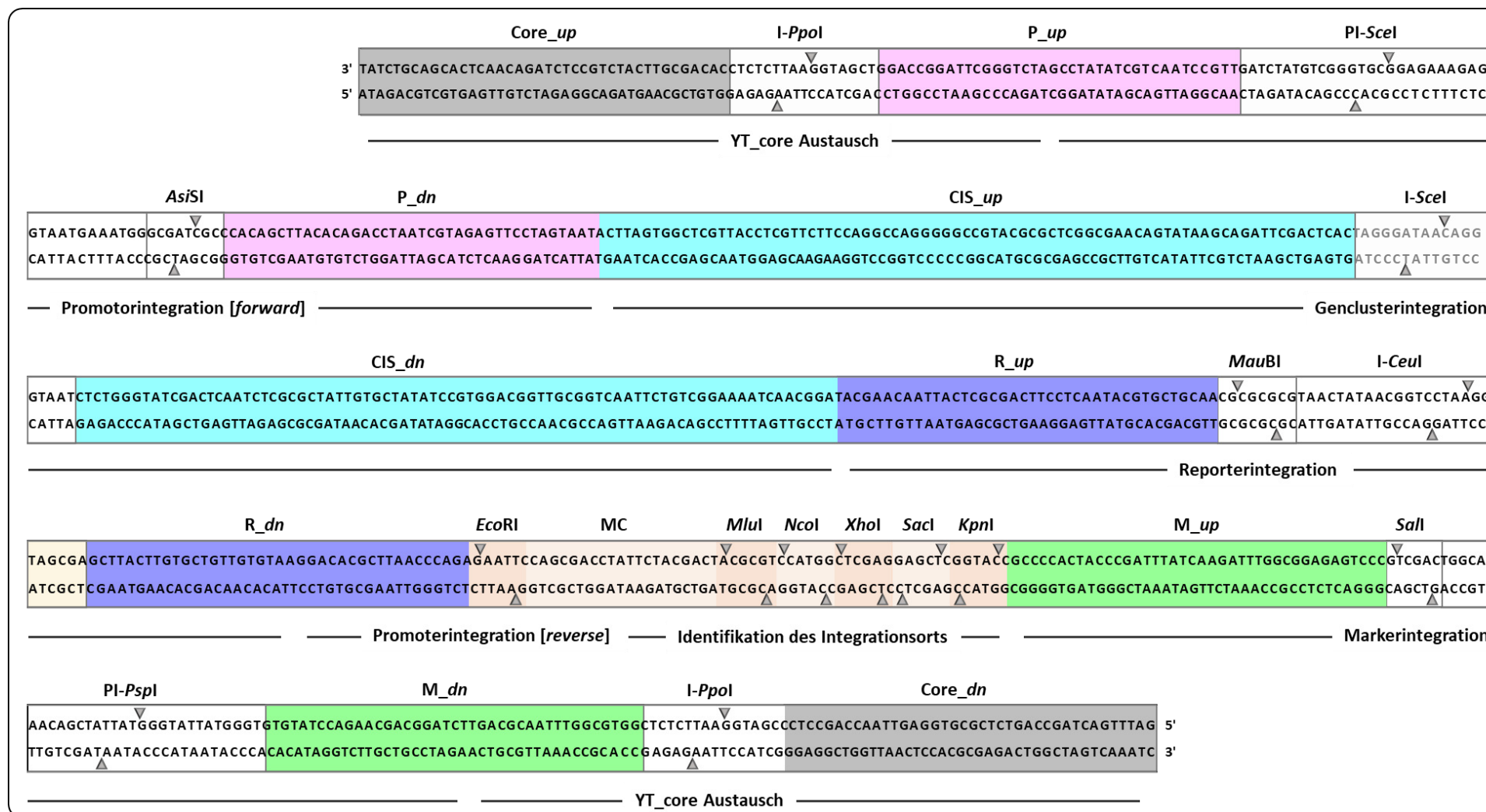


Abbildung 7-4: Übersichtsdarstellung der Gensequenz der YT_core-Sequenz als Basis des γ TREX-Toolbox-Systems

Die farbigen Blöcke zeigen die verschiedenen hier als Rekombinationssequenzen bezeichneten DNA-Abschnitte an, die in der γ TREX-Toolbox vorliegen und zur homologiebasierten Klonierung verschiedener Elemente an diesen Stellen dienen sollen (siehe auch Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2). Die grauen Pfeile zeigen die Lokalisation der Endonukleaseschnittstellen zwischen den Rekombinationssequenzen an. *Asi*I oder *PI-Sce*I ermöglichen das Einbringen eines zusätzlichen Elements wie beispielsweise eines Promotors (zwischen *P_up* und *P_dn*, rosa). Die *homing*-Endonuklease *I-Sce*I innerhalb der Genclusterintegrationsstelle (*CIS_up* und *_dn*, türkis) dient dem Öffnen des Vektors und dem Einbringen eines Genclusters an dieser Stelle. *Mau*BI oder alternativ *I-Ceu*I dienen dagegen zum Einbringen eines Transkriptionsreporters zwischen *R_up* und *R_dn* (blau). *Sal*I oder *PI-Psp*I erlauben das Einbringen eines Resistenzmarkers (zwischen *M_up* und *M_dn*, grün). Zwischen Reporter und Marker liegen die Erkennungssequenzen verschiedener Endonukleasen in einem *multiple cutter* (MC) genannten Bereich, die jeweils nur diese eine Schnittstelle innerhalb der γ TREX-Toolbox besitzen. Diese könnten etwa zur Identifizierung des Integrationsortes nach randomisierter Transposition in das Genom (Kapitel 3.3.1.4) genutzt werden. Die *I-Ppo*I Schnittstelle, welche am Anfang und Ende des Konstruktes vorkommt, kann dazu verwendet werden, den Integrationsmechanismus eines fertig klonierten Integrans zu verändern. Dazu kann der gesamte Bereich inklusive dem Gencluster und allen funktionalen Elementen durch Hydrolyse entfernt und in einen γ TREX-Toolbox-Vektor, welcher eine andere genomische Integrationsmethode ermöglicht, kloniert werden. Hierzu stehen die Rekombinationssequenzen *Core_up* und *Core_dn* zur Verfügung.

Tabelle 7-2: pYT-Vektor Nomenklatur zur eindeutigen Benennung erzeugter Vektoren

Fluorescent reporters 1-3: eYFP (Spiess et al., 2005); mTagBFP2 (Subach et al., 2011), mCherry (Shaner et al., 2004). Enzymes 6-8: P-EH (Bollinger et al., 2020a); LacZ (J. H. Miller, 1972); GUS (Jefferson et al., 1986).

pYT-Vektornomenklatur: pYTUVX ^b _WX ^c Z					
W = Reporter		X = Marker (^b = Vektor; ^c = YT_core)		Z = Integrationsmodus	
0	Kein Reporter	x	Kein Marker	5	Transposon Tn5
1	eYFP	A	Ampicillin	7	Transposon Tn7
2	mTagBFP2	T	Tetracyclin	i1	Interposon für landing pad integration in 16S-RNA Gene
3	mCherry	C	Chloramphenicol		
6	PE-H	K	Kanamycin	U = Initialen des Erzeugers (2-Buchstabencode)	
7	LacZ	G	Gentamicin		
8	GUS	S	Spectinomycin/Streptomycin	V = Fortlaufende Vektornummer (01, 02, 03, ...)	

Tabelle 7-3: Vorkommen von Endonukleaseschnittstellen der YT_core-Sequenz in anderen pYT-Elementen.

Endonukleaseschnittstellen in der YT_core-Sequenz, die in pYT-Vektor-Backbone-Elementen oder relevanten YT_core-Komponenten (M, Marker; R, Reporter, P, Promotoren) vorkommen, sind markiert ("schneidet"). *Homing*-Endonukleasen sind durch Fettschrift hervorgehoben. Vektorelemente, die nicht in das Genom integrieren, sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Wenn Schnittstellen in ausgewählten Elementen vorkommen, sollte auf die Reihenfolge der Klonierung der erforderlichen Gene geachtet werden, oder es sollten alternative Endonukleaseschnittstellen für weitere Veränderungen in Betracht gezogen werden.

	Funktion		YT_core Austausch	Elementeintegration			Gencusterintegration	Reporterintegration		Markerintegration		Mehrfachschnittstellen der MC-Sequenz				
				PI-Scel	AsiSI	EcoRI		I-Scel	MauBI	I-CeuI	Sall	PI-PspI	MluI	NcoI	XhoI	SacI
	Endonukleasen		I-PpoI	PI-Scel	AsiSI	EcoRI	I-Scel	MauBI	I-CeuI	Sall	PI-PspI	MluI	NcoI	XhoI	SacI	KpnI
Vektorelemente	pYT-Rückgrat*	yCP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	schneidet	schneidet	schneidet	-
	<i>tnp</i> *	Tn5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	schneidet	-	-
	landing pads	rrn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>sacB</i> Selektionsmarker*	SacB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	schneidet
	<i>tnsABCD</i>	Tn7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	schneidet	-	schneidet	schneidet
	<i>P_{bla}-bla</i> *	Ap ^R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P_{aphII}-aphII</i> *	Km ^R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	schneidet	-	-	-
Austauschbare YT_core Elemente	M	<i>P_{aacC1}-aacC1</i>	Gm ^R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>P_{tet}-tetA(C)</i>	Tc ^R	-	-	-	-	-	-	-	schneidet	-	-	-	-	-
		<i>P_{aphII}-aphII</i>	Km ^R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	schneidet	-	-
		<i>P_{aadA}-aadA</i>	Sm ^R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>P_{cat}-cat</i>	Cm ^R	-	-	-	schneidet	-	-	-	-	-	-	schneidet	-	-
	R	<i>eYFP</i>	YFP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	schneidet	-	-
		<i>mCherry</i>	RFP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	schneidet	-	-
		<i>mTagBFP2</i>	BFP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	schneidet	-	-
		<i>lacZ</i>	LacZ	-	-	-	-	-	schneidet	-	-	-	schneidet	-	-	schneidet
		<i>uidA</i>	GUS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	schneidet	-	-	-
		<i>pe-h</i>	PE-H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

7.4 Übersicht des Violaceinbiosynthesewegs

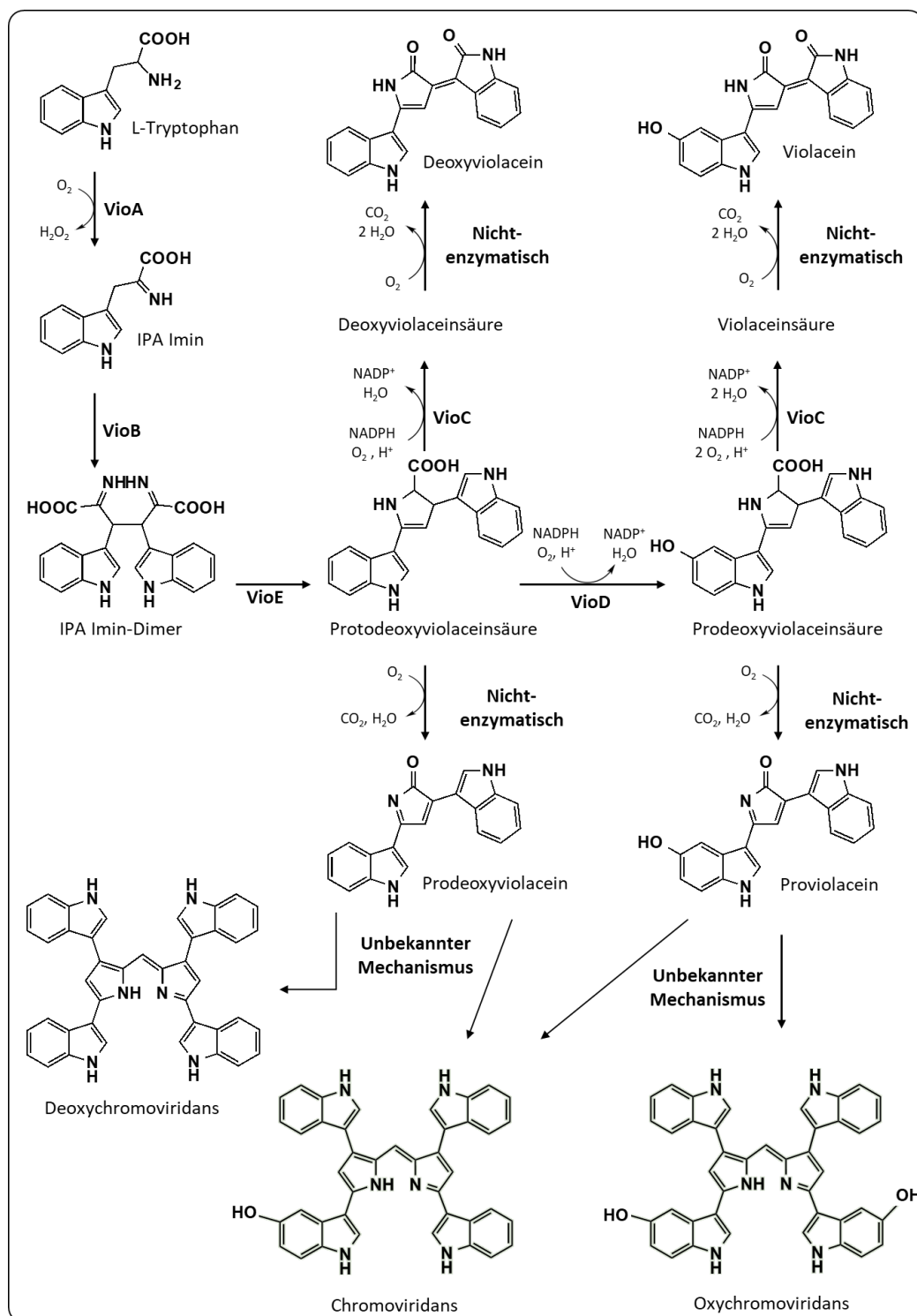


Abbildung 7-5: Violaceinbiosyntheseweg

Gezeigt sind die verschiedenen Schritte, die durch die jeweiligen kodierten Enzyme katalysiert werden, oder unabhängig von diesen ablaufen. Die Synthese erfolgt beginnend bei L-Tryptophan, über IPA Imin und das IPA Imin Dimer zu Protodeoxyviolaceinsäure. Diese wird entweder enzymatisch zu Deoxyviolacein oder Protodeoxyviolaceinsäure umgesetzt. Letztere wird durch VioD weiter zu Violacein umgesetzt, kann jedoch auch durch einen nichtenzymatischen Schritt zu Oxychromoviridans umgesetzt werden. Protodeoxyviolaceinsäure kann dagegen ebenfalls nichtenzymatisch zu Prodeoxyviolacein und weiter zu Deoxychromoviridans reagieren. Aufgrund der Reaktivität der Substanzen Prodeoxyviolacein und Proviolacein können diese zudem auch nichtenzymatisch zu Chromoviridans reagieren. Die Abbildung wurde adaptiert nach Lee et al., 2013 welches unter der *Creative Commons Attribution Non-Commercial License* veröffentlicht wurde (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

7.5 Integration des Gens *sacB* in die pYT-Vektoren zur *rrn*-Integration zur Vermeidung von *single crossover* Ereignissen

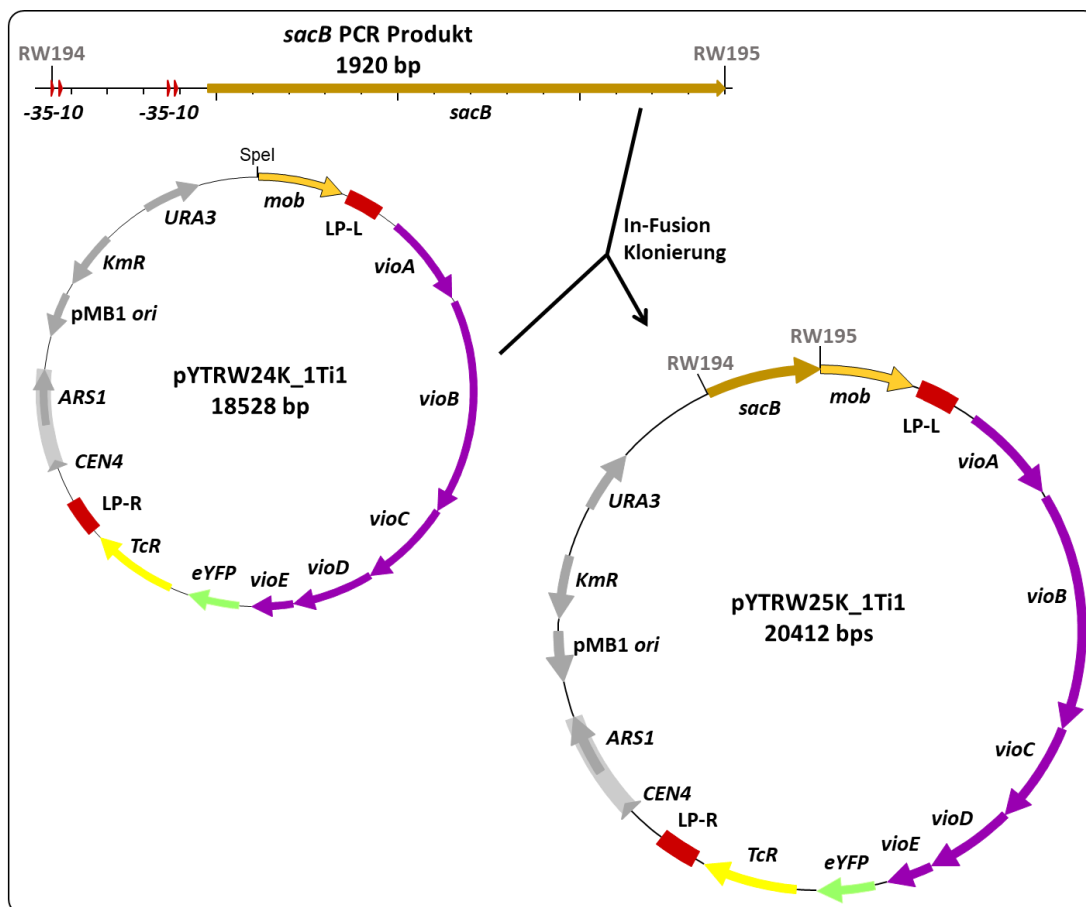


Abbildung 7-6: Integration des Gens *sacB* in den Vektor pYTRW24K_1Ti1

Die Integration des Selektionsmarkers *sacB* in das pYT-Vektorrückgrat erfolgte zur negativen Selektion von *single crossover* Integrationen bei der gezielten Integration in den *P. putida*-Stämmen mit integrierter *16S landing site*. Zur Klonierung dieses Selektionsmarkers wurde der Vektor pYTRW24k-1Ti1 mit der Endonuklease *SpeI* linearisiert und das Gen *sacB* durch eine PCR amplifiziert. Die Klonierung erfolgte anschließend gerichtet durch eine In-Fusion Klonierung, wodurch der Vektor pYTRW25K_1Ti1 erzeugt wurde. Schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung.

Tabelle 7-4: pYT-Plasmide mit *SacB*-Integration im Vektorrückgrat

Ausgangsvektor	Vektor nach <i>sacB</i> Integration	YT_core Reporter	YT_core Marker
pYTRW20K_0Ti1	pYTRW28K_0Ti1	nicht integriert	<i>Tc^R</i>
pYTRW21K_1Ti1	pYTRW26K_1Ti1	<i>eYFP</i>	<i>Tc^R</i>
pYTRW22K_7Ti1	pYTRW27K_7Ti1	<i>lacZ</i>	<i>Tc^R</i>

7.6 Darstellung der in den erzeugten Stämmen aufgetretenen Deletionen im Gen *vioD*



Abbildung 7-7: Native Aminosäuresequenz des Gens *vioD* mit eingetragenen Deletionen der verschiedenen *rrn*-Integrationsstämmen

Dargestellt ist die native Aminosäuresequenz (AS) des Gens *vioD* als fortlaufendes Polypeptid (rotes Band). Eingezeichnet sind die Deletionen innerhalb dieses Proteins der in dieser Arbeit erzeugten *P. putida* Violaceinproduktionsstämmen. Jede Deletion ist dabei durch ein Feld gekennzeichnet, welches die Anzahl der jeweils deletierten AS umfasst. Die orangen Felder stellen dabei die durch Tn5-Transposition erzeugten Stämme (RW19-1 und -3) dar, während die *rrn*-Integrationsstämmen (RW25-A-F) durch rote Felder gekennzeichnet sind. Einzig der Stamm RW25-B ist nicht dargestellt, da die Deletion der AS ab Position 240 zu einer Leserasterverschiebung und dem Auftreten eines Stopcodons bei Position 248 geführt hat.

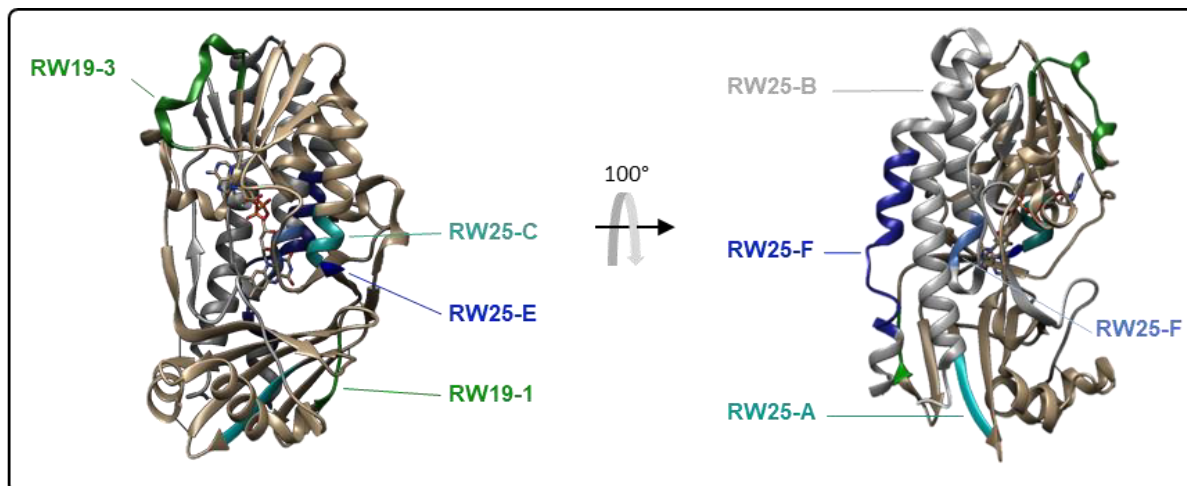


Abbildung 7-8: Lokalisation der aufgetretenen Mutationen in der Kristallstruktur der Hydroxylase VioD

Dreidimensionale Darstellung der Proteinstruktur der Hydroxylase VioD (pdb 3C4A, Protein als Banddarstellung, gebundener Cofaktor FAD als Stabdarstellung). Farblich markiert sind die in den jeweiligen Tn5- (RW19-1/3) und *rrn*-Stämmen (RW25-A-F) aufgetretenen Mutationen, deren deletierte Aminosäuren in (Abbildung 7-7) gezeigt und in Kapitel 3.4.3.2 beschrieben sind. Diese führen wahrscheinlich zu ausgeprägten Störungen der Proteinstruktur in der Rossmann-Faltungsdomäne (oberer Teil) oder dem reaktiven Zentrum (unterer Teil).

8 Anteilerklärung an veröffentlichten Werken

Anteile des Doktoranden **Robin Weihmann** an den, in dieser Arbeit als Ergebnisse aufgeführten Daten, aus den folgenden Veröffentlichungen:

„*Rapid generation of Pseudomonas putida secondary metabolite production strains using yTREX*“

Domröse A., **Weihmann R.**, Thies S., Jaeger K.-E., Drepper T., Loeschcke A. (2017). *Synthetic and Systems Biotechnology* 2 (4) 310-319 doi: 10.1038/s41598-019-43405-1

Andreas Domröse	Planung, Durchführung und Analyse der Experimente, Anfertigung des Manuskriptes
Robin Weihmann	Planung, Durchführung und Analyse der Experimente
Stephan Thies	Planung und Anfertigung des Manuskriptes
Karl-Erich Jaeger	Zur Verfügungstellung der Laboratorien, Geräte und Materialien, Koordination und Überwachung der Experimente und Anfertigung des Manuskriptes
Thomas Drepper	Koordination der Experimente und Anfertigung des Manuskriptes
Anita Loeschcke	Korrespondenz, Planung, Koordination, Überwachung der Experimente und Anfertigung des Manuskriptes

„*Pseudomonas putida rDNA is a favored site for the expression of biosynthetic genes.*“

Domröse A., Hage-Hülsmann J., Thies S., **Weihmann R.**, Kruse L., Otto M., Wierckx N., Jaeger K.-E., Drepper T., Loeschcke A. (2019). *Scientific Reports*, 9 (7028) 1-13 doi: 10.1038/s41598-019-43405-1.

Andreas Domröse	Planung, Durchführung und Analyse der Experimente, Anfertigung des Manuskriptes
Jennifer Hage-Hülsmann	Durchführung der Experimente
Stephan Thies	Analyse der Daten
Robin Weihmann	Durchführung der Experimente
Luzie Kruse	Durchführung der Experimente
Maike Otto	Analyse der Daten
Nick Wierckx	Analyse der Daten
Karl-Erich Jaeger	Zur Verfügungstellung der Laboratorien, Geräte und Materialien, Koordination und Überwachung der Experimente und Anfertigung des Manuskriptes
Thomas Drepper	Koordination der Experimente und Anfertigung des Manuskriptes
Anita Loeschcke	Korrespondenz, Planung, Koordination, Überwachung der Experimente und Anfertigung des Manuskriptes

„Protocols for γ TREX/Tn5-based gene cluster expression in *Pseudomonas putida*“

Weihmann R., Domröse A., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A., (2020). *Microbial Biotechnology*, 13

(1) 250-262 doi:10.1111/1751-7915.13402

Robin Weihmann	Planung, Durchführung und Analyse der Experimente, Anfertigung des Manuskriptes
Andreas Domröse	Planung und Rücksprache zu Experimenten
Thomas Drepper	Planung und Rücksprache zu Experimenten und dem Manuskript
Karl-Erich Jaeger	Zur Verfügungstellung der Laboratorien, Geräte und Materialien, Koordination und Überwachung der Experimente und Anfertigung des Manuskriptes
Anita Loeschcke	Korrespondenz, Planung, Koordination, Überwachung der Experimente und Anfertigung des Manuskriptes