

**UNTERSUCHUNGEN AN NEUARTIGEN  
POLYKETIDSYNTHESEN AUS MARINEN  
SCHWÄMMEN (PORIFERA)**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Thomas Hochmuth

aus

Berlin

Bonn 2011

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörn Piel
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Sahl

Tag der Promotion: 16.03.2012

Erscheinungsjahr: 2012

**"It's much better to have the rules before the exceptions."**

Prof. Sir David Hopwood  
(bezüglich der Entdeckung der ersten Gene  
für eine modulare Polyketidsynthase)



## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand in den Laboren des Kekulé-Instituts für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Jörn Piel. Zuallererst danke ich meinem „Doktorvater“ Prof. Dr. Jörn Piel für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit anzufertigen. Ich bin sehr dankbar für seine vielen hilfreichen, guten Ideen und Ratschläge, sowohl während der Laborarbeit, als auch beim Schreiben und Planen der Veröffentlichungen und Vorträge, sowie auch des vorliegenden Textes.

Außerdem danke ich ganz herzlich Prof. Dr. Hans-Georg Sahl für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie den zwei weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission Prof. Dr. Albert Haas und PD Dr. Thomas Kolter.

Meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe Piel danke ich für die gute Teamarbeit, bei der auch der Humor nicht zu kurz kam. Ewig unvergessen werden unsere gemeinsamen Weihnachtsfeiern, die Wanderungen im Ahrtal und (last but not least) die traditionelle Begehung des Weiberfastnachtsnachmittages sein. Einigen ehemaligen Kollegen gilt besonderer Dank: von Dr. Daniel Butzke und Dr. Katrin Zimmermann lernte ich das Einmaleins des Klonierens, und von Katrin darüber hinaus das Meiste über Proteinexpression und Radioaktiv-Assays. Sie war immer für Rat und Tat zur Stelle. Katrin danke ich auch sehr für das Korrekturlesen der Arbeit. Meinem Laborbanknachbarn Dr. Holger Niederkrüger sei auch ganz herzlich gedankt. Mit ihm teilte ich das „Bernsteinzimmer“ – unsere Batterie von 1 L-Flaschen mit LB-Medium auf dem Laborregal. Holger griff mir vor allem bei der Proteinexpression der *apo-SupA<sub>ACP</sub>* und den Radioaktiv-Assays unter die Arme. Nina Heycke danke ich für das Beibringen der schönen Technik des Silberfärbens von Proteingelen und für die vielen chemisch kompetenten Zellen. Meinem Kurzzeitkollegen Ilias Lagkouvardos sei für die Zusammenarbeit beim Versuch der Kultivierung des *Paederus*-Symbionten gedankt. Das PCR-Screening bescherte uns (leider?) eine Achterbahnfahrt der Gefühle. Für die vielen guten Gespräche und Hinweise im AK Piel danke ich, neben den nicht namentlich erwähnten Kollegen, vor allem herzlich Dr. Kathrin Reinhardt, Dr. Jana Moldenhauer, Minna Eklund, Dr. Cristian Gurgui und Dr. Katja Fisch.

Die vielen GC und GC/MS-Läufe wurden an den bestens gewarteten Geräten des AK Waldvogel in unserem Hause getätigt. Dafür seien Prof. Dr. Siegfried Waldvogel und seinen Mitarbeitern Dr. Carsten Siering und Dr. Jörn Kulisch herzlich gedankt.

Eine weitere hervorragende Zusammenarbeit innerhalb des Gebäudes bestand mit den Arbeitskreisen Famulok und Sandhoff: Prof. Dr. Michael Famulok und seinem Mitarbeiter Volkmar Fieberg danke ich für die Versuche zur Proteinaufreinigung mittels FPLC und Ionenaustauschchromatographie, sowie für viele Tricks und Kniffe in Sachen Proteinexpression. Ebenso verdanke ich dem AK Famulok die Möglichkeit, Radioaktiv-Assays durchzuführen. Prof. Dr. Konrad Sandhoff sei für die zur Verfügungstellung einiger Gerätschaften für die Radio-SDS-PAGE gedankt.

Für die Zusammenarbeit bei der Proteinanalytik mit Massenspektrometrie danke ich den Mitarbeiterinnen der Masse-Abteilung des Kekulé-Institutes, allen voran Dr. Marianne Engeser. Frau Dr. Engeser entwickelte auch die Excel-Tabelle, die zur Berechnung der exakten Proteinmassen verwendet wurde.

Außerhalb der Universität Bonn gilt mein Dank Matthias O. Altmeyer (Universität des Saarlandes) für das Protokoll des tryptischen In-Gel-Verdaus von Proteinen.

Mein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida (Universität Würzburg) für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und fruchtbare Diskussionen. Aus dieser Arbeitsgruppe möchte ich vor allem, neben Prof. Hentschel persönlich, Dr. Alexander Siegl, Dr. Lars Fieseler und Christine Gernert danken.

Für die Hilfe bei der heterologen Expression in *Corynebacterium glutamicum* danke ich herzlich Prof. Dr. Lothar Eggeling und Karin Krumbach vom Forschungszentrum Jülich.

Nicht zuletzt: Für die kontinuierliche finanzielle Unterstützung dieses Projektes durch die DFG, sowie für die Ausrichtung der halbjährlicher Kolloquien in Rahmen des Schwerpunktprojektes: „Evolution metabolischer Diversität“ (SPP 1152) danke ich der DFG und dem Hauptinitiator des SPP Prof. Dr. Dieter Strack (IPB Halle) sehr herzlich.

# INHALT

DANKSAGUNG .....	V
INHALT .....	VII
ABBILDUNGEN .....	12
TABELLEN .....	15
<b>A ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>17</b>
<b>B ABSTRACT .....</b>	<b>19</b>
<b>C EINLEITUNG .....</b>	<b>21</b>
<b>C 1 Die „Apotheke des Meeres“ .....</b>	<b>21</b>
C 1.1 Neue Arzneimittel aus dem Meer .....	22
C 1.1.1 Anerkannte Arzneimittel .....	22
C 1.1.2 Pharmakologisch interessante marine Naturstoffe .....	23
C 1.2 Nachhaltige Quellen mariner Wirkstoffe .....	29
C 1.2.1 Metagenomik und heterologe Expression .....	29
C 1.2.2 Weitere erneuerbare Quellen mariner Wirkstoffe .....	32
<b>C 2 Biosynthese von Polyketiden und Fettsäuren .....</b>	<b>33</b>
C 2.1 Mechanismus und beteiligte enzymatische Funktionen .....	33
C 2.2 Aufbau modularer FAS und PKS .....	39
C 2.2.1 Iterativ arbeitende Megasyntasen .....	41
C 2.2.2 Sequenziell (modular) arbeitende Megasyntasen .....	46
<b>C 3 Schwämme und ihre Symbionten .....</b>	<b>49</b>
C 3.1 Schwämme .....	49
C 3.2 Schwämme als Fermenter für symbiotische Bakterien .....	50
C 3.2.1 Definition der Symbiose .....	50
C 3.2.2 Ökologie .....	51
C 3.2.3 Diversität mikrobieller Schwammsymbionten .....	52
<b>C 4 Phylogenie und Diversität der PKS aus marinen Schwämmen .....</b>	<b>54</b>
C 4.1 Phylogenie der KS-Domänen .....	54
C 4.2 Diversität der KS-Domänen .....	56
<b>C 5 Isolierte PKS-Gencluster bakterieller Symbionten mariner Schwämme ....</b>	<b>58</b>
C 5.1 Substanzen der Pederin-Familie .....	58
C 5.1.1 Pederin aus Käfern .....	59
C 5.1.2 Substanzen der Pederin-Familie aus marinen Schwämmen .....	61
C 5.2 SupA-PKS .....	63
C 5.2.1 Der <i>sup</i> -Cluster .....	64
C 5.2.2 SupA - eine neuartige PKS aus marinen Schwämmen .....	65
<b>D ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>67</b>
<b>E ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
<b>E 1 Funktion des <i>sup</i>-Clusters .....</b>	<b>68</b>
E 1.1 <i>Sup</i> -Cluster – heterologe Expression, Fettsäureprofile .....	68
E 1.1.1 Expressionswirt <i>Escherichia coli</i> .....	70
E 1.1.2 Expressionswirt <i>Pseudomonas putida</i> .....	75
E 1.1.3 Expressionswirt <i>Streptomyces albus</i> .....	77

E 1.1.4	Expressionswirt <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	79
E 1.1.5	Heterologe Expression des <i>sup</i> -Clusters – Zusammenfassung und Diskussion .....	81
E 1.2	SupA-PKS – <i>In-vitro</i> -Studien .....	82
E 1.2.1	SupA als Multienzym .....	83
E 1.2.2	SupA <sub>KSI</sub> .....	92
E 1.2.3	SupA <sub>AT1</sub> und SupA <sub>KS-AT1</sub> .....	94
E 1.2.4	SupA <sub>MT</sub> .....	97
E 1.2.5	SupA <sub>ACP</sub> .....	98
E 1.3	SupB, das Typ-II-Acyl-Carrier-Protein .....	99
E 1.3.1	<i>In silico</i> -Analyse von SupB .....	100
E 1.3.2	Proteinexpression von SupB .....	100
E 1.3.3	Nachweis der <i>In-vivo</i> -Phosphopantetheinylierung .....	101
E 1.4	SupC, die Phosphopantetheinyl-Transferase .....	103
E 1.4.1	<i>In silico</i> -Analyse der SupC - Phylogenie .....	103
E 1.4.2	Expression der PPTase SupC .....	106
E 1.5	<i>In-vitro</i> -Protein-Assays .....	107
E 1.5.1	Phosphopantetheinylierung <i>in vitro</i> durch SupC und Sfp .....	107
E 1.5.2	Acyl-Transfer durch SupA <sub>AT1</sub> .....	109
E 1.6	Funktion des <i>sup</i> -Clusters - Zusammenfassung .....	112
<b>E 2</b>	<b>Herkunft des <i>sup</i>-Clusters .....</b>	<b>114</b>
E 2.1	Genomanalyse eines Poribakteriums .....	114
E 2.2	Positive Korrelation von <i>sup</i> -Cluster und Poribakterien .....	116
E 2.3	PKS-Diversität in den untersuchten Schwämmen .....	117
E 2.4	Fettsäureanalytik von sechs marinen Schwämmen .....	119
E 2.4.1	Lipidextraktion und Lipidfraktionierung .....	120
E 2.4.2	Alkalische vs. saure Methylierung der Fettsäuren .....	120
E 2.4.3	Fettsäurekomposition der Schwämme .....	121
E 2.4.4	Zusammenfassung Fettsäureanalytik .....	144
E 2.5	Herkunft des <i>sup</i> -Clusters - Zusammenfassung .....	146
<b>E 3</b>	<b>Versuch der Kultivierung eines Symbionten .....</b>	<b>149</b>
<b>E 4</b>	<b>Bioassay mit Schwammextrakten .....</b>	<b>155</b>
<b>F</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>157</b>
<b>F 1</b>	<b>Material .....</b>	<b>157</b>
F 1.1	Organismen .....	157
F 1.1.1	Bakterien .....	157
F 1.1.2	Schwämme .....	158
F 1.2	Vektoren .....	159
F 1.2.1	Vektoren zum Klonieren und Lagern .....	159
F 1.2.2	Expressionsvektoren und Chaperon-Plasmide .....	159
F 1.2.3	Cosmide metagenomischer DNA Bibliotheken .....	160
F 1.3	Chemikalien, Enzyme, Antibiotika .....	161
F 1.3.1	Chemikalien .....	161
F 1.3.2	Enzyme, Koenzyme .....	163
F 1.3.3	Antibiotika .....	164
F 1.4	Verbrauchsmaterialien .....	164



F 1.5 Technische Geräte.....	165
F 1.5.1 Massenspektrometer und andere Großgeräte.....	166
F 1.5.2 Laborgeräte.....	166
F 1.6 Medien und Puffer .....	168
F 1.6.1 Käuflich erworbene Medien(bestandteile) und Puffer .....	168
F 1.6.2 Rezepte für Medien und Puffer .....	169
<b>F 2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>172</b>
F 2.1 Lagerung der Stämme und Vektoren .....	172
F 2.2 DNA-Extraktion .....	172
F 2.2.1 Übernachtskulturen .....	172
F 2.2.2 Plasmidpräparation (Miniprep).....	173
F 2.2.3 Extraktion genomischer DNA .....	174
F 2.3 Restriktionsverdau .....	175
F 2.4 Klenow-Auffüllung.....	176
F 2.5 Dephosphorylierung .....	176
F 2.6 DNA Fällung .....	176
F 2.7 Agarose-Gelelektrophorese .....	177
F 2.8 Isolierung von DNA Banden aus dem Gel .....	177
F 2.9 Transformation .....	178
F 2.9.1 Hitzeschock-Kälteschock-Transformation .....	178
F 2.9.2 Elektroporation.....	179
F 2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	181
F 2.10.1 PCR zur Kontrolle .....	181
F 2.10.2 „Proofreading“-PCR für späteres Klonieren .....	181
F 2.10.3 PCR-Oligonukleotide (Primer).....	182
F 2.11 T/A-Klonierung .....	185
F 2.11.1 Reinigung der PCR-Produkte .....	186
F 2.11.2 Herstellung des T-Überhang-Vektors.....	186
F 2.11.3 Ligation.....	187
F 2.11.4 Blau-Weiß-Selektion .....	188
F 2.11.5 Verdau und Sequenzierung.....	188
F 2.12 $\lambda$ -Red-Klonierung .....	188
F 2.13 Klonierungen – Spezieller Teil.....	191
F 2.13.1 Klonierungen für <i>in vivo</i> Expression des <i>sup</i> -Genclusters .....	191
F 2.13.2 Klonierung der SupA-PKS .....	195
F 2.13.3 Klonierung des SupB ACP .....	199
F 2.13.4 Klonierung der SupC PPTase .....	199
F 2.13.5 Klonierung der TesA Thioesterase (Typ I).....	199
F 2.13.6 Tabelle der in dieser Arbeit erstellten Expressionsplasmide .....	200
F 2.14 Bioassay mit <i>Bacillus megaterium</i> .....	201
F 2.15 Kultivierungsversuch des <i>Paederus</i> -Symbionten.....	201
<b>F 3 Proteinexpression, Proteinassays, Proteinanalytik .....</b>	<b>203</b>
F 3.1 Proteinexpression.....	203
F 3.1.1 Transformation in den Expressionsstamm.....	203
F 3.1.2 Kultivierung der Expressionsstämme .....	204

F 3.1.3 Ernten der Zellen und Gewinnung des Proteinlysates .....	207
F 3.1.4 His-Tag-Affinitätschromatographie .....	208
F 3.1.5 Aufkonzentrierung und Entsalzung der Proteine .....	209
F 3.2 Protein-Assays .....	210
F 3.2.1 PPTase-Assay .....	210
F 3.2.2 AT-ACP Assay mit <sup>14</sup> C-markiertem Substrat .....	211
F 3.3 Analytik der Proteine .....	212
F 3.3.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	212
F 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	216
F 3.3.3 Tryptischer In-Gel-Verdau von Proteinbanden .....	217
F 3.3.4 HPLC-Messung der ACP .....	217
F 3.3.5 LC/MS Messung der ACP .....	218
F 3.3.6 MALDI-TOF-TOF-MS der Proteine .....	219
F 3.3.7 ESI-FT-ICR-MS .....	219
F 3.3.8 Berechnung der Proteinmassen .....	219
<b>F 4 Analytik der Fettsäuren und Lipide .....</b>	<b>220</b>
F 4.1 Lipidextraktion .....	220
F 4.1.1 Lipidextraktion aus <i>E. coli</i> und <i>P. putida</i> .....	220
F 4.1.2 Lipidextraktion aus <i>S. albus</i> .....	221
F 4.1.3 Lipidextraktion aus <i>C. glutamicum</i> .....	222
F 4.1.4 Lipidextraktion aus Schwammmaterial .....	222
F 4.2 Fraktionierung der Lipide .....	223
F 4.3 Gewinnung und Derivatisierung der Fettsäuren .....	224
F 4.3.1 Milde alkalische Methanolyse zu FAME .....	225
F 4.3.2 saure Transmethylierung/Methylierung zu FAME .....	225
F 4.3.3 Pyrrolidide .....	226
F 4.3.4 Picolinylester .....	226
F 4.3.5 Hydrolyse der Fettsäuren mit KOH .....	227
F 4.4 Harnstofffraktionierung .....	228
F 4.5 MIDI Protokoll .....	228
F 4.6 Messung mit GC/MS .....	229
<b>F 5 Genanalysen und Stammbäume .....</b>	<b>230</b>
F 5.1 Genomanalyse eines Poribakteriums .....	230
F 5.2 Verwendete Software .....	230
F 5.3 Zugriffsnummern der <i>sup</i> -Cluster-Sequenzen .....	230
<b>G LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>231</b>
<b>H ANHANG .....</b>	<b>241</b>
<b>H 1 Anhang Molekularbiologie .....</b>	<b>241</b>
H 1.1 Vektorkarten .....	241
H 1.2 Weitere erstellte Plasmide .....	246
H 1.3 Sequenzen und Alinierungen .....	247
H 1.3.1 Alinierung der SupA <sub>KS1</sub> .....	247
H 1.3.2 Alinierung der SupA <sub>AT1</sub> .....	248
H 1.3.3 Alinierung der SupA <sub>MT</sub> .....	249
H 1.3.4 Alinierung der SupA <sub>ACP</sub> .....	250

---

H 1.3.5 Alinierung der PPTase-Sequenzen für den Stammbaum .....	250
H 1.4 Genomanalyse eines Poribakteriums .....	251
<b>H 2 Spektren .....</b>	<b>256</b>
H 2.1 ESI-FT-ICR-MS .....	256
H 2.2 MALDI-TOF-TOF-MS .....	257
H 2.3 ESI-micro TOF-Q-MS .....	260
H 2.4 GC-Spektren .....	263
H 2.5 GC/MS-Spektren .....	266
H 2.6 EI-Massenspektren der Fettsäuren .....	269
<b>H 3 Fettsäure- und Lipiddaten .....</b>	<b>273</b>
H 3.1 Fettsäuredaten <i>E. coli</i> .....	273
H 3.2 <i>Streptomyces albus</i> .....	276
H 3.3 Lipidextraktion .....	277
H 3.4 Schwammfettsäuren .....	278
<b>H 4 Codongebrauch .....</b>	<b>294</b>
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	295
PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE .....	299
LEBENS LAUF .....	301
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....	302

## ABBILDUNGEN

Abb. 1: Medikamente aus der „Apotheke des Meeres“ .....	23
Abb. 2: Beispiele für pharmakologisch interessante Polyketide marinen Ursprungs. ....	25
Abb. 3: Beispiele für pharmakologisch interessante Peptide marinen Ursprungs. ....	26
Abb. 4: Beispiele für pharmakologisch interessante Alkaloide marinen Ursprungs.....	28
Abb. 5: Weitere Wirkstoffe marinen Ursprungs. ....	29
Abb. 6: Schema zur heterologen Expression von Wirkstoffgenen .....	31
Abb. 7: Mechanismus der Polyketid-Biosynthese. ....	35
Abb. 8: PPTase-katalysierte Umwandlung des <i>apo</i> -ACPs zum <i>holo</i> -ACP. ....	38
Abb. 9: Schematischer Aufbau von multimodularen PKS.....	40
Abb. 10: Aufbau von modularen FAS und PKS. ....	45
Abb. 11: Bakterielle Schwammsymbionten im Mesohyl.....	51
Abb. 12: Poribakterien im Mesohyl. TEM-Foto.....	53
Abb. 13: Konservierte Motive der KS-Domänen. Primer DPQQ/HGTGT. ....	55
Abb. 14: Stammbaum mit KS-Sequenzen von 20 Schwämmen .....	55
Abb. 15: Substanzen der Pederin-Familie.....	59
Abb. 16: Biosynthese von Pederin. ....	60
Abb. 17: Vergleich der Gencluster von Pederin, Onnamid und Psymberin.....	62
Abb. 18: Übersicht über alle bekannten <i>sup</i> -Cluster.....	64
Abb. 19: <i>In vivo</i> Expression des <i>sup</i> -Clusters in <i>E. coli</i> BL21(DE3). ....	70
Abb. 20: Fettsäureprofile von <i>E. coli</i> Wildtypen und Transformanten mit <i>sup</i> -Cluster. Vergleich <i>E. coli</i> BL21(DE3) vs. <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF? .....	72
Abb. 21: Koexpression der <i>sup</i> -Gene mit der TE I (pTH91) und Chaperonen.....	74
Abb. 22: Fettsäureprofile der Proteinlysate von <i>E. coli</i> nach Expression des <i>sup</i> -Clusters. .....	75

Abb. 23: Expression des <i>sup</i> -Clusters in <i>P. putida</i> . Fettsäureprofile.....	76
Abb. 24: Expression des <i>sup</i> -Clusters in <i>S. albus</i> . GC-Spektren .....	77
Abb. 25: Expression des <i>sup</i> -Clusters in <i>S. albus</i> . GC/MS- Messungen. ....	79
Abb. 26: Expression des <i>sup</i> -Clusters in <i>C glutamicum</i> . Fettsäuren und Lipide. ....	81
Abb. 27: <i>Hind</i> III-Fragment von pSW1H8 mit dem <i>sup</i> -Cluster.....	82
Abb. 28: Domänenorganisation von SupA.. .....	83
Abb. 29: Proteinexpression von SupA. SDS-PAGE.....	85
Abb. 30: Koexpression von pTH23 mit verschiedenen Chaperon-Plasmiden.....	86
Abb. 31: SDS-PAGE der SupA-Proteinexpression. pTH63 <i>versus</i> pTH23.....	86
Abb. 32: SDS-PAGE der <i>in vivo</i> Expression des <i>sup</i> -Clusters in <i>E. coli</i> BL21(DE3). ....	87
Abb. 33: Aufkonzentrierung von SupA durch Ammoniumsulfatfällung. SDS-PAGE.....	88
Abb. 34: Radio-SDS-PAGE von SupA.....	89
Abb. 35: Tryptischer In-Gel-Verdau von SupA. MALDI-Spektren. ....	90
Abb. 36: Proteinexpression von SupA in <i>S. albus</i> . SDS-PAGE.. .....	92
Abb. 37: Stammbaum der AS-Sequenzen der vollständigen KS-Domänen. ....	93
Abb. 38: Proteinexpression von SupA <sub>KS1</sub> . SDS-PAGE.. .....	94
Abb. 39: Proteinexpression von SupA <sub>AT1</sub> und SupA <sub>KS-AT1</sub> . SDS-PAGE.....	96
Abb. 40: <sup>14</sup> C-Malonyl-CoA Markierung der SupA <sub>AT1</sub> und SupA <sub>KS-AT1</sub> . SDS-PAGE. ....	96
Abb. 41: Überexpression von SupA <sub>MT</sub> . SDS-PAGE.....	97
Abb. 42: Proteinexpression von SupA <sub>ACP</sub> . SDS-PAGE. ....	98
Abb. 43: MALDI-TOF-TOF-MS Spektren des SupA <sub>ACP</sub> . ....	99
Abb. 44: Proteinexpression des ACP SupB (pTH89 <i>apo</i> , pTH89 <i>holo</i> ). SDS-PAGE.....	100
Abb. 45: HPLC-Chromatogramme von <i>apo</i> - und <i>holo</i> -SupB.....	101
Abb. 46: Nachweis der <i>In-vivo</i> -Phosphopantetheinylierung von SupB durch Svp. ....	102
Abb. 47: Konservierte AS-Motive der PPTasen .....	104

---

Abb. 48: Stammbaum der PPTasen. ....	105
Abb. 49: Proteinexpression von SupC. SDS-PAGE. ....	107
Abb. 50: <i>In-vitro</i> -Phosphopantetheinylierungs-Assays mit dem <i>apo</i> -SupA <sub>ACP</sub> . ....	108
Abb. 51: <sup>14</sup> C-Malonyl-CoA-Beladung des <i>apo</i> -SupA <sub>ACP</sub> . ....	109
Abb. 52: Radioassay der SupA <sub>ATI</sub> mit <sup>14</sup> C-Malonyl-CoA und <sup>14</sup> C-Acetyl-CoA. ....	110
Abb. 53: <sup>14</sup> C-Markierung von <i>holo</i> -SupB und <i>in-vitro</i> -Phosphopantetheinylierungs-Assays mit <i>apo</i> -SupB. ....	111
Abb. 54: Zuordnung der im Poribakterien-Genom gefundenen Sequenzen zum <i>sup</i> -Cluster. ....	115
Abb. 55: PCR-Analyse von 12 marinen Schwämmen. ....	116
Abb. 56: Diversität der KS-Amplifikate (DPQQ/HGTGT) aus den Schwämmen der vorliegenden Untersuchung. ....	118
Abb. 57: Diagramme der prozentualen Anteile unverzweigter Fettsäuren aus sechs marinen Schwämmen, getrennt nach den drei Lipidfraktionen. ....	128
Abb. 58: Diagramme der prozentualen Anteile methylverzweigter Fettsäuren aus sechs marinen Schwämmen, getrennt nach den drei Lipidfraktionen. ....	134
Abb. 59: Vergleich von HMA und LMA Schwämmen. MIC <i>m/z</i> 74. ....	137
Abb. 60: Strukturen der MBFA aus marinen Schwämmen. ....	141
Abb. 61: 3D-Kultur von Bakterien in 15 mL Falcon-Röhrchen ("hard grace").....	150
Abb. 62: Kultivierungsversuch <i>Paederus</i> -Symbiont. Schneider7_10.....	152
Abb. 63: Kultivierungsversuch <i>Paederus</i> -Symbiont. Agarplatten. ....	154
Abb. 64: Bioassay mit Schwammextrakten. ....	156
Abb. 65: Prinzip des $\lambda$ -Red-Klonierens. ....	190
Abb. 66: Schema der Integration des Replikons für <i>C. glutamicum</i> (rep C.) ....	194
Abb. 67: Klonierung von pTH23. ....	197

## TABELLEN

Tab. 1: "blastp"-Treffer für SupA (gb ABE03935.1 ).....	84
Tab. 2: "blastp"-Treffer für SupB (gb ABE03933.1 ) .....	100
Tab. 3: "blastp"-Treffer für SupC (gb ABE03932.1 ).....	103
Tab. 4: <i>In-vitro</i> -PPTase Assays und Ergebnisse der <sup>14</sup> C-Malonyl-CoA-Beladung .....	108
Tab. 5: Diversität und Anteile (> 3%) der Fettsäuren aus sechs marinen Schwämmen.	122
Tab. 6: Positionen der Methylverzweigungen der MBFA aus <i>C. mycofijiensis</i> . .....	139
Tab. 7: MBFA aus vier HMA-Schwämmen. <sup>[a] [242]</sup> .....	140
Tab. 8: Genetischer und chemischer Vergleich von HMA- und LMA-Schwämmen. <sup>[12]</sup>	147
Tab. 9: Ergebnisse der 16S-rRNA-Analyse von "hard grace"-Klonen. ....	151
Tab. 10: Ergebnisse der 16S-rRNA-Analyse von "Schneider7_10"-Klonen.....	151
Tab. 11: Bioassay mit Schwammextrakten. Zusammenfassung der Ergebnisse. ....	155
Tab. 12: Verwendete Bakterien und deren Herkunft. ....	157
Tab. 13: Verwendete Schwämme und deren Herkunft. ....	158
Tab. 14: Verwendete Vektoren zur Subklonierung.....	159
Tab. 15: Verwendete Ausgangsvektoren für die Expressionen, Chaperon-Plasmide. ....	160
Tab. 16: Verwendete Bibliothek-Cosmide.....	160
Tab. 17: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangabe. ....	161
Tab. 18: Verwendete Enzyme und Koenzyme mit Herstellerangabe. ....	163
Tab. 19: Verwendete Antibiotika mit Konzentrationsangaben. ....	164
Tab. 20: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	165
Tab. 21: Verwendete Massenspektrometer und andere Analytik-Großgeräte. ....	166
Tab. 22: Verwendete Laborgeräte (außer Analytik-Großgeräte). ....	166
Tab. 23: Verwendete käufliche Medien(bestandteile) und Puffer. ....	168

Tab. 24: Puffer für die Plasmidpräparation (Miniprep). .....	173
Tab. 25: Restriktionsansatz (10 µL) für einen Kontrollverdau. ....	175
Tab. 26: Restriktionsansatz (50 µL) für einen Verdau zur Präparation. ....	175
Tab. 27: Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	178
Tab. 28: Verwendete Oligonukleotide (Primer) für die PCR.....	182
Tab. 29: In dieser Arbeit erstellte Expressionsplasmide .....	200
Tab. 30: Konzentrationsangaben für die Ammoniumsulfatfällung.....	209
Tab. 31: Trenngel-Rezepte für SDS-PAGE. ....	212
Tab. 32: Sammelgel-Rezepte für SDS-PAGE.....	213
Tab. 33: Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen. ....	215
Tab. 34: Lösungen für die Amidoschwarz-Methode. ....	216
Tab. 35: Fraktionierung der Lipide .....	224
Tab. 36: Fraktionierung der Polaren Lipide.....	224



## A ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahrzehnten wurden die Weltmeere als Quelle neuer und außerordentlich wirksamer Naturstoffe entdeckt. Marine wirbellose Tiere, vor allem Schwämme (Porifera), sind eine reiche Quelle von Naturstoffen mit großer pharmazeutischer und biotechnologischer Bedeutung. Aus der „Apotheke des Meeres“ gibt es bis heute jedoch nur wenige tatsächlich zugelassene Arzneimittel. Der Hauptgrund dafür ist, dass durch die äußerst geringen Mengen der Stoffe in den Tieren eine nachhaltige Versorgung nicht möglich ist.

Da entdeckt wurde, dass viele der Wirkstoffe aus marinen Wirbellosen in Wirklichkeit von nichtkultivierbaren bakteriellen Symbionten produziert werden, bietet sich die vielversprechende Möglichkeit der Produktion dieser Wirkstoffe in ausreichender Menge durch heterologe Expression ihrer Biosynthesegene in Laborbakterien. Dazu müssen die Gene zuvor aus dem kollektiven Genom von Wirt und assoziierten Mikroorganismen (= Metagenom) isoliert und analysiert werden. Durch das Studium dieser Gene lassen sich zudem wertvolle Einsichten über die chemische Ökologie nichtkultivierter Symbionten sowie über die Evolution, Herkunft, Diversität und Funktion heutiger Naturstoffgene gewinnen.

Die vorliegende Arbeit befasste sich hauptsächlich mit der Erforschung der neuartigen Polyketidsynthasen (PKS) vom SupA-Typ. Sup steht dabei für „sponge symbiont ubiquitous polyketide synthase“. Architekturell sind diese Enzyme den modularen Fettsäuresynthasen (FAS I) der Tiere ähnlich; sie stehen jedoch bezüglich der Aminosäure (AS)-Sequenzen den PKS deutlich näher. Die aufgrund der Domänenstruktur erwarteten Produkte des SupA-Enzyms sind methylverzweigte Fettsäuren, und in der Tat sind marine Schwämme eine der wenigen reichen Quellen für mittkettig methylverzweigte Fettsäuren (MBFA).

Es wurde der *sup*-Cluster aus dem Metagenom des Schwammes *Theonella swinhoei* in *Escherichia coli* und drei weitere bakterielle Wirte transferiert, jedoch ohne messbare Veränderung der Fettsäureprofile der Transformanten. Die Proteinexpression der riesigen multifunktionellen PKS SupA in *E. coli* gelang lediglich in einer für funktionelle Studien unzureichender Ausbeute. Daher wurden einzelne enzymatische Funktionen (SupA<sub>KS1</sub>, SupA<sub>AT1</sub>, SupA<sub>MT</sub>, SupA<sub>ACP</sub>) des Proteins separat erfolgreich überexprimiert. Zusätzlich zu SupA konnten auch das Acyl-Carrier-Protein (ACP) SupB sowie die 4'-

Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase) SupC aus dem *sup*-Cluster in *E. coli* überexprimiert werden, womit erstmals die Möglichkeit funktioneller Studien an einem Vertreter dieser neuartigen PKS aus marinen Schwämmen gegeben war.

Mit den Proteinassays der zwei ACP des *sup*-Clusters, der SupA<sub>AT1</sub> und verschiedenen PPTasen konnte gezeigt werden, dass sich beide ACP *in vivo* durch Koexpression mit der PPTase Svp posttranslationell in die funktionelle Form (=holo) umwandeln lassen. *In vitro* gelang diese Umwandlung mit dem ACP SupB weder mit der PPTase Sfp noch mit der PPTase SupC, jedoch konnte das apo-SupA<sub>ACP</sub> durch die PPTase Sfp in seine holo-Form überführt werden. Letzteres gelang auch mit der PPTase SupC, wobei jedoch der endgültige Beweis der Funktion dieser PPTase noch aussteht. In den Assays zum Acyltransferase (AT)-ACP-Acyltransfer mit radioaktiv markiertem Acetyl (**33**)- sowie Malonyl-CoA (**34**) zeigte sich, dass die SupA<sub>AT1</sub> als Substrat Malonyl-CoA (**34**) wählt und auf das SupA<sub>ACP</sub> überträgt.

Desweiteren wurden umfangreiche Untersuchungen der Fettsäurezusammensetzung mariner Schwämme durchgeführt, wobei 10 Fettsäuren erstmals in der Natur nachgewiesen werden konnten. In allen sechs untersuchten Schwämmen zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Diversität von MBFA einerseits, und PKS-Genen für SupA andererseits. Zudem enthüllten genetische Daten über das Vorhandensein bakterieller Symbionten des Kandidaten-Phylums „Poribacteria“ aus sechs weiteren Schwämmen, dass die MBFA nur in Schwämmen vorkamen, die solche Bakterien enthielten. Dies waren ausschließlich Schwämme mit hoher Mikrobe-Abundanz (HMA-Schwämme). Dagegen enthielten Tiere mit geringer Mikrobe-Abundanz (LMA-Schwämme) weder MBFA noch *sup*-Gene, noch Poribakterien. Mithin spricht diese Korrelation für das Vorkommen der *sup*-Gene in Poribakterien,<sup>[12]</sup> was durch eine Analyse des kürzlich fast vollständig sequenzierten Genoms eines dieser poribakteriellen Schwammsymbionten bestätigt werden konnte.<sup>[11]</sup> Mit der vorliegenden Arbeit verdichten sich somit die Hinweise auf eine Produktion der für viele marine Schwämme typischen MBFA durch symbiotische Bakterien des Kandidaten-Phylums „Poribacteria“.

Weitere funktionelle Studien am SupA-Enzym, z. B. Proteinassays mit der MT-Domäne könnten dazu beitragen, den funktionellen Zusammenhang zwischen SupA und MBFA zu untermauern.

## B ABSTRACT

Marine Invertebrates are a rich source of bioactive natural compounds. In marine sponges (Porifera) especially, the number and diversity of potential drug candidates is amazing. Yet, it is also true that so far only very few drugs on the market derive from marine sources. The main reason for that is the problem to obtain enough material for clinical trials as these natural products occur only in small concentrations in the animals.

Interestingly, it was found that many bioactive natural products from marine invertebrates are in fact not produced by the animals themselves, but by uncultured symbiotic bacteria. This is especially valid for complex polyketides and nonribosomally produced peptides, to which the most interesting drug candidates belong. A promising possibility of sustainable production of sufficient amount of compound for clinical trials is the heterologous expression of genes for natural products in well-growing lab bacteria. To do so, the interesting genes have to be isolated from the collective genome of the animal and its symbionts (i.e., metagenome). Even studying the symbiotic genetic information itself leads to precious insights into chemical ecology, evolution, ancestry, diversity, and function of today's natural product genes.

The present work is primarily about the novel SupA type polyketide synthases (PKSs) with Sup standing for Sponge symbiont ubiquitous *pks*. So far, *supA* genes were found only in bacterial symbionts of sponges. These enzymes share sequence homologies with PKSs, but are architectural similar to animal modular fatty acid synthases (FASs). According to the domain organization the predicted products of SupA are methyl-branched fatty acids. Indeed, those fatty acids are well-known from marine sponges. Especially the mid chain-branched fatty acids (MBFA) occur in high amounts (with only a few exceptions) exclusively in marine sponges.

The *sup* cluster found in the metagenome of the sponge *Theonella swinhoei* was transferred to *Escherichia coli* and three other bacterial hosts, but no alteration of the fatty acid profiles could be measured. The protein expression of the giant multifunctional PKS SupA did not yield enough material for functional studies. Therefore, several separate enzymatic functions (SupA<sub>KS1</sub>, SupA<sub>AT1</sub>, SupA<sub>MT</sub>, and SupA<sub>ACP</sub>) were overexpressed in *E. coli* successfully. Additionally, the acyl

carrier protein (ACP) SupB and the 4'-phosphopantetheinyl transferase (PPTase) SupC were overexpressed in *E. coli*. With these proteins in hand, it was possible for the first time to conduct functional studies on the SupA type PKS.

The protein assays of the two ACPs of the *sup* cluster, the SupA<sub>ATI</sub>, and several PPTases showed that both ACPs could be posttranslationally modified into the biologically active *holo* form *in vivo* by means of coexpression with the PPTase Svp. *In vitro*, this activation of the *apo*-SupB was not possible, neither with the PPTases Sfp nor SupC. In contrast, it was possible to convert the *apo*-SupA<sub>ACP</sub> into its *holo* form by means of the PPTase Sfp. The PPTase SupC also converted SupA<sub>ACP</sub>, but the result was ambiguous. The acyl transferase (AT) assays (SupA<sub>ATI</sub> for substrate transfer to SupA<sub>ACP</sub>) using radioactive acetyl-CoA (33) and malonyl-CoA (34), respectively, proved that SupA uses malonyl-CoA (34) building blocks to assemble the fatty acid chain.

Beside the functional studies on the *sup* cluster comprehensive studies on the fatty acid profiles of six marine sponges were conducted, with 10 novel fatty acids. Thereby, a strict correlation between the occurrence and diversity of MBFA and *supA* genes could be elucidated. This striking correlation was extended by the 16S rRNA data from six more marine sponges concerning the presence of bacteria of the candidate phylum "Poribacteria". These bacteria are (like the *sup* genes) restricted to marine sponges and ubiquitously distributed in these animals. The results showed that the MBFA occurred only in sponges that contained "Poribacteria", and these sponges were exclusively animals with a high microbial abundance (HMA sponges). The sponges with a low microbial abundance (LMA sponges) contained neither MBFA, nor *sup* genes, nor "Poribacteria". Thus, the correlation studies strongly suggest the presence of *sup* genes in "Poribacteria".<sup>[12]</sup>

An analysis of the recently almost completely sequenced genome of a single poribacterial sponge symbiont<sup>[11]</sup> revealed the presence of at least one copy of the *sup* cluster and the *wcbR*-like PKS in the poribacterial genome.

Taken together, first functional proofs on the novel *sup* genes of marine sponges were achieved within the present work, and the indications for the poribacterial origin of the MBFA in marine sponges could be strongly intensified.

## C EINLEITUNG

### C 1 Die „Apotheke des Meeres“

Die Bedeutung der Naturstoffe für die Behandlung von Krankheiten und Verletzungen ist seit Menschengedenken unumstritten. Besonders in dem Bereich der Bekämpfung von Krebserkrankungen und Infektionskrankheiten besteht von Seiten der Medizin ein großer Bedarf an Wirkstoffen.

Bis heute bestehen etwa ein Drittel der approbierten Arzneimittel aus Naturstoffen, bzw. aus deren Leitstrukturen.<sup>[16]</sup> Wurden zunächst jahrhundertlang hauptsächlich Pflanzen zur Heilung verwendet, kamen im letzten Jahrhundert mit der Entdeckung des Penicillins auch Naturstoffe zu Einsatz, die durch Kultivierung von Mikroorganismen gewonnen wurden. Vor allem die bodenbewohnenden filamentösen Pilze und Bakterien (z. B. Actinobacteria) werden seit dieser Zeit zur Produktion von Wirkstoffen genutzt. Da viele dieser frei lebenden Mikroorganismen kultivierbar sind, sind das Auffinden der Naturstoffe und der Nachschub an Substanzmenge gewährleistet. Zieht man jedoch in Betracht, dass wahrscheinlich über 99% der prokaryotischen Mikroorganismen nicht kultivierbar sind,<sup>[17]</sup> lässt sich leicht vorstellen, dass mit den bisherigen Kultivierungsmethoden ein enormes Potential an neuartigen Arzneistoffen verloren geht. Das gilt umso mehr, da sich gezeigt hat, dass neue bakterielle Naturstoffgruppen oft auf bestimmte Produzententaxa beschränkt sind. Beispiele hierfür sind die aromatischen Polyketide der bereits erwähnten Actinobacteria,<sup>[18]</sup> Endiine in Actinobacteria<sup>[19]</sup> sowie Vinyl- und Alkynylhalogenide in Cyanobakterien.<sup>[20, 21]</sup>

Die meisten medizinisch interessanten Wirkstoffe aus der „Apotheke des Meeres“ stammen aus marinen Wirbellosen.<sup>[22, 23]</sup> Von diesen Tieren sind vor allem Schwämme, Tunikaten, Korallen, Schnecken, Moostierchen, Seesterne und Quallen hervorzuheben. Hinsichtlich der chemischen Struktur zählen Alkaloide, Peptide, Polyketide und nichtribosomalen Peptide zu den pharmakologisch wichtigsten Naturstoffklassen mariner Wirbelloser. Es ist heute allgemein anerkannt und in vielen Fällen auch bewiesen worden, dass zumindest die komplexen Polyketide und Peptide der marinen Wirbelloser von symbiotischen Mikroorganismen produziert werden, die im Inneren der Tiere leben.<sup>[24]</sup> Dabei

können z. B. marine Schwämme bis zu ungefähr der Hälfte ihrer Biomasse aus Bakterien bestehen. [25, 26]

Offensichtlich kommt die Vielzahl neuartiger komplexer Wirkstoffe mariner Wirbelloser daher zustande, dass die Naturstoffe dieser Bakterien völlig andere Funktionen erfüllen, als die Wirkstoffe von freilebenden Bakterien. Dies gilt natürlich auch für Endosymbiosen von Bakterien mit Eukaryoten außerhalb des marinen Bereichs. Es geht in allen Fällen, ähnlich wie bei intrazellulären pathogenen Bakterien, um die Invasion und das Überleben der Bakterien im Wirt. Desweiteren produzieren die Bakterien Naturstoffe nicht nur für ihre eigene Abwehr, sondern (indirekt) auch für die Abwehr ihrer eukaryotischen Wirte. [27]

## C 1.1 Neue Arzneimittel aus dem Meer

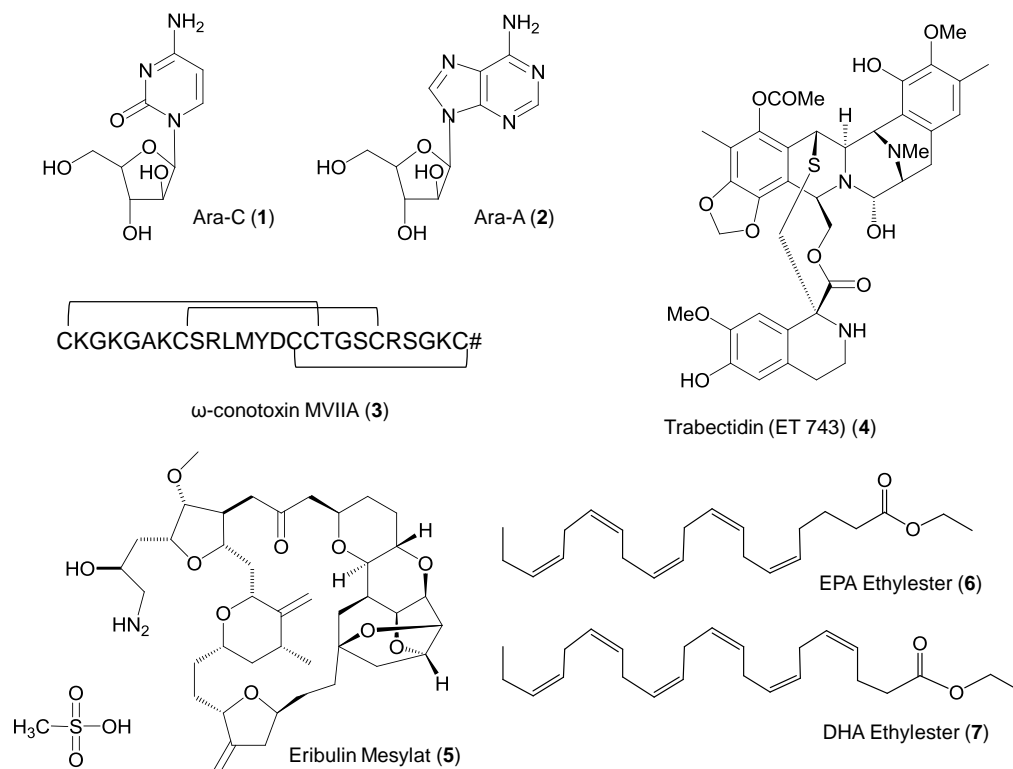
Im Folgenden werden die pharmakologisch wichtigsten der weit über 10,000 bisher entdeckten marinen Naturstoffe [28] aufgeführt. Zur Zeit (Stand Juli 2011) sind sechs Arzneimittel marinen Ursprungs zugelassen und 14 weitere befinden sich in den klinischen Testphasen I, II oder III. [29, 30]

### C 1.1.1 Anerkannte Arzneimittel

Bereits 1950 wurden ungewöhnliche Nukleoside in dem Schwamm *Cryptotethya crypta* [31, 32] entdeckt. Die seit 1969 bzw. 1976 auf dem Markt befindlichen Medikamente Ara-C (1) und Ara-A (2) (Abb. 1) sind synthetische Nukleoside auf der Basis von Spongothymidin (Ara-C) und Spongouridin (Ara-A) aus dem erwähnten Schwamm. Ara-C (1) wirkt antitumoral gegen Leukämie und wird bei lymphomatöser Meningitis verabreicht. Die Ara-A (2)-basierten Medikamente sind für die Behandlung von Infektionen mit Herpes-, Vaccinia- und Varicella Zoster-Viren zugelassen.

2004 folgte, erst 30 Jahre nach Ara-C (1) und Ara-A (2), mit Ziconotid (3) das dritte offiziell anerkannte Medikament aus der Apotheke des Meeres. Ziconotid ist ein synthetisches Äquivalent eines 25-AS langen Peptids ( $\omega$ -Conotoxin MVIIA) aus der Kegelschnecke *Conus magus*. Die Schnecke benutzt diese Substanz als Pfeilgift zur Jagd auf Fische. Das Medikament wird bei starken chronischen Schmerzen eingesetzt und hat gegenüber Opiaten den Vorteil, dass es keinen Gewöhnungseffekt hervorruft. [33]

Das vierte marine Medikament ist das zur Krebsbehandlung eingesetzte Isochinolon-Alkaloid<sup>[34]</sup> Trabectedin (**4**) (ET 743) aus der Tunikaten *Ecteinascidia turbinata*.<sup>[29]</sup>



**Abb. 1:** Medikamente aus der „Apotheke des Meeres“.

Erst kürzlich wurde das erste marine Polyketid als Arzneimittel gegen Krebs zugelassen: Es handelt sich um Eribulin Mesylat (E7389) (**5**), das ein vereinfachtes Analog von Halichondrin B (**8**) aus dem marinen Schwamm *Halichondria okadai* darstellt.<sup>[35]</sup>

Ebenso zugelassen ist eine Mischung aus Omega-3-Fettsäureethylestern aus Fischöl. Das Arzneimittel zur Senkung des Cholesterinspiegels mit dem Markennamen Lovaza® enthält hauptsächlich Ethylester von EPA (**6**) und DHA (**7**) (**Abb. 1**).

### C 1.1.2 Pharmakologisch interessante marine Naturstoffe

Aus der riesigen Auswahl weiterer mariner Wirkstoffe<sup>[36-38]</sup> werden im Folgenden einige interessante Beispiele aufgeführt.

#### Polyketide

In klinischen Studien der Phase I als Arzneimittel gegen Krebs befinden sich zwei weitere marine Polyketide: Das komplexe Polyketid Bryostatatin 1 (**9**) (**Abb. 2**) ist

eines von inzwischen ~20 Derivaten der Bryostatine aus dem Moostierchen *Bugula neritina*,<sup>[39, 40]</sup> die von nichtkultivierten  $\gamma$ -proteobakteriellen Symbionten produziert werden.<sup>[41]</sup> Zusätzlich wird Bryostatin derzeit als Medikament gegen Alzheimer getestet. Aufgrund des Versorgungsproblems mussten etliche Phase II Studien eingestellt werden, aber da der Gencluster inzwischen bekannt ist,<sup>[42]</sup> wird auf eine erfolgreiche heterologe Expression gehofft.

Das freilebende marine Bakterium *Salinospora tropica* (Actinobacteria) produziert den potenten Wirkstoff Salinosporamid A (**10**), der momentan in der klinischen Phase I gegen Krebs getestet wird. Er kann leicht durch Fermentation des Bakteriums beschafft werden.<sup>[43]</sup>

Nachgewiesenermaßen von nichtkultivierten bakteriellen Symbionten mariner Schwämme werden die antitumoralen komplexen Polyketide der Pederin-Familie produziert, wie z. B. Onnamid A (**11**), Theopederin C (**54**), Psymberin (**55**) und Mycalamid A (**56**) (siehe C 5.1).<sup>[6]</sup>

Das wahrscheinlich von bakteriellen Symbionten in mehreren Varianten produzierte komplexe Polyketid Discodermolid (**12**) aus dem marinen Schwamm *Discodermia dissoluta*<sup>[24]</sup> hat eine breite antitumorale Wirkung, ähnlich dem erfolgreichen Paclitaxel aus Pflanzen.

Die ebenfalls gegen Krebs wirksamen Makrolide Swinholid A<sup>[44]</sup> (**13**) und Misakinolid A<sup>[45]</sup> stammen beide aus dem marinen Schwamm *T. swinhoei*; Swinholid A (**13**) wurde aber auch in anderen Schwämmen<sup>[46]</sup> und kürzlich auch in Cyanobakterien gefunden.<sup>[47]</sup> Das symbiotisch produzierte komplexe Polyketid wurde ausschließlich in einer Zellfraktion aus verschiedenen heterotrophen Bakterien gefunden.<sup>[46]</sup>

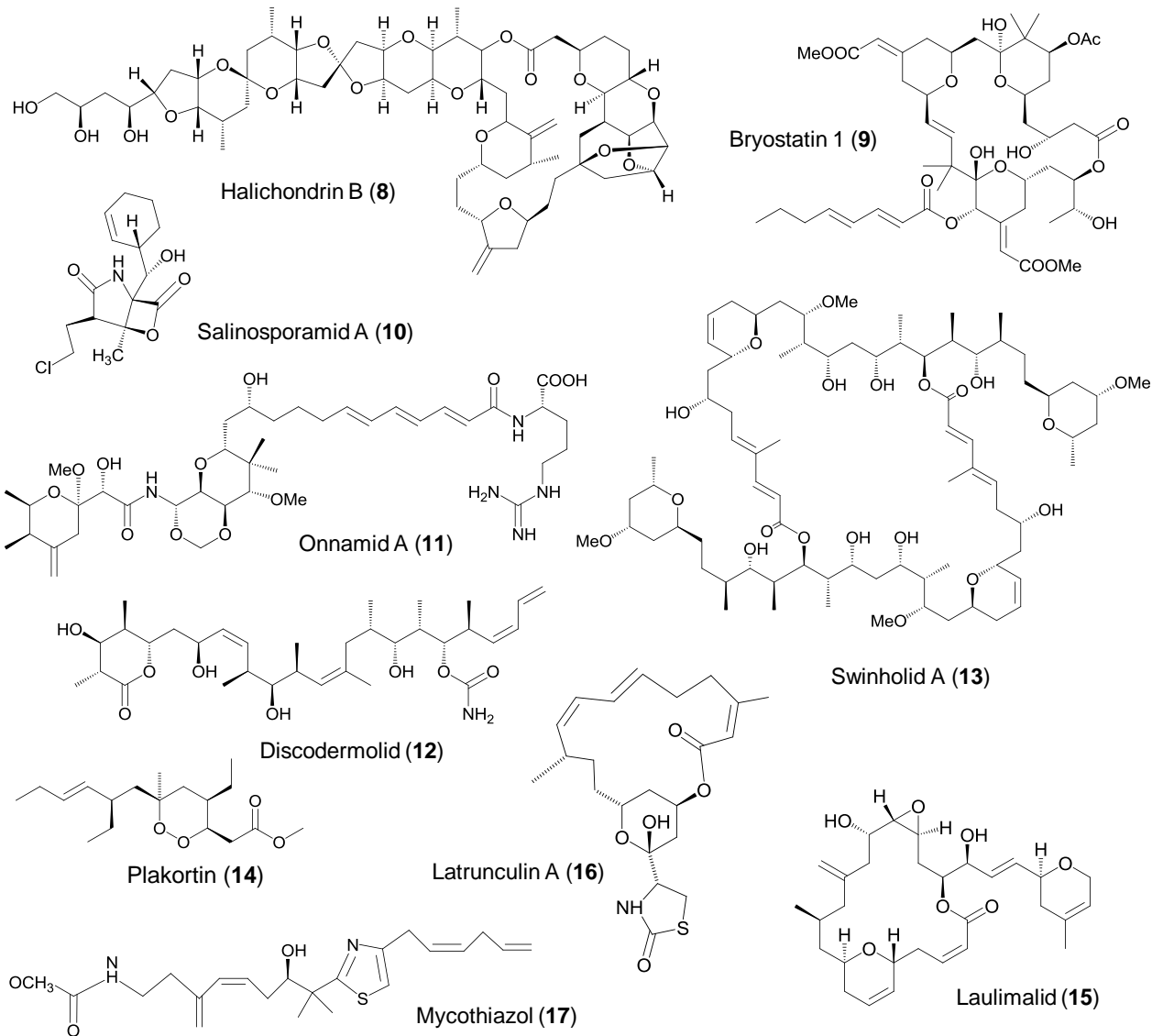
Ebenfalls durch Zellfraktionierung wurde der Verdacht bestätigt, dass auch das Polyketid Plakortin (**14**) und seine Derivate, wie sie in marinen Schwämmen der Gattung *Plakortis* vorkommen, von bakteriellen Symbionten produziert werden.<sup>[9]</sup> In diversen Assays erwies sich Plakortin (**14**) als potentes Antimalaria-Mittel.<sup>[48]</sup>

Aus marinen Pilzen stammt das antitumoral wirksame Polyketid Mycoepoxydien.<sup>[49]</sup>

*Cacospongia mycofijiensis*, der zu den chemisch interessantesten Schwämmen gehört, besitzt sogar drei verschiedene Typen von bioaktiven Polyketiden:



Fijianolide [z. B. Laulimalid (15)]<sup>[50, 51]</sup>, Latrunculin A<sup>[52]</sup> (16) und Mycothiazol<sup>[53]</sup> (17) (Abb. 2).

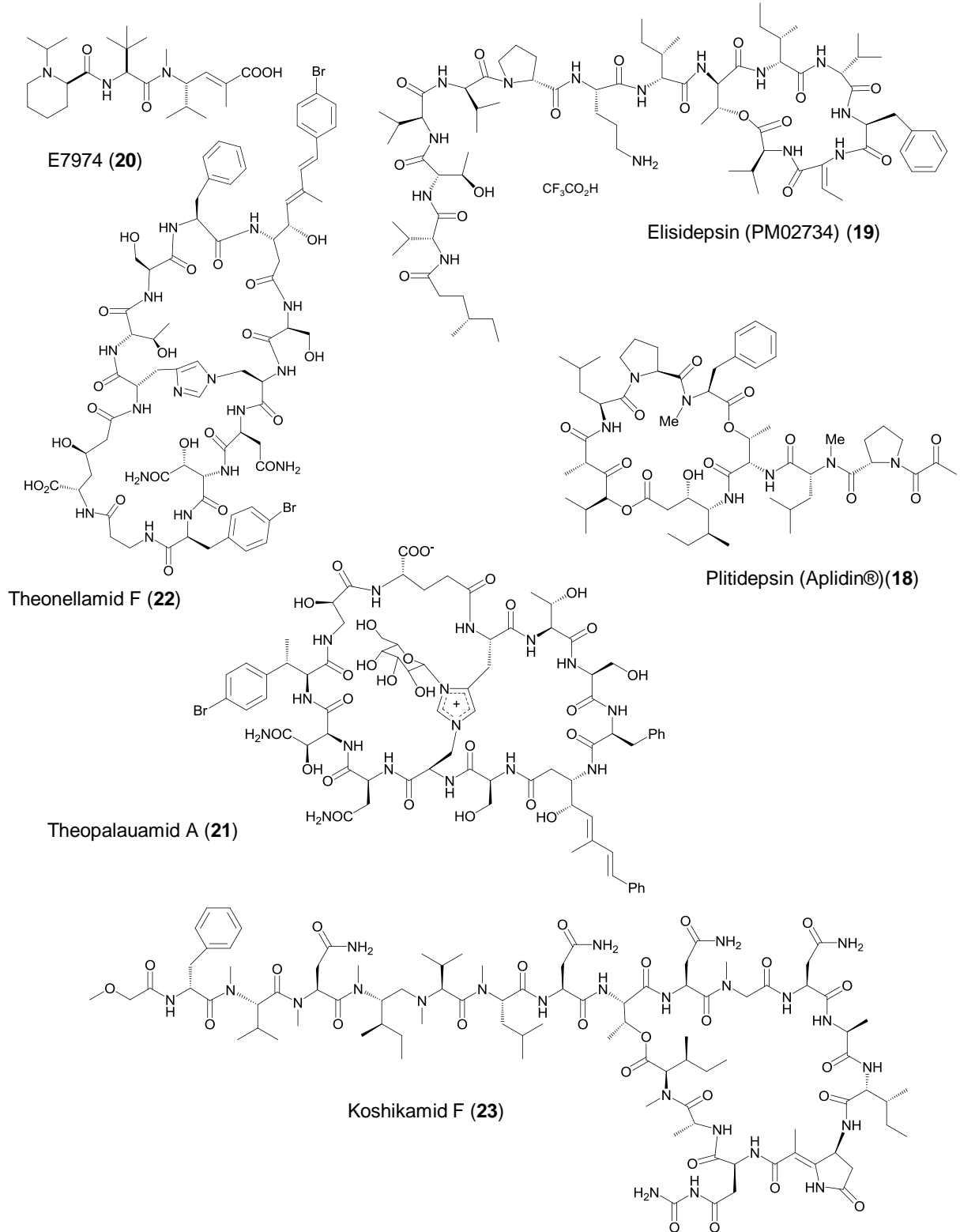


**Abb. 2:** Beispiele für pharmakologisch interessante Polyketide marinen Ursprungs.

## Peptide

Potentielle Antitumormittel sind die zyklischen Peptide Plitidepsin (Aplidin®) (18) (Abb. 3) aus der Tunikate *Aplidium albicans*<sup>[54]</sup> und Elisidepsin (19), einem Vertreter der Kahalalid Familie aus der herbivoren marinen Schnecke *Elysia rufescens*.<sup>[55]</sup> Die zyklischen Peptide befinden sich beide in der klinischen Phase III (Plitidepsin), bzw. Phase II (Elisidepsin) als Antitumor-Mittel.<sup>[30]</sup>

Das synthetisch gewonnene antitumorale Tripeptid Hemiasterlin (**20**) (E7974) wurde erstmals aus dem marinen Schwamm *Hemiasterella minor* isoliert und befindet sich derzeit in klinischen Studien der Phase I.<sup>[56]</sup>



**Abb. 3:** Beispiele für pharmakologisch interessante Peptide marinen Ursprungs.

Theopalauamid A (**21**) ist ein fungizides bicyklisches Glycopeptid aus dem Schwamm *T. swinhoei*.<sup>[57]</sup> Es wurde in der Zellfraktion eines bakteriellen Symbionten, des filamentösen  $\delta$ -Proteobakteriums „*Candidatus* Entotheonella palauensis“<sup>[58]</sup> gefunden.<sup>[46]</sup> Das ebenfalls fungizide und zytotoxische Theonellamid F<sup>[59]</sup> (**22**) ist ein Dodecapeptid aus *T. swinhoei*. Desweiteren sind die zytotoxischen linearen Undecapeptide Koshikamid A<sub>2</sub>,<sup>[60]</sup> sowie die verwandten Vertreter Koshikamid C und E<sup>[60]</sup> in Schwämmen der Gattung *Theonella*. gefunden worden.

Von diversen zyklischen Peptiden aus marinen Schwämmen (z. B. Koshikamid F (**23**), G und H, Mutremdamid A und Perthamid B aus *Theonella* sp.) ist bekannt, dass sie eine HIV-1 Infektion inhibieren können (**Abb. 3**).<sup>[61]</sup>

Die antitumoral (antineoplastisch) wirkenden zyklischen Peptide der Patellamid-Familie aus marinen Tunikaten nehmen eine Sonderstellung ein, da sie nachgewiesenermaßen ribosomal, und nicht von einer nichtribosomalen Peptidsynthase (NRPS) gebildet werden. Der Gencluster ist aus cyanobakteriellen obligaten Symbionten (*Prochloron* sp.) isoliert und erfolgreich in *E. coli* heterolog exprimiert worden.<sup>[62]</sup>

### Alkaloide

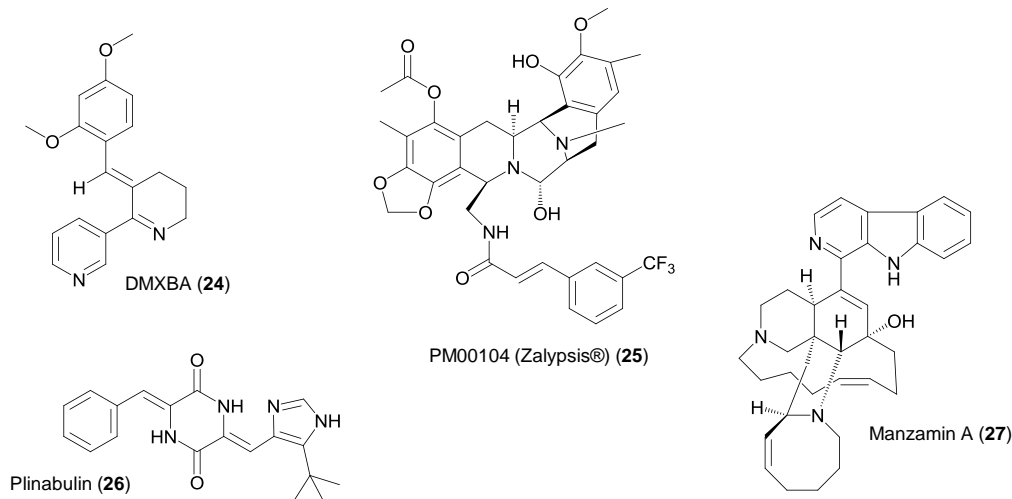
DMXBA (**24**) (**Abb. 4**) ist ein synthetisches Derivat des Alkaloids Anabasin aus diversen marinen Schnurwürmern (Nemertea) und wird derzeit in Phase II als Medikament gegen Schizophrenie getestet.

Das Isochinolon PM00104 (**25**) (Zalypsis®) befindet sich in Phase II Studien. Der antitumorale Wirkstoff gehört zur Familie der Renieramycine, die aus marinen Schwämmen, bzw. auch der marinen Schnecke *Jorunna funebris* bekannt sind und wird synthetisch hergestellt.<sup>[34]</sup>

Ebenfalls in Phase II Studien als Medikament gegen Krebs wird derzeit Plinabulin (**26**) getestet. Dies ist ein synthetisches Diketopiperazin, das auf den Naturstoffen Phenylahistin und Halimid aus marinen Schimmelpilzen (*Aspergillus* sp.) aufbaut.<sup>[63]</sup>

Manzamin-Alkaloide aus mehreren marinen Schwämmen (9 Gattungen, z. B. *Haliclona*, *Xestospongia*, *Ircinia*, *Amphimedon*) bilden eine Bibliothek von mehr als 40 Strukturen.<sup>[64, 65]</sup> Diese höchstinteressanten Naturstoffe haben vielfältige Bioaktivitäten, u. a. antitumorale, antibakterielle, zytotoxische und Antimalaria-

Aktivität.<sup>[65]</sup> Der bakterielle Manzamin A (**27**)-Produzent *Micromonospora* sp. M42 (Actinobacteria) konnte aus dem Schwamm *Acanthostrongylophora* sp. isoliert, identifiziert und auch kultiviert werden.<sup>[66]</sup> Die Fermentation von *Micromonospora* sp. wurde patentiert; jedoch blieb die Suche nach dem Gencluster bisher erfolglos (**Abb. 4**).<sup>[62]</sup>



**Abb. 4:** Beispiele für pharmakologisch interessante Alkaloide marinen Ursprungs.

### Marine Wirkstoffe weiterer Naturstoffklassen

In klinischen Studien der Phase I als Mittel zur Förderung der Wundheilung befinden sich die Diterpen-Glykoside aus der Familie der Pseudopterosine [z. B. Pseudopterosin A (**28**) (**Abb. 5**)]. Sie stammen von bakteriellen Symbionten symbiotischer Protisten (Dinoflagellata) der marinen Weichkoralle *Pseudopterogorgia elisabethae* (Alcyonacea).<sup>[67, 68]</sup>

Das marine Sesquiterpenoid-Hydrochinon Avarol (**29**) aus dem Schwamm *Dysidea avara* besitzt das Potential als Medikament gegen Psoriasis, einer Autoimmunerkrankung der Haut, eingesetzt zu werden<sup>[69]</sup> und hat überdies auch entzündungshemmende und antioxidative Wirkungen.<sup>[70]</sup> Ähnliche Verbindungen aus dem gleichen Schwamm sind Avaron (**30**) und Isozonarol (**31**).

Zytotoxische orangefarbene Pigmente, die Aurantoside [z. B. Aurantosid A (**32**)] aus *Theonella* sp. sind antimykotisch wirkende Glykoside der Tetransäure. Sie werden mit sehr großer Wahrscheinlichkeit von Symbionten gebildet (**Abb. 5**).<sup>[71]</sup>

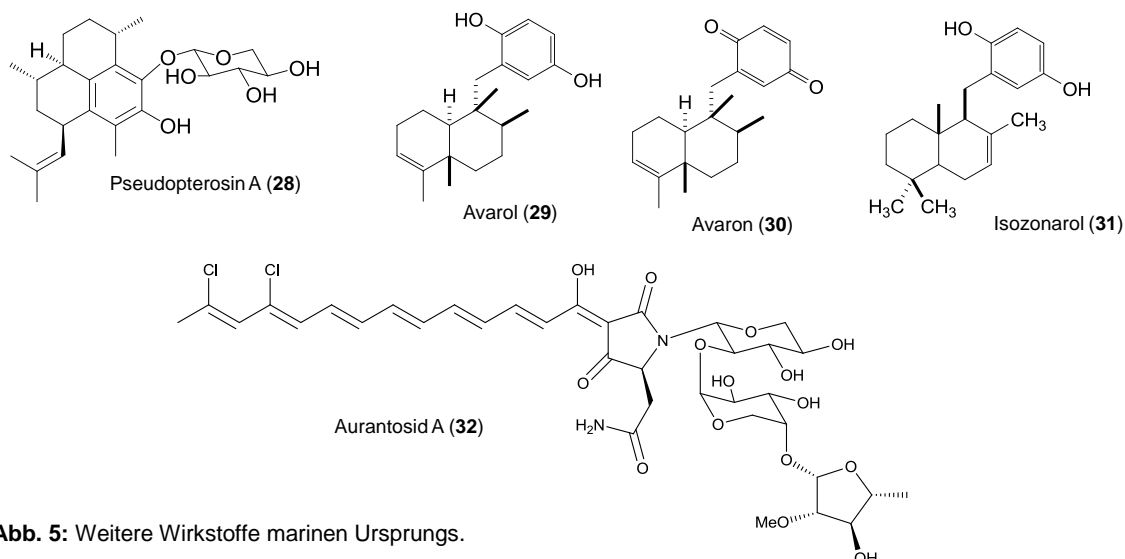


Abb. 5: Weitere Wirkstoffe marinen Ursprungs.

## C 1.2 Nachhaltige Quellen mariner Wirkstoffe

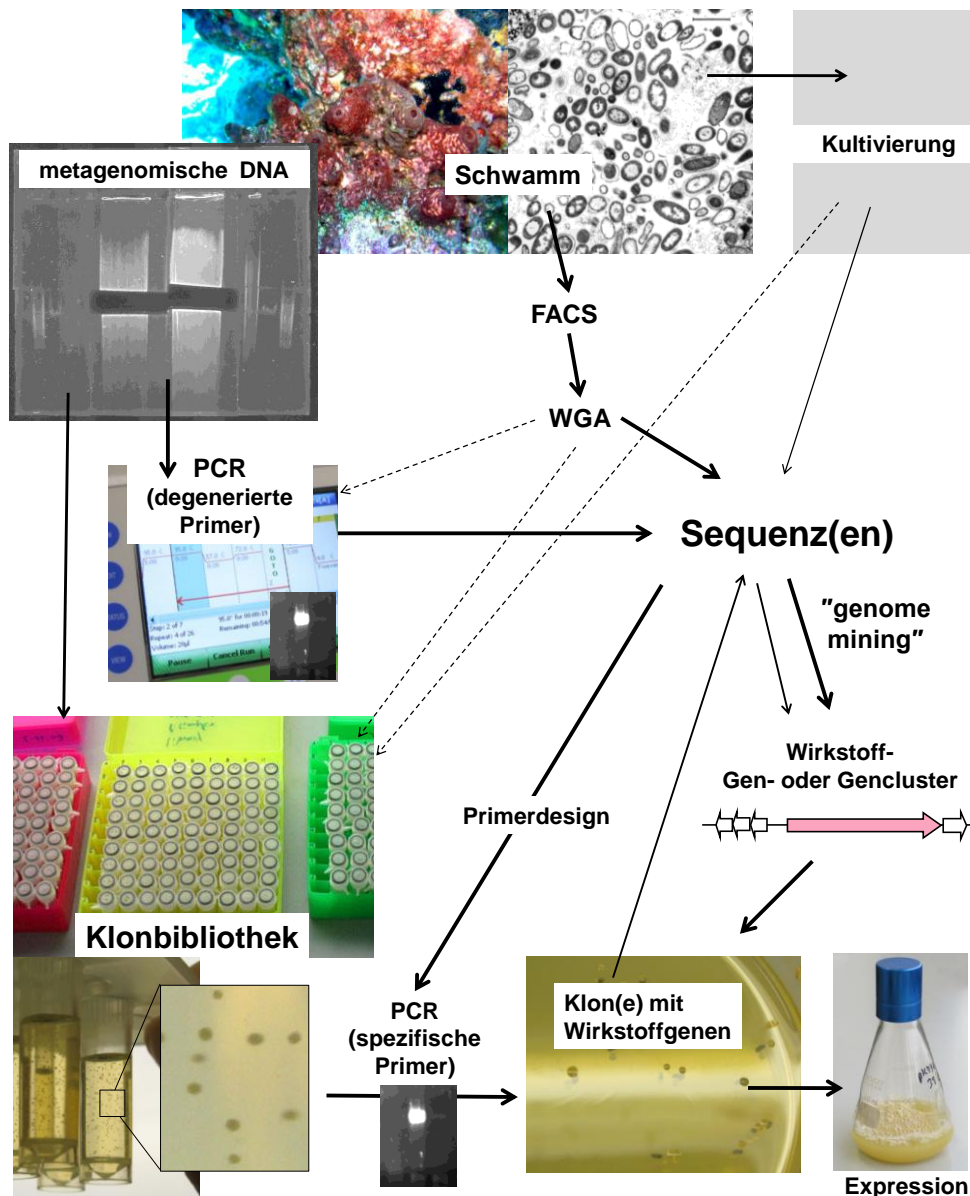
Die Anzahl der anerkannten Arzneimittel aus marinen Wirkstoffen ist im Vergleich zur riesigen Menge an hochwirksamen Naturstoffen aus marinen Wirbellosen außerordentlich gering. Der Hauptgrund hierfür liegt in der geringen Bioverfügbarkeit: Die Menge an Substanzen, die in den Tieren gefunden wird, reicht für klinische (und oft auch für präklinische) Studien bei Weitem nicht aus. Beispielsweise mussten für die Beschaffung von nur 18 g Bryostatin 13 t Bugula gesammelt werden,<sup>[29]</sup> und für die Strukturaufklärung von Psymberin (55) wurden 11 Jahre lang 600 Schwamm-Extrakte akkumuliert.<sup>[6]</sup> Auch der Wildfang einer großen Anzahl von Tieren ist ökologisch unverantwortbar und wäre in manchen Fällen auch keine Lösung, da selbst die gesamte Weltpopulation z. B. einer Schwammart noch nicht genug wäre, um die Versorgung mit einem Medikament zu gewährleisten.

### C 1.2.1 Metagenomik und heterologe Expression

Auf der Suche nach erneuerbaren Quellen für Wirkstoffe aus der „Apotheke des Meeres“ zur Lösung des Versorgungsproblems ist die heterologe Expression der Gene, bzw. Gencluster in Laborbakterien einer der vielversprechendsten Wege. Dieser Weg ist theoretisch in allen Fällen gangbar, in denen der betreffende Naturstoff durch einen mikrobiellen Symbionten produziert wird und die Gene geclustert sind, was hauptsächlich für komplexe Polyketide und Peptide gilt.

## Das Auffinden der Gene

Bevor eine heterologe Expression durchführbar ist, müssen die Wirkstoffgene identifiziert worden sein. Dies geschieht z. B. mit den kultivierungsunabhängigen Methoden der Metagenomik.<sup>[72, 73]</sup> Dazu wird entweder metagenomische DNA durchmustert, oder DNA, die durch Gesamtgenomamplifizierung (WGA) vereinzelter Symbiontzellen gewonnen wurde. Durch moderne Sequenziermethoden (z. B. 454-Sequenzierung) ist es neuerdings möglich, das erhaltene Gesamtgenom mit relativ wenig Aufwand zumindest teilweise zu sequenzieren, um es *in silico* auf Wirkstoffgencluster hin zu untersuchen („genome mining“).<sup>[11]</sup> In den seltenen Fällen, in denen der Symbiont kultivierbar ist, kann einfach die aus der Kultur extrahierte genomische DNA für die Sequenzierung verwendet werden. (Abb. 6).



**Abb. 6:** Schema zur heterologen Expression von Wirkstoffgenen aus bakteriellen Symbionten. FACS, Fluss-Sortierer zur Vereinzelung bakterieller Zellen; WGA, Gesamtgenomamplifizierung der vereinzelter Bakterien. Schwammfoto: *T. swinhoei* (Y. Nakao, Universität Tokio), TEM-Foto: symbiotische Bakterien aus *Aplysina aerophoba*, aus<sup>[8]</sup>.

## Expression der Gene

Findet die Expression der Gene in Bakterien statt, die diese Gene bzw. Gencluster normalerweise nicht besitzen, wird sie als „heterologe Expression“ bezeichnet.<sup>[74]</sup>

In den meisten Fällen werden dafür sogenannte „Laborbakterien“ eingesetzt, also solche Bakterien, die u. a. relativ schnell wachsen und leicht transformierbar sind. Das „Arbeitstier“ für heterologe Genexpressionen ist nach wie vor *E. coli*. Dieses Bakterium lässt sich leicht genetisch manipulieren, es wächst sehr schnell und ist biochemisch sehr gut untersucht. Ein Vorteil für die Expression von Polyketidsynthasen (PKS) in *E. coli* ist, dass das Bakterium selbst keine PKS besitzt, die möglicherweise mit der zu exprimierenden interferieren könnte. Allerdings müssen den Bakterien zur Expression von PKS geeignete PPTasen (siehe C 2.1) hinzugefügt werden,<sup>[75]</sup> da die *E. coli*-eigene PPTase auf den Fettsäuremetabolismus beschränkt ist. Im Einzelfall ist die Zugabe von speziellen Polyketidstartereinheiten notwendig. Da der häufig notwendige Polyketidbaustein Methylmalonyl-CoA (**35**) von *E. coli* normalerweise nicht produziert wird, kann bei Bedarf auf entsprechend genetisch modifizierte *E. coli* Stämme zurückgegriffen werden, um die hohen Kosten für dessen Zugabe zu vermeiden.<sup>[76]</sup> Der Nachteil der Expression in *E. coli* ist allerdings der oftmals abweichende Codongebrauch und die oft nicht funktionierende korrekte Faltung der Proteine. Bisher konnten PKS aller drei Typen (Typ I, II, III, siehe C 2.2) erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden. Herausragende Beispiele hierfür sind die Produktion von Erythromycin, Epothilon (beide Typ I), PK8, SEK26 (beide Typ II), sowie der Typ-III-PKS-Produkte Resveratrol und Pinocembrin.<sup>[76]</sup>

Aus verschiedenen Gründen führt die Expression in *E. coli* nicht immer zum Erfolg, und der Einsatz anderer Bakterien als heterologe Wirte ist notwendig, was oft mit deutlich geringeren Ausbeuten im Vergleich zu *E. coli* einhergeht. Ist Näheres über die Identität des bakteriellen Symbionten bekannt, ist ein Gelingen der Expression in einem nah verwandten „Laborbakterium“ am wahrscheinlichsten. So konnte z. B. der Typ-II-PKS-Gencluster für Griseorhodin A aus *Streptomyces* sp. JP95 der mit der marinen Tunikaten *Aplidium lenticulum* assoziiert war, erfolgreich in *Streptomyces albus* heterolog exprimiert werden.<sup>[77]</sup>

### **C 1.2.2 Weitere erneuerbare Quellen mariner Wirkstoffe**

Die meisten anerkannten Arzneimittel und Arzneimittelkandidaten aus der „Apotheke des Meeres“ (siehe C 1.1) werden in chemischer Totalsynthese oder Semisynthese hergestellt, um die erforderlichen Mengen bereitzustellen. Aber oft sind Synthesen zu aufwändig und/oder zu vielstufig und damit ökonomisch nicht sinnvoll. Vor allem gilt dies für die oft besonders interessanten komplexen Polyketide und nichtribosomalen Peptide, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

In den ganz seltenen Fällen, in denen der Wirkstoff von einem kultivierbaren symbiotischen Mikroorganismus produziert wird, kann durch Fermentation im Labor der Naturstoff heterolog produziert werden. Ein Beispiel hierfür ist der Manzamin A (**27**)-Produzent *Micromonospora* sp. M42, der in der Gruppe von Russel T. Hill fermentiert wurde. Die erzielten Ausbeuten waren jedoch im Vergleich zu gängigen Ausbeuten von *E. coli* ungefähr 10-fach geringer.<sup>[66]</sup>

Oft wird auch versucht, die marinen Wirbellosen selbst in Marikultur oder *ex situ*-Kultur zu vermehren, um nachhaltig einen Wirkstoff ernten zu können. Das gelingt aber in den Fällen, in denen der Stoff symbiotisch produziert wird meist nicht, da die Symbionten aus noch unbekanntem Gründen nicht stabil im Wirt bleiben. Ein weiterer Nachteil sind die Anfälligkeit der „Monokulturen“ gegen Krankheiten und Schädlinge.<sup>[36]</sup>

Ein modernerer Ansatz zur erneuerbaren Naturstoffgewinnung durch Kultivierung sind die Züchtung von Zellkulturen oder Schwammzell-Reaggregaten (sogenannten Primmorphen) im Labor.<sup>[78, 79]</sup>



## C 2 Biosynthese von Polyketiden und Fettsäuren

Unter den Naturstoffen von pharmakologischem Interesse sind es häufig komplexe Polyketide und nichtribosomale Peptide, die von bakteriellen Symbionten produziert werden. Die Biosynthese dieser Stoffe wird von riesigen multifunktionellen Enzymen, den modularen PKS (Typ-I-PKS, bzw. PKS I) und nichtribosomalen Peptidsynthasen (NRPS) katalysiert,<sup>[80]</sup> wie sie nur aus Bakterien, Pilzen und Protisten bekannt sind. In Tieren sind solche Multienzyme (mit einer Ausnahme<sup>[81]</sup>) nur für die Produktion der Fettsäuren zuständig, und in Pflanzen wurden sie bisher nicht gefunden.

Die Biosynthese der Polyketide steht mit der der Fettsäuren in einem engen Zusammenhang. Letztere sind meist Produkte des Primärmetabolismus und weniger von pharmakologischem Interesse, obwohl einige von ihnen auch bioaktiv sind.<sup>[36]</sup> Die Fettsäuren werden oft von Fettsäuresynthasen (FAS) des dissoziierten Typs (Typ-II-FAS, bzw. FAS II) gebildet, wie dies in allen Bakterien und bei Pflanzen erfolgt, wobei sich bei letztgenannten die Enzyme in den Plastiden befinden.<sup>[82]</sup> Auch in den Mitochondrien der Tiere<sup>[83]</sup> und Pilze<sup>[84]</sup> befinden sich von bakteriellen FAS abgeleitete Typ-II-Systeme. In Säugetieren und Pilzen werden die Fettsäuren jedoch hauptsächlich von Typ-I-FAS gebildet, wobei zumindest die FAS I der Tiere vom Aufbau her stark den Typ-I-PKS der Bakterien ähneln. Weitere modulare FAS wurden inzwischen auch in einigen Protisten und einigen wenigen Bakterien gefunden.<sup>[85]</sup>

### C 2.1 Mechanismus und beteiligte enzymatische Funktionen

Der Mechanismus der Polyketid-Biosynthese entspricht im Prinzip dem von Fettsäuren. Ob eine Megasyntase als PKS I oder FAS I bezeichnet wird, richtet sich sowohl nach dessen Produkt (Biosynthese), als auch nach phylogenetischen Gesichtspunkten, z. B. in den Fällen, wo die Biosynthese nicht bekannt ist. Deshalb werden manchmal auch fettsäureproduzierende Typ-I-Enzyme als PKS bezeichnet, wenn sie eine höhere Sequenzähnlichkeit zu Synthasen komplexer Polyketide haben, als zu FAS.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf den Typ-I-FAS und -PKS. Bei Fragen bezüglich Details zu den Synthasen der Typen II<sup>[86-88]</sup> und III<sup>[89, 90]</sup> wird auf die reichlich vorhandene Literatur verwiesen.

## Abfolge der Reaktionen

Das Prinzip der Polyketid- und Fettsäure-Biosynthese besteht in der Synthese einer Kette aus kurzen (meist 2 C-Atome langen) Kettengliedern. Es handelt sich dabei im konventionellen Fall um Kettenglieder aus Essigsäureresten, die durch eine Claisen-artige Kondensation von aktivierten Malonsäure-Molekülen [= Malonyl-CoA (**34**)] an die wachsende Kette angeknüpft werden (**Abb. 7**).

Die Biosynthese beginnt mit einer Startereinheit als erstem Substrat, wobei es sich meist um aktivierte Essigsäure [= Acetyl-CoA (**33**)] handelt. Während der Bildung der wachsenden Kette können die intermediären  $\beta$ -Oxo-Gruppen der jeweils letzten Essigsäurekettenglieder schrittweise reduziert werden, sodass daraus  $\beta$ -Hydroxy-,  $\alpha,\beta$ -ungesättigte- oder vollständig reduzierte C2-Einheiten entstehen. Bei der klassischen Fettsäure-Biosynthese sind alle drei genannten Reaktionsschritte obligatorisch, bevor der nächste Essigsäurebaustein angefügt werden kann, dagegen entsteht bei PKS eine große Vielfalt an Produkten durch unterschiedlichen Reduzierungsgrad der  $\beta$ -Oxo-Gruppen. Methylierte Kettenglieder entstehen durch enzymatische  $\alpha$ -Methylierung oder durch den Einbau von methylierten Essigsäurebausteinen, wie z. B. Propionsäure (**Abb. 7**).

Das lineare Produkt besitzt häufig zwischen 6 und 10 Kettenglieder, cyclisiert sich entsprechend seines strukturellen Aufbaus und wird schließlich [meist durch eine Thioesterase (TE)] enzymatisch von der Synthese abgespalten. Danach können durch andere Enzyme (sogen. „Tailoring-Enzyme“) weitere Modifikationen, wie z. B. die Anfügung von Zuckern oder Methylgruppen, erfolgen.

Die Biosynthese der nichtribosomalen Peptide folgt einer ganz ähnlichen Logik wie die der Polyketide.<sup>[91]</sup> Ebenfalls durch modular aufgebaute Megasyntasen katalysiert, wird auch eine Kette aus einfachen molekularen Bausteinen durch Kondensation aneinander gereiht. Anstelle von Essigsäure, bzw. Propionsäure-Kettengliedern sind es im Unterschied hier Aminosäuren, bzw. Arylsäuren, die durch Amidbindungen verknüpfte Ketten bilden.<sup>[92]</sup>



*AT (Acyltransferase, Acyl-CoA:ACP Transacylase)*

Die AT überträgt das Startersubstrat auf das ACP oder direkt auf die KS. Das Startersubstrat ist meist Acetyl-CoA (**33**), kann aber auch bei einigen Polyketiden ein längeres Acyl-CoA-Molekül (z. B. Propionyl-CoA (**38**) oder Hexanoyl-CoA) sein, das auch Methylverzweigungen (z. B. Isovaleryl-CoA) oder aromatische Ringe (z. B. Benzoyl-CoA) aufweisen kann.<sup>[94]</sup> Die AT, die das Startersubstrat überträgt, wird auch Lade-AT genannt. Bei den meisten PKS überträgt eine weitere AT oder mehrere weitere AT (bei multimodularen *cis*-AT-PKS) mit anderer Substratspezifität das Verlängerungssubstrat auf das ACP. Im Falle der FAS I gibt es interessanterweise nur eine AT für die Übertragung von Acetyl-CoA (**33**) und Malonyl-CoA (**34**), die man auch als Malonyl-Acetyl-Transferase (MAT) bezeichnet. Neben dem klassischen Kettenverlängerungsbaustein Malonyl-CoA (**34**) können auch von bestimmten ATs andere Verlängerungseinheiten, wie z. B. Methylmalonyl-CoA (**35**) oder Ethylmalonyl-CoA erkannt und übertragen werden, wodurch Methylverzweigungen an der wachsenden Kette entstehen. Durch den Einsatz mehrerer verschiedener ATs in der Biosynthese derselben Polyketidkette kann die Vielfalt der Substrate erhöht werden.<sup>[95]</sup> Zudem gibt es auch ATs, die je nach Substratangebot sowohl Malonyl-CoA (**34**), als auch Methylmalonyl-CoA (**35**) verarbeiten können.<sup>[96]</sup>

*ACP (Acyl-Carrier-Protein)*

Das ACP empfängt das Startersubstrat von der Lade-AT und überträgt es, vermittelt durch die Flexibilität des posttranslational angefügten PPant-Arms, auf die KS. Außerdem präsentiert das ACP der KS das Verlängerungssubstrat, das es von der AT empfangen hat, und leitet das kondensierte Produkt ( $\beta$ -Oxointermediat) an andere enzymatische Funktionen weiter. Das können entweder Enzyme der Reduktionsschleife, eine MT, eine weitere KS zur Kettenverlängerung (z. B. die KS des nächsten Moduls bei multimodularen PKS), oder zum Beenden der Kette eine TE oder Thioester-Reduktase (R), oder Transferase sein. Das ACP muss folglich sterisch jede andere enzymatische Funktion der PKS erreichen können. Das ACP ist mit ~9 kDa die kleinste der Megasyntase-Domänen. Es besteht aus vier  $\alpha$ -Helices, korrespondierend mit der eher langgestreckten Form der Polyketidkette.<sup>[97]</sup>

*KS ( $\beta$ -Ketosynthase)*

Im ersten Zyklus empfängt die KS den Starterbaustein vom ACP, bindet ihn an ihrem Cysteinrest und katalysiert eine Claisen-artige decarboxylierende Kondensation mit dem vom ACP angebotenen Verlängerungsbaustein (**Abb. 7**).<sup>[98]</sup> In allen weiteren Zyklen empfängt die KS die wachsende Polyketidkette von dem ACP, bindet diese wiederum an ihren Cysteinrest und kondensiert sie mit der von dem ACP bereitgestellten Verlängerungsbaustein. Im Fall von iterativen FAS und PKS wird für alle Kondensationen dieselbe KS benutzt, die dann eine breite Substratspezifität haben muss, die allerdings bei FAS auf gesättigte Substrate beschränkt ist. Bei sequentiell arbeitenden modularen PKS dagegen, gibt es für jeden Verlängerungsschritt eine eigene KS-Domäne. Eine Besonderheit auch hinsichtlich der KS-Domänen stellen *trans*-AT-PKS dar.<sup>[7]</sup> Es wurde entdeckt, dass es KS Domänen gibt, die keine Kondensation durchführen (sogen. KS<sub>0</sub>), und dass die KS-Domänen sehr substratspezifisch sind.<sup>[99]</sup>

Eine besondere Form der KS-Domänen sind KS<sub>Q</sub>-Domänen, wie sie in einigen Lademodulen von PKS (z. B. Niddamycin-PKS) zu finden sind. Bei ihnen ist der Cysteinrest des aktiven Zentrums zu Glutamin mutiert.<sup>[100]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass diese Domänen keine Kondensierung, wohl aber die Decarboxylierung katalysieren können.<sup>[97]</sup> Ihre Funktion ist wahrscheinlich, Startereinheiten [Acetyl-CoA (**33**), Propionyl-CoA (**38**)] durch Decarboxylierung von Malonyl-, bzw. Methylmalonyl-ACP in größerer Menge bereitzustellen.<sup>[101]</sup>

Im Unterschied zu den anderen Enzymen der Polyketid-Biosynthese, mit Ausnahme der ER und DH, ist die KS strukturell kein Monomer, sondern ein Homodimer.<sup>[102]</sup> Die KS-Domäne ist damit in vielen PKS-Modulen maßgeblich an der Dimerisierung der Megasyntasen beteiligt.

*Die Enzyme der Reduktionsschleife: KR ( $\beta$ -Ketoreduktase), DH (Dehydratase), ER (Enoylreduktase)*

Die KR reduziert die  $\beta$ -Oxo-Gruppe der wachsenden Kette bei gleichzeitiger Oxidation des Kofaktors NADPH, der an einem Rossmann-gefalteten Bereich gebunden wird (**Abb. 7**).<sup>[103]</sup> Das Enzym gehört der Familie der „Short-chain Dehydrogenasen“ an.<sup>[104]</sup> Die DH eliminiert die von der KR zur Hydroxylgruppe reduzierte  $\beta$ -Oxo-gruppe unter Wasserabspaltung weiter zu einer *trans*-Doppelbindung, die von der ER schlussendlich zu einer Einfachbindung reduziert wird, wobei wie bei der KR der Kofaktor NADPH als Hydrid-Donor benötigt

wird (**Abb. 7**). Die ER gehört zur Enzymfamilie der „Medium-chain-Dehydrogenasen“ und besitzt zur Bindung des Kofaktors eine Stelle mit Rossmann-Faltung.<sup>[105]</sup>

#### *MT (Methyltransferase)*

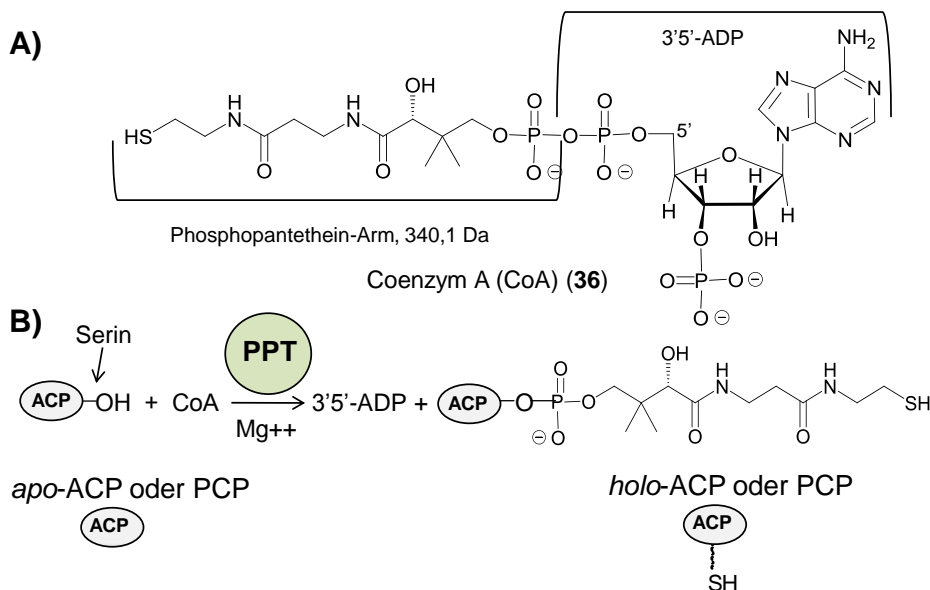
Die MT katalysiert die Einfügung einer  $\alpha$ -Methylgruppe in die wachsende Polyketidkette. Der Methylgruppendonor ist *S*-Adenosylmethionin (SAM).

#### *TE (Thioesterase) und R (Thioesterreduktase)*

Die TE empfängt die fertige Polyketid- oder Fettsäure-Kette von der ACP, bindet die Kette an einem nukleophilen Serin-Rest und katalysiert ihre Abtrennung von der Synthase als freie Säure oder Acylester durch Hydrolyse. Bei vielen PKS, aber auch NRPS finden an der TE Cyclisierungen (z. B. zwischen Keto- und Hydroxylgruppen) statt. Anstelle einer TE- kommt in manchen Fällen auch eine R-Domäne vor, beispielsweise bei pilzlichen PKS-NRPS<sup>[106]</sup> und bei der CpFASI von Protisten.<sup>[107]</sup> In diesen Fällen wird die fertige Kette als Alkohol abgespalten.

#### **4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen)**

Die Carrier-Protein-Domänen (ACP, bzw. PCP) der PKS, FAS, bzw. NRPS erfordern die Konversion von der *apo*- zur *holo*-Form des zugehörigen Enzyms durch posttranslationelle Anfügung eines Phosphopantetheinyl- (PPant-) Arms. Diese Reaktion wird durch PPTasen katalysiert, die auch als *Holo*-[Acyl-Carrier-Protein] Synthasen bezeichnet werden.<sup>[108]</sup> Das Substrat dieser Enzyme ist CoA (**36**) (**Abb. 8**).



**Abb. 8:** PPTase-katalysierte Umwandlung des *apo*-ACPs zum *holo*-ACP.

Die PPTase-Superfamilie wurde erstmals 1996 beschrieben.<sup>[108]</sup> Es gibt zwei große Gruppen<sup>[109]</sup> von PPTasen: solche vom AcpS-Typ (für FAS II oder PKS II) und solche vom Sfp/EntD Typ (für FAS I, PKS und NRPS). Die PPTasen vom Sfp/EntD-Typ haben eine breitere Substratspezifität als die PPTasen für die Typ-II-Enzyme. Die  $\alpha$ -Untereinheit der FAS der Pilze, die eine PPTase vom AcpS-Typ enthält (Abb. 10 H), wird manchmal als dritter Typ bezeichnet.<sup>[110]</sup>

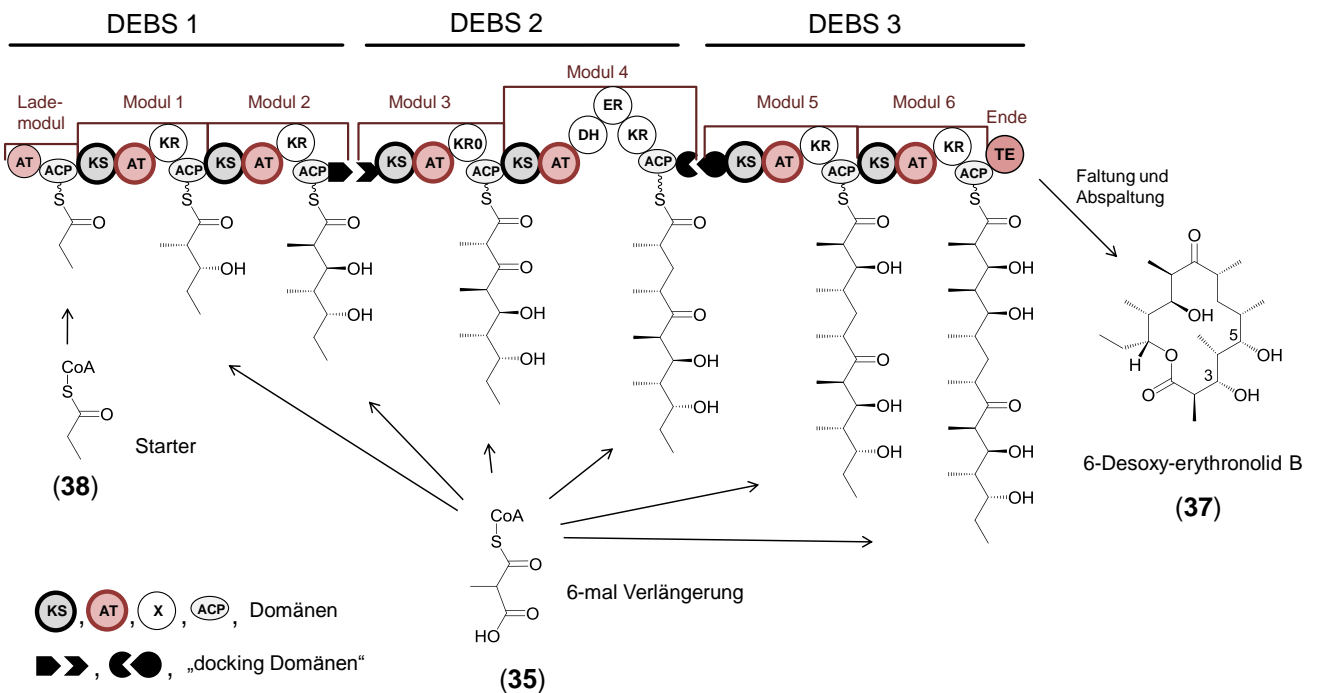
Für die heterologe Expression von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden sind PPTasen essentiell; ein PPTase-Gen kann, wie im Falle des *sup*-Clusters aus *T. swinhoei*, direkt im Biosynthesecluster lokalisiert sein, muss es aber nicht. In den Fällen, in denen keine PPTase im Cluster codiert ist oder nur das PKS-Gen heterolog exprimiert werden soll, wird meist Sfp<sup>[108]</sup> oder Svp<sup>[111]</sup> koexprimiert, bzw. nachträglich *in vitro* eingesetzt. Sfp stammt aus *Bacillus subtilis* (niedriger GC-Gehalt) und Svp aus dem PKS/NRPS-Gencluster für die Biosynthese von Bleomycin in *Streptomyces verticillus*.<sup>[112]</sup>

## C 2.2 Aufbau modularer FAS und PKS

Vom Aufbau her stehen generell die fusionierten Megasyntasen vom Typ I den dissoziierten Enzymen vom Typ II gegenüber. Ein dritter Typ sind die Stilben-, bzw. Chalconsynthasen der Pflanzen, die aus nur einem einzigen Enzym bestehen. Letztere werden als Typ-III-PKS bezeichnet und sind neuerdings auch in Pilzen und einigen Bakterien nachgewiesen worden.<sup>[89, 90]</sup> Bei den bisher bekannten bakteriellen Naturstoffsymbiosen spielen die Typ-II-Systeme nur eine untergeordnete Rolle, im Gegensatz zu freilebenden Bakterien, wo ihnen eine große Bedeutung, beispielsweise bei der Bildung komplexer aromatischer Polyketid-Wirkstoffe in Actinobacteria, zukommt.<sup>[88]</sup>

Die Typ I-Enzyme sind multifunktionale Riesenenzyme mit den einzelnen enzymatischen Funktionen in Form von Domänen. Ein Satz von Domänen, der ausreichend für die Verlängerung der wachsenden Kette ist, ergibt ein Modul. Zusätzlich können auch spezielle Lademodule ausgeprägt sein, die die erforderlichen enzymatischen Funktionen für die Rekrutierung der Startereinheit tragen (Abb. 9). Evolutiv sind die Typ-I-Enzyme wahrscheinlich aus dem Typ II durch Fusion der einzelnen dissoziierten Enzyme zu Modulen entstanden.<sup>[113]</sup> Zusätzlich zu den Domänen entstanden die sogenannten Linkerregionen, also Bereiche außerhalb der enzymatischen Funktionen. Es gibt sie nur bei den Typ-I-

Megasyntasen und dort im Speziellen sowohl zwischen den Domänen zur Gewährleistung der Sekundär- und Tertiärstruktur, als auch an den N- und C-Termini der Module, wo sie als sogenannte „Docking“-Domänen sicherstellen, dass die richtigen Polypeptide miteinander interagieren (**Abb. 9**).<sup>[5, 97]</sup> Sowohl die FAS I der Tiere, als auch die PKS I sind nur als Homodimere aktiv. Kristallstrukturanalysen haben bei diesen beiden Megasyntasen eine sehr ähnliche Anordnung der Polypeptidketten („head-to-head“) feststellen können.<sup>[97, 114-116]</sup> Von diesem Modell weichen lediglich die FAS I der Hefen deutlich ab.<sup>[117, 118]</sup>



**Abb. 9:** Schematischer Aufbau von multimodularen PKS. Erläuterungen im Text (siehe C 2.2.2). Schema modifiziert nach<sup>[3-5]</sup>

Während der evolutiven Entwicklung hin zu multimodularen Enzymen durch Duplikation von Modulen wurde von der iterativen zur sequentiellen („modularen“) Arbeitsweise übergegangen. Seltene Beispiele für Mischformen, wo in einem modular arbeitenden Enzym(komplex) noch einzelne Module iterativ verwendet werden, zeugen von diesem evolutiven Übergang.<sup>[119, 120]</sup>

Bei monomodularen Enzymen ist es obligatorisch, dass das Modul während der Biosynthese mehrfach hintereinander verwendet wird, um eine bestimmte Kettenlänge aufzubauen. Diese Arbeitsweise wird als „iterativ“ bezeichnet.

Dagegen wird von den multimodularen Megaenzymen in der Regel jedes Modul nur einmal benutzt, und die Produkte werden danach an das nächste Modul



weitergereicht. Das bedeutet, dass für jede Verlängerungseinheit ein neues Modul gebraucht wird. Beispielsweise sind das 10 Module für eine Kette aus 10 Bausteinen (**Abb. 9**).

In **Abb. 10** sind Vertreter aller bekannten Typen von Megasyntasen schematisch dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Linkerregionen, sowie die Form der Quartärstruktur der Enzyme (Dimerisierung) weggelassen.

### C 2.2.1 Iterativ arbeitende Megasyntasen

Das Lehrbuchmodell eines Megaenzym mit iterativer Arbeitsweise ist die cytosolische FAS I der Säugetiere. Weitere bekannte Vertreter sind die PKS I der Pilze, sowie einige seltenere fettsäureproduzierende Enzyme. Eine besonders außergewöhnliche PKS stellt die PKS12 aus *M. tuberculosis* dar.

#### FAS I der Säugetiere

Die FAS I aus dem Cytosol der Säugetiere katalysiert die Produktion von Palmitinsäure (**39**) in 7 Kondensationsschritten und 21 Schritten der  $\beta$ -Kohlenstoffprozessierung. Ein Monomer ist 272 kDa lang und besitzt neben KS-, AT-, ACP- und terminaler TE-Domäne den vollständigen Satz reduktiver Domänen. In der zentralen „Core“-Region wurde unlängst das Rudiment einer MT-Domäne entdeckt (**Abb. 10 A**).<sup>[115]</sup> Trotz ihrer Eigenschaft als Fettsäuresynthase und Zugehörigkeit zum Primärmetabolismus steht dieses Megaenzym phylogenetisch den PKS I des Sekundärmetabolismus' viel näher, als den FAS I aus Pilzen und Bakterien.<sup>[121]</sup>

#### PKS I aus Pilzen (und einigen Bakterien)

Die PKS I vom Pilztyp können, je nach Reduktionsgrad des Produktes, in die Gruppen „hoch reduzierend“ (HR), „teilweise reduzierend“ (PR) und „nicht reduzierend“ (NR) eingeteilt werden.<sup>[122]</sup>

##### *HR ("highly reducing") PKS*

Diese Gruppe von PKS I ist phylogenetisch gesehen eine Schwestergruppe der FAS I aus Säugetieren.<sup>[123]</sup> Ein Beispiel ist die PKS<sub>N</sub> aus *Alternaria solani*, ein 2.551 AS langes Enzym zur Produktion von Alternapyron (**40**) (**Abb. 10 B**).<sup>[124]</sup>

##### *PR ("partially reducing") PKS*

Eine der bekanntesten PKS I aus Pilzen ist die MSAS aus *Penicillium patulum* zur Produktion von 6-Methylsalicylsäure, dem Vorläufer von Patulin.<sup>[125]</sup> Jedoch sind

inzwischen auch aus Bakterien einige aromatische Polyketide bekannt, die von MSAS-ähnlichen Enzymen produziert werden.<sup>[126]</sup> Ein Beispiel ist AviM, dessen Produkt Orsellinsäure (**41**) ist, das Aglycon der antibiotisch wirkenden Avilamycine (**Abb. 10 C**).<sup>[127, 128]</sup>

#### *NR ("non-reducing") PKS*

Ein aromatisches Mycotoxin aus *Aspergillus* ist Aflatoxin B. Seine Biosynthese erfolgt über Norsolorinsäure, an deren Biosynthese die PKS I PksA beteiligt ist (**Abb. 10 D**).<sup>[129, 130]</sup>

#### **Mas-artige PKS I in *Mycobacterium tuberculosis***

Die Mycocerosinsäure-Synthase (Mas) aus pathogenen *M. tuberculosis* katalysiert vier Verlängerungszyklen von C-16/18-CoA mit Methylmalonyl-CoA (**35**) (**Abb. 10 F**). Das Vorläufer-Acyl-CoA ist in diesem Fall das Produkt (Phenolphthiocerol) einer PKS I (PpsABCDE). Die Mas enthält keine Ablösedomäne; stattdessen erfolgt die Übertragung von zwei Mycocerosinsäure (**42**)-Ketten durch Veresterung auf Phthiocerol durch die externe AT PapA5 ("polyketide-associated protein"), wodurch das Zellwand-Lipid (PDIM = Phthiocerol Dimycocerosinsäure) entsteht.<sup>[131-136]</sup> Den gleichen Aufbau hat PKS2 zur Synthese von Phthioceransäuren (Bestandteile von Sulfolipiden) bei Verwendung einer kürzeren Vorstufe (**Abb. 10 F**).<sup>[137]</sup> Ein Beispiel für die Iteration zweier Module hintereinander bietet die PKS12. Sie baut mit Hilfe ihrer zwei Module zur Produktion des methylverzweigten Mykoketids (**43**) der MPM (Mannosyl- $\beta$ -1-Phosphomykoketide) alternierend Methylmalonyl-CoA (**35**) und Malonyl-CoA (**34**) ein (**Abb. 10 E**).<sup>[95, 135, 138]</sup>

Phylogenetisch sind die mykobakteriellen PKS I näher mit den *cis*-AT-, als mit den *trans*-AT-PKS verwandt (siehe C 4.1, Abb. 14).

#### **Endiine**

Endiine sind potente Antitumor-Antibiotika aus Actinomycetales. Die an der Biosynthese jedes Endiins beteiligte iterative PKS I generiert die polyungesättigte Kohlenstoffkette, die später zum Kern des Endiins wird.

Im Falle der SgcE aus dem Gencluster für C-1027 ist das Produkt ein all-*trans*-Heptaen (**44**) (**Abb. 10 G**).<sup>[139, 140]</sup>

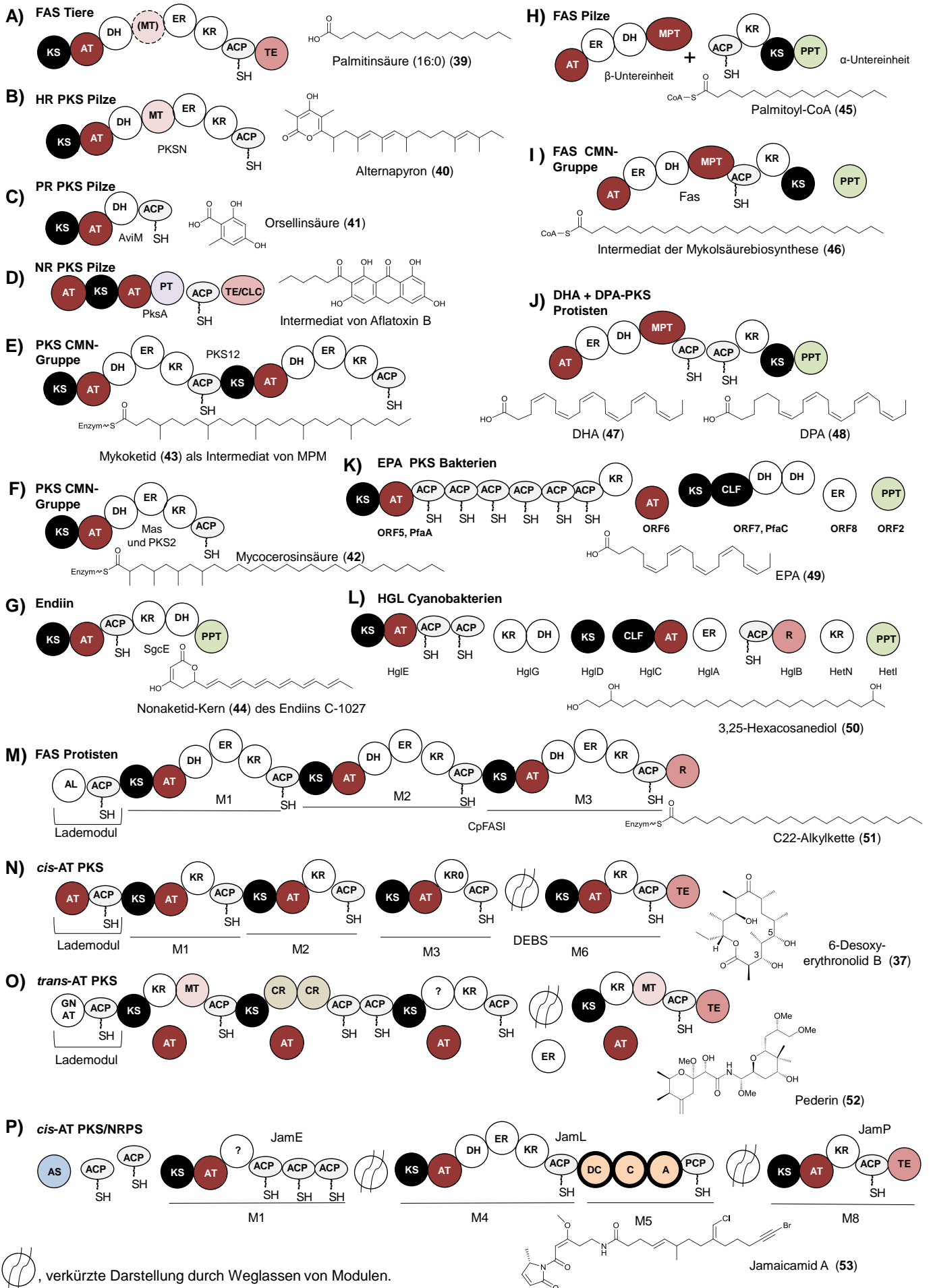
## FAS I aus Pilzen

Die FAS I aus Pilzen besteht aus einem  $\alpha\beta_6$ -Enzymkomplex von 2,6 MDa,<sup>[118]</sup> der evolutionär völlig verschieden von der FAS I der Tiere ist.<sup>[141]</sup> Die erste Untereinheit ( $\beta$ ) enthält eine Lade-AT und eine zweite AT, die auch als Malonyl-Palmitoyl-Transferase (MPT) bezeichnet wird. Die MPT-Domäne transferiert die Verlängerungseinheit Malonyl-CoA (**34**) und im letzten Schritt das fertige Palmitoyl-ACP wieder zurück zu CoA, um das freie Palmitoyl-CoA (**45**) vom Enzym zu entlassen (**Abb. 10 H**).<sup>[117, 118]</sup>

## Bakterielle FAS I

Zusammen mit den FAS I der Pilze, der sie strukturell sehr ähneln, bilden die bakteriellen FAS I eine Schwestergruppe zu den PKS I einschließlich der FAS I der Säugetiere (**Abb. 10 I**).<sup>[121]</sup> Bakterielle FAS vom Megasyntasentyp sind bisher nur aus Bakterien der CMN-Gruppe bekannt (Corynebacteria, Mycobacteria, Nocardia), die eine sehr feste Zellwand mit äußerst langkettigen Fettsäuren (Mykolsäuren) besitzen.<sup>[135]</sup> Am besten studiert sind diese Enzyme in *Corynebacterium ammoniagenes* und *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>[134]</sup> In diesen Bakterien existieren parallel Typ-II- und Typ-I-FAS. Da die Typ II Systeme jedoch, anders als üblicherweise in Bakterien, nicht zur *de novo* Synthese von Fettsäuren fähig sind, benötigen sie längere n-Acyl-CoA-Startermoleküle die von der FAS I (Fas) gebildet werden. Die Fas katalysiert Produkte von mittlerer Länge (C-16/18 bis C-20/26), die als CoA-Ester das Enzym verlassen.<sup>[142]</sup> Ein Beispiel ist die Biosynthese der Mykolsäuren in *M. tuberculosis*: Die Fas produziert ein C-26-CoA (**46**), das von der FAS II auf die Länge von C-56 zur Meromykolat-Kette verlängert wird. Die abschließende Kondensierung der ursprünglichen C-26- mit der verlängerten C-56-Kette zur Mykolsäure wird durch die PKS13 (eine PKS I) katalysiert.<sup>[85, 143]</sup>

C Einleitung



**Abb. 10:** Aufbau von modularen FAS und PKS. **A)** FAS I der Tiere. **(B-D)** PKS I der Pilze. **E,F)** PKS I aus Bakterien der CMN-Gruppe. **G)** PKS der Endiin-Biosynthese. **H)** FAS I der Pilze. **I)** FAS I aus Bakterien der CMN-Gruppe. **J)** LC-PUFA- PKS-I aus Protisten. **K)** LC-PUFA-PKS-I aus Bakterien. **L)** Glycolipid-FAS-I aus Cyanobakterien. **M)** FAS I aus Protisten. **N)** *cis*-AT-PKS. **O)** *trans*-AT-PKS. **P)** *cis*-AT-PKS/NRPS aus Cyanobakterien. A, Adenylierung; AL, Acyl-CoA-Ligase; AS, Acyl-ACP-Synthetase; C, Kondensation; CLC, Claisen-Cyclase; CLF, chain length factor; CMN-Gruppe, *Corynebacterium*-, *Mycobacterium*-, *Nocardia*- Gruppe; CpFASI, *Cryptosporidium parvum* FAS Typ I; CR, Crotonase; DC, Decarboxylase; DEBS, 6-Desoxy-erythronolid B Synthase; DHA, Docosahexaenoic acid; DPA, Docosapentaenoic acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; GNAT, Gcn5-artige *N*-Acetyltransferase; HGL, Heterocysten Glycolipide; JamELP, Module der Jamaicamid Synthase; M, Modul; MAS, Mycocerosinsäure-Synthase; MPT, Malonyl/palmitoyl-Transferase; PCP, Peptidyl-Carrier-Protein; PT, product template; R, Reduktase.

### Synthesen langkettiger polyungesättigter Fettsäuren (LC-PUFA)

Enzyme dieses Typs kommen hauptsächlich in einigen marinen Bakterien (z. B. *Shewanella* sp., *Moritella marina*, *Photobacterium profundum*) vor.<sup>[144-146]</sup> Die enzymatischen Funktionen der reduktiven Schleife dieser fettsäureproduzierenden PKS sind wahrscheinlich von bakteriellen FAS II abgeleitet. Z. B. hat die DH-Domäne große Homologie zu FabA aus *E. coli* und die ER-Domäne zu einer ER aus *Streptococcus* (**Abb. 10 K**).<sup>[147, 148]</sup> DHA (**47**) und DPA (**48**) produzierende Megasyntasen sind wahrscheinlich aus LC-PUFA-Syntasen mariner Bakterien durch horizontalen Gentransfer (HGT) auch in Protisten (z. B. *Schizochytrium* sp.) übertragen worden. Der protistische Typ von LC-PUFA-Syntasen weist große Ähnlichkeit zu einer fusionierten FAS I aus Pilzen, bzw. Bakterien auf (**Abb. 10 J**).<sup>[149]</sup>

### Glycolipid-FAS der cyanobakteriellen Heterocysten

Die Glycolipid-FAS aus *Anabaena* PCC 7120 und anderer Cyanobakterien sind zur Bildung von Heterocysten-Glycolipid- (HGL)-Aglyconen notwendig.<sup>[150]</sup> Die Glycolipidschicht schützt das Innere der Heterocysten, in denen die Stickstofffixierung erfolgt, vor molekularem Sauerstoff. Der *hgl*-Cluster der HGL-Region von *Anabaena* produziert wahrscheinlich das Aglycon von 1- $\alpha$ -Glycosyl-3,25-Hexacosanediol (**50**) und/oder 1- $\alpha$ -Glycosyl-3-keto-25-Hexacosanol.<sup>[151]</sup>

Die Megasyntasen dieses Typs haben große phylogenetische Nähe zu LC-PUFA Synthasen, z. B. aus *Shewanella*,<sup>[151]</sup> sowie zu bakteriellen iterativen PKS I (**Abb. 10 L**).<sup>[113]</sup>

### C 2.2.2 Sequenziell (modular) arbeitende Megasyntasen

Erst die Entwicklung von der iterativen zur sequenziellen („modularen“) Arbeitsweise ermöglichte die riesige Strukturvielfalt der komplexen Polyketide durch Modifikation fakultativer Domänen jedes einzelnen Moduls. Durch Nachahmung der Evolution (z. B. durch Inaktivierung oder Austausch von Domänen oder Modulen) bieten sich für den Biotechnologen faszinierende Möglichkeiten der Herstellung „nichtnatürlicher“ Naturstoffe.<sup>[74, 152, 153]</sup>

Der Prototyp einer PKS I mit modularer Arbeitsweise ist die 6-Desoxyerythronolid-B-Synthase (DEBS) aus Actinomycetales.<sup>[3, 4]</sup> Zu diesem Bakterientaxon gehören die z. Zt. wichtigsten bakteriellen Produzenten von Medikamenten, bzw. Medikamentenkandidaten. In den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden die ersten multimodularen PKS-Gencluster aus anderen Bakteriengruppen (z. B. *Bacillus*, Myxobacteria) entdeckt, wobei festgestellt wurde, dass diese PKS ziemlich unterschiedlich zum bekannten *cis*-AT-Typ waren. Wegen der nicht-integrierten AT Domänen werden diese neuen Enzyme *trans*-AT (auch "AT-less"<sup>[154]</sup>) PKS genannt.<sup>[155]</sup>

#### **Cis-AT Polyketidsynthasen**

Die DEBS ist das klassische Modell einer multimodularen *cis*-AT-PKS mit sequenzieller Arbeitsweise (**Abb. 10 N**). Ihr Monomer besteht aus drei Polypeptidketten (DEBS 1, DEBS 2 und DEBS 3, Genbezeichnungen: *eryAI*, *eryAII*, *eryAIII*) die insgesamt sechs Module tragen. N-terminal ist zusätzlich ein Lademodul und C-terminal eine TE-Domäne vorhanden. Ihr Produkt ist 6-dEB (**37**), das Aglycon des bekannten Antibiotikums Erythromycin.<sup>[4, 156]</sup> Die Ladedomäne empfängt die Startereinheit Propionat von Propionyl-CoA (**38**). Danach wird 6-mal mit Methylmalonyl-CoA (**35**) verlängert (siehe Abb. 9). Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Domänenabfolge, bzw. Modulabfolge und dem Einbau der Verlängerungseinheit und ihrer  $\beta$ -Kohlenstoffprozessierung, was als „Kolinearität“ bezeichnet wird. Dank der Kolinearitätsregel ist es recht einfach möglich, schon anhand der PKS-Gensequenz die Struktur der wahrscheinlich gebildeten Polyketidkette vorherzusagen. Die *cis*-AT-PKS kommen auch in anderen Bakterien als Actinomycetales vor.

### ***Trans*-AT-Polyketidsynthasen<sup>[7]</sup>**

Diese Gruppe von PKS wurde erst viele Jahre nach dem *cis*-AT-Typ entdeckt, da sie hauptsächlich außerhalb des damals vorzugsweise erforschten Bakterientaxons Actinomycetales zu finden ist. In *Bacillus subtilis* wurde vor ca. 15 Jahren unerwarteterweise ein neuer Typ von PKS I entdeckt, der nicht in das Prototyp-Schema der Erythromycin PKS passte. Es handelte sich, wie sich später herausstellte, um den Cluster der Bacillaen PKS/NRPS (~72 kb) aus *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens*.<sup>[157, 158]</sup>

Der deutlichste Unterschied zwischen *cis*-AT- und *trans*-AT-PKS besteht darin, dass die Module der *trans*-AT-PKS keine AT-Domänen enthalten.<sup>[96, 154, 155, 159, 160]</sup>

Die AT-Funktion wird bei diesen PKS von externen, *in trans* agierenden, AT Enzymen übernommen (**Abb. 10 O**). Ein weiterer großer Unterschied ist, dass die Kolinearitätsregel bei *trans*-AT-PKS meistens zu falschen Vorhersagen führt. Oft enthalten diese PKS scheinbar überflüssige Domänen oder Module und unterbrochene Module. Seit ihrer ersten Entdeckung tauchen immer mehr *trans*-AT-PKS auf, die vor allem in ungewöhnlichen Bakteriengruppen und Habitaten gefunden werden.<sup>[7]</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass sich *cis*-AT- und *trans*-AT-PKS phylogenetisch stark voneinander unterscheiden. Stammbaumanalysen deuten darauf hin, dass die *trans*-AT-Enzyme phylogenetisch älter sind als solche mit integrierten AT Domänen.<sup>[161]</sup> Vermutlich entstand in der frühen Phase der PKS-Evolution, in der die Typ-II-Enzyme zum Typ I fusionierten, ein unvollständig fusionierter Typ ohne ATs, aus dem die heutigen *trans*-AT-PKS entstanden. Ein Beispiel dafür, dass eine *trans*-AT-PKS auch *cis*-AT-Module enthalten kann ist die PKS von Kirromycin.<sup>[162]</sup> Das Ergebnis dieses häufigen HGTs sind Megasyntasen mit mosaikartiger Domänenstruktur.<sup>[6, 99]</sup> Dies ist sehr gut am Beispiel der Phylogenie der KS-Domänen gezeigt worden: Piel *et al.* entdeckten, dass sich die AS-Sequenzen im Stammbaum dieser Domänen nicht nach der Zugehörigkeit zu ihren jeweiligen Megaenzymen, sondern vielmehr nach ihren Substraten gruppieren. Dank der neu erstellten Vorhersageregeln für KS-Substrate konnten die Probleme mit der Anwendbarkeit der Kolinearitätsregel bei *trans*-AT-PKS gelöst und die Biosyntheseprodukte gefundener PKS-Gene vorhergesagt werden. Außerdem kann seitdem gezielt nach Biosynthesegenen gesucht werden.<sup>[99]</sup>

Beispiele für *trans*-AT-PKS sind die Synthasen für die bereits in der Medizin verwendeten Antibiotika Mupirocin<sup>[160]</sup> aus *Pseudomonas*, die Streptogramine<sup>[163]</sup> aus *Streptomyces*, die Antibiotika vom Elansolid-Typ<sup>[164]</sup> aus *Chitinophaga* (Bacteroidetes), sowie die Sorangicine<sup>[165]</sup> aus Myxobakterien. Über die *trans*-AT-PKS aus bakteriellen Symbionten [z. B. Pederin (**52**) **Abb. 10 O**] wird an anderer Stelle noch ausführlich berichtet werden (C 5.1.2). Sie enthalten alle auch ein NRPS-Modul (siehe PKS/NRPS-Hybride).

### CpFASI in Protisten

Dieser Sonderfall einer FAS I katalysiert wahrscheinlich die Verlängerung von Palmitoyl-CoA zu einer C-22-Alkylkette (**51**), deren Ablösung bzw. Transfer vom Enzymkomplex noch unbekannt ist. Vielleicht ist die C-terminale Reduktase-Domäne an der Entlassung der Fettsäure beteiligt (**Abb. 10 M**).<sup>[107]</sup>

### PKS/NRPS-Hybride

Auffallend oft kommen Hybride aus PKS-Modulen und einem oder mehreren NRPS-Modul(en) vor, wodurch Aminosäuren in die Polyketidstruktur eingefügt werden. In vielen Fällen wird dann die Bezeichnung PKS/NRPS gewählt.

NRPS-Megasyntasen besitzen die gleiche biosynthetische Logik wie die PKS- und FAS-Multienzyme, und die enzymatischen Funktionen sind untereinander kompatibel. Hierbei entspricht der AT-Domäne der PKS die A-Domäne der NRPS, der ACP-Domäne die PCP-Domäne, und der KS-Domäne die C-Domäne. Optionale NRPS-Domänen sind z. B. die Epimerase- (E-)-Domäne für eine Konfigurationsumkehr an einem asymmetrischen Kohlenstoff und die MT-Domäne.

Unter den vielen *trans*-AT-PKS/NRPS sind beispielsweise die Enzyme für Pederin (**39**), Bacillaen,<sup>[166, 167]</sup> Leinamycin,<sup>[168]</sup> Coralopyronin A<sup>[169]</sup> und FK228.<sup>[170]</sup> Bei Letzterem gelang sogar die heterologe Expression in *E. coli*.

Der *cis*-AT-PKS/NRPS-Typ ist charakteristisch für PKS/NRPS aus cyanobakteriellen Kulturen.<sup>[171]</sup> Auch in assoziierten Bakterien mariner Schwämme sind entsprechende Sequenzen recht häufig zu finden.<sup>[1, 172]</sup> Zu den bekanntesten Beispielen für *cis*-AT-PKS/NRPS zählen die Jamaicamide [z. B. Jamaicamid A (**53**)<sup>[21]</sup> aus Cyanobacteria (**Abb. 10 P**)]. Dieser Typ kommt jedoch auch in anderen Bakterien vor, wie z. B. in  $\alpha$ -Proteobakterien<sup>[173]</sup> und  $\gamma$ -Proteobakterien.<sup>[144]</sup>



## C 3 Schwämme und ihre Symbionten

Unter den marinen Wirbellosen sind wegen ihrer Vielfalt an Naturstoffen vor allem die Schwämme hervorzuheben.

### C 3.1 Schwämme

Das Auftreten der Schwämme vor bereits ~580 Mio. Jahren ist durch Fossilfunde belegt.<sup>[174]</sup> Biomarkeranalysen datieren das Phylum Porifera sogar auf ein Alter von ~680 Mio. Jahren.<sup>[175]</sup> Es sind weltweit 5,000-10,000 Schwamm-Arten beschrieben worden. Die rezenten Schwämme werden in drei Taxa („Klassen“) eingeteilt: Kalkschwämme (Calcarea) mit  $\text{CaCO}_3$ -Skeletten, Kieselschwämme (Hexactinellida) mit  $\text{SiO}_2$ -Skeletten und Hornschwämme (Demospongia), die vielfach Sponginfasern als Stützelemente besitzen und ~90% aller Schwamm-Arten ausmachen. Zu ihnen gehören auch die wenigen Süßwasserschwämme (~250 Arten<sup>[79]</sup>). Hornschwämme dominieren gegenüber den beiden anderen Schwammklassen nicht nur zahlenmäßig, sondern auch bezüglich des Vorkommens an bioaktiven Substanzen.<sup>[36, 176]</sup>

Die Lebensweise der Schwämme ist sessil, meist benthisch im Meereswasser; sie besitzen kein Nervensystem, keine Sinnes- oder andere Organe. Damit unterscheiden sie sich stark von allen anderen Tieren. Schwämme ernähren sich hauptsächlich von Bakterien durch Filtrieren des sie umgebenden Wassers. Dabei filtrierte z. B. ein 10 cm langer Schwamm (4 cm Durchmesser) in 24 h ~80 L Wasser.<sup>[177]</sup>

Den Körperbau der Schwämme dominiert das Mesohyl (auch Mesenchym genannt). Es ist von der Konsistenz her locker-schwammig und wird von zahlreichen Wasserkanälen durchzogen. An der Schwammaußenseite befinden sich unzählige kleine Einströmöffnungen, die das Wasser in größere Kammern („Geißelkammern“) leiten, von wo es schließlich in eine große Ausstromöffnung (Osculum) mündet. Das Schwammgewebe wird von einem Skelett gestützt. Außerhalb und innerhalb des Mesohyls schließen sich das Außenepithel (Pinacoderm) und das Innenepithel (Choanoderm) an.

Nach der Komplexität des Kanalsystems lassen sich drei Typen unterscheiden: von einfachsten Ascon-Typ über den Sycon-Typ bis hin zum Leucon-Typ, der für die meisten Schwämme (speziell Hornschwämme) charakteristisch ist. Schwämme vom Ascon-Typ bestehen nur aus einem Schlauch, der seitlich Poren

und oben eine Öffnung aufweist. Beim Leucon-Typ sind die Schlauchwände in vielen Schichten angeordnet, sodass man nicht mehr von einem Schlauch sprechen kann. Die Ausbuchtungen mit den Choanocyten haben sich zu Choanocytenkammern entwickelt, die durch ein kompliziertes Kanalsystem mit dem Innenraum verbunden sind, von wo aus wieder der Ausstrom durch das Osculum erfolgt.<sup>[177]</sup>

In die Extrazelluläre Matrix des Choanoderms sind verschiedene Zelltypen eingelagert, die meist amöboid beweglich sind. Aus dem Ursprungszelltyp der Archaeocyten bilden sich die phagozytischen Amöbocyten, die Skelettnadeln sezernierenden Sklerocyten und (möglicherweise) kontraktile Collencyten. Die letztgenannten beiden Zelltypen bilden ein Gerüst für das Mesohyl. Im Pinacoderm befinden sich die plattenförmigen Pinacocyten, die aber ebenfalls als Auskleidung der inneren Kanalwände fungieren. Die Wandungen der Choanocytenkammern und teilweise der Kanäle werden von Choanocyten (Kragengeißelzellen) besetzt. Ähnlich den Choanoflagellaten erzeugen sie einen Wasserstrom und phagozytieren die angesaugten Nahrungspartikel.<sup>[177]</sup>

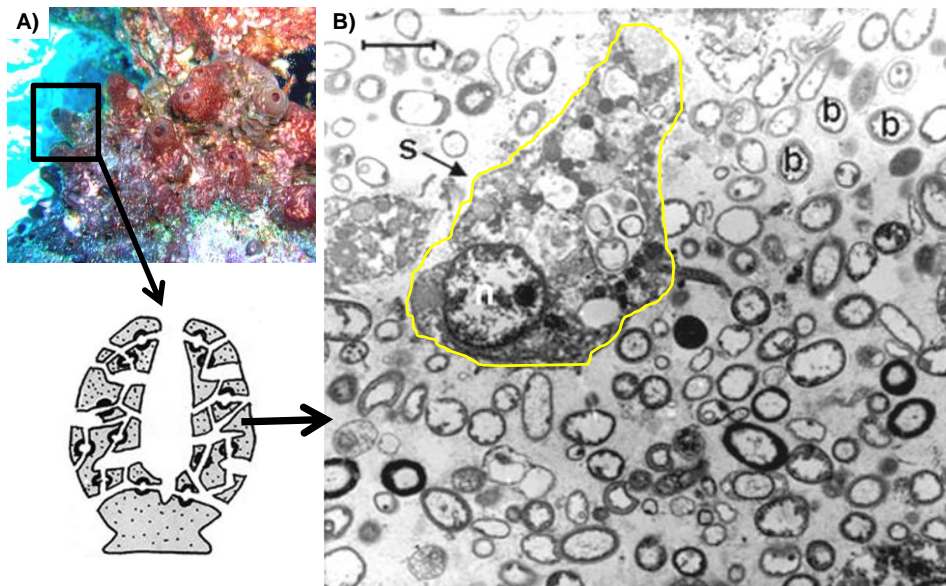
Die geschlechtliche Fortpflanzung erfolgt durch ins Wasser abgegebene Gameten. Die daraus entstehenden pelargischen Larven können unter Umständen während eines ganzen Jahres überleben. Ungeschlechtliche Vermehrung tritt in Form der „Gemmulae“ auf, die Anhäufungen von Archaeocyten darstellen.<sup>[177]</sup>

### **C 3.2 Schwämme als Fermenter für symbiotische Bakterien**

Das Mesohyl vieler Schwämme dient einer Vielzahl wirkstoffproduzierender symbiotischer Bakterien als Habitat. Im Prinzip dienen die Schwämme also ihren Symbionten als Fermenter zur Naturstoffproduktion<sup>[25]</sup> und leisten damit etwas, was sich im Labor mit „echten“ Fermentern oft nicht nachstellen lässt (**Abb. 11**).

#### **C 3.2.1 Definition der Symbiose**

Nach der weitgefassten Original-Definition von Anton de Bary aus dem Jahre 1879 nach der die Symbiose als ein „enges Zusammenleben ungleichartiger Organismen“ bezeichnet wird, kann man die Schwamm-assoziierten Bakterien als Symbionten bezeichnen. Diese Definition unterscheidet bewusst nicht zwischen vorteilhaften, unvorteilhaften oder neutralen Beziehungen zwischen Organismen.<sup>[27]</sup>



**Abb. 11:** Bakterielle Schwammsymbionten im Mesohyl. **A)** Mariner Hornschwamm vom Leucon-Typ (*T. swinhoei*), Foto: Yoichi Nakao, Universität Tokio. **B)** TEM Aufnahme des Mesohyls, aus Laroche *et al.* 2006.<sup>[9]</sup> s, Schwammzelle (Amoebocyte), gelb umrandet; n, Zellkern der Amoebocyte; b, Bakterien. Messbalken: 2  $\mu\text{m}$ .

### C 3.2.2 Ökologie

Symbiotische Beziehungen sind oft die Ursache einer besonderen Chemie,<sup>[27, 178]</sup> und die besondere Vielfalt der Naturstoffe aus marinen Schwämmen, allen voran der Polyketide und nichtribosomalen Peptide, ist vermutlich zu einem großen Teil deren symbiotischen Bakterien zu verdanken.<sup>[179]</sup> Auch Süßwasserschwämme enthalten symbiotische Bakterien, worüber jedoch nur sehr wenig bekannt ist.<sup>[180]</sup> Durch ihre sessile Lebensweise ist ihnen eine Flucht vor Fraßfeinden (z. B. Fischen) nicht möglich. Daher kann es eine gute Strategie sein, für solche Feinde zumindest ungenießbar, wenn nicht gar giftig zu sein. Eine weitere Gefahr für den Schwamm ist der Bewuchs mit Mikroorganismen oder anderen Meerstieren (sogenanntes „Biofouling“). Die Symbionten verhindern durch ihre Wirkstoffe sowohl das Gefressenwerden als auch das „Biofouling“ ihrer Wirte. Desweiteren führen sie dem Schwamm Nährstoffe zu oder entfernen Abbauprodukte, stabilisieren das Gewebe und wirken antibakteriell und fungizid auch im Inneren des Wirtes.<sup>[78, 178, 181, 182]</sup>

Da Symbiosen sich häufig mit exogenen Faktoren, wie z. B. Lichtverhältnissen verändern können,<sup>[183]</sup> kommt es in vielen Fällen zur Bildung verschiedener Chemotypen derselben Schwammspezies (u. U. sogar am selben Ort). So gibt es z. B. von *T. swinhoei* viele Chemotypen, darunter einen, der im Inneren gelb ist und einen anderen, der innen weiß ist. Der gelbe Typ enthält Aurantoside und

Polyketide der Pederin-Familie. Die Tiere mit weißem Inneren enthalten das Polyketid Misakinolid A und einige nichtribosomale Peptide, wie z. B. Theonellamid F. Kürzlich wurde ein Chemotyp des Schwammes beschrieben, der ausschließlich in größeren Tiefen lebt.<sup>[60]</sup>

Der Schwamm seinerseits bietet seinen Symbionten ein sicheres Habitat. Mithilfe wie Lichtfaserkabel wirkender Spiculae können einige Schwämme sogar ihre Symbionten im Schwamminneren mit Licht versorgen.<sup>[184]</sup>

### **C 3.2.3 Diversität mikrobieller Schwammsymbionten**

Schwämme sind oft die Habitate einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen, vor allem Bakterien.<sup>[25, 180, 185, 186]</sup> Die Symbionten befinden sich vor allem im Mesohyl ihrer Wirte und sind nur in sehr seltenen Fällen intrazellulär.<sup>[180]</sup> In vielen Fällen ist durch den Nachweis der Symbionten in Larvalstadien der Schwämme eine vertikale Übertragung nachgewiesen worden.<sup>[186, 187]</sup>

Bereits 1977 haben Vacelet und Donadey publiziert, dass es hinsichtlich symbiotischer Bakterien zwei Grundtypen von Schwämmen gibt.<sup>[188]</sup> Das führte zu der bis heute angewandten Einteilung der Schwämme in HMA- und LMA-Schwämme.<sup>[25, 189]</sup> Die Schwämme mit hohem Symbiontenanteil (HMA), können zu ~60% ihrer Masse aus Bakterien bestehen.<sup>[25, 189]</sup> Bei *Aplysina aerophoba* wurden beispielsweise  $\sim 6 \times 10^8$  Bakterien/g Schwamm gezählt. Dagegen besitzen LMA-Schwämme nur einige wenige Symbionten, die allerdings ebenfalls schwammspezifisch sind.<sup>[190]</sup>

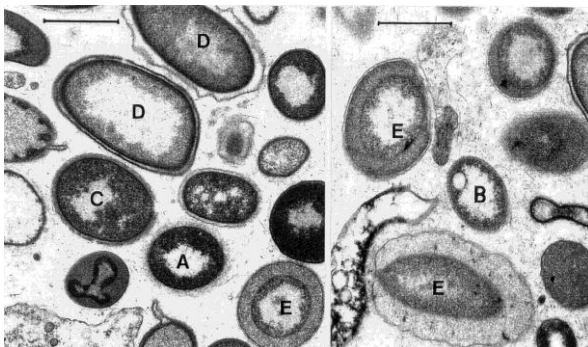
Bisher sind einige Studien zur Diversität von Schwamm-assoziierten Bakterien durchgeführt worden, wobei meist die 16S-rRNA-Diversität mittels PCR und/oder Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) untersucht wurde. Es sind Bakterien aus 23 verschiedenen Stämmen und dem Kandidaten-Phylum „Poribacteria“, sowie Vertreter der zwei großen Linien der Archaeen in Schwämmen gefunden worden.<sup>[180, 191-193]</sup>

Noch interessanter als die große Diversität der Schwammsymbionten ist, dass es Bakteriengruppen gibt, die hoch schwammspezifisch sind, also ausschließlich im Inneren von Schwämmen leben.<sup>[26, 180]</sup> Diese bilden in den phylogenetischen Bäumen der 16S-rRNA schwammspezifische Kladen. Diese Kladen enthalten Sequenzen aus Schwämmen verschiedenster Arten und geographischer Herkunft.

Die Zahl der verschiedenen Symbionten in einem Schwamm kann sehr unterschiedlich sein; mit der herkömmlichen Klon-pick-Methode werden meist zwischen 30 und 160 verschiedene Symbionten ermittelt.<sup>[15]</sup> Durch Akkumulierung wurden so 313 16S-rRNA-Klone von Symbionten des Schwammes *Rhopaloeides odorabile* bestimmt. Mit moderneren Methoden ("16S-rRNA gene tag pyrosequencing") konnten Webster *et al.* jedoch in demselben Schwamm ~3.000 unterschiedliche (<95% Ähnlichkeit) „Operational Taxonomic Units“ (OTU, Arten) feststellen. Diese Werte beweisen eine etwas höhere Bakteriendiversität als sie im menschlichen Darm vorhanden ist (~1.000 OTUs). Interessanterweise wurde diese hohe Diversität jedoch noch vom Seewasser deutlich übertroffen (~7.000 OTUs).<sup>[194]</sup> Am häufigsten zählen die Schwammsymbionten zu den Taxa  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\alpha$ -Proteobacteria, Actinobacteria, Nitrospira, Acidobacteria und Chloroflexi.

### Poribakterien

Die Poribakterien („Poribacteria“)<sup>[11, 195]</sup> stellen ein Kandidaten-Phylum dar, das zum PVC (Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae) Superphylum<sup>[196]</sup> gehört. Sie haben eine Zellkompartimentierung in Form einer außergewöhnlichen zellkernähnlichen Struktur (**Abb. 12**, Typ E). Diese nichtkultivierten Bakterien wurden vor ihrer Entdeckung übersehen, da die 16S-rRNA Standardprimer an die Poribakterien-rDNA nicht binden. Neueste Berichte gibt es über das Vorkommen von Poribakterien-DNA auch im Meerwasser,<sup>[194, 197]</sup> jedoch ist noch nicht bewiesen worden, dass sie sich auch im Meerwasser vermehren können.



**Abb. 12:** Poribakterien im Mesohyl des Schwammes *Aplysina aerophoba*. TEM Aufnahme aus Friedrich *et al.* 1999<sup>[8]</sup>; **A-E** bezeichnen verschiedene Morphotypen der Schwammsymbionten, wobei die Poribakterien dem Morphotyp E entsprechen; Durchmesser der Poribakterien 0,8-1,4  $\mu\text{m}$ . Messbalken: 1  $\mu\text{m}$ .

Es wird spekuliert, ob das Meerwasser evtl. als Pool von unterschiedlichsten Bakterienarten dient, aus denen der Schwamm seine Symbionten rekrutiert und anreichert.<sup>[194]</sup> Das schließt allerdings die nachgewiesene zusätzliche vertikale Übertragung der Poribakterien nicht aus.<sup>[198]</sup>

## C 4 Phylogenie und Diversität der PKS aus marinen Schwämmen

Eine gute Methode, um neue Wirkstoffgencluster zu finden, ist die PCR-Analyse metagenomischer DNA. Zusätzlich zum pharmakologischen Nutzen der möglicherweise später erfolgenden heterologen Expression von Wirkstoffen gibt die phylogenetische Analyse von Biosynthesegenen die Möglichkeit, Erkenntnisse über die Evolution der FAS- und PKS-Megasyntasen zu erlangen. Aufgrund der hohen Diversität an PKS-Genen im Metagenom von marinen Schwämmen ist ohnehin ein phylogenetischer Ansatz zur Eingruppierung der Gene sehr sinnvoll. Da die KS-Domäne phylogenetisch gesehen am konserviertesten ist, können mit degenerierten Primern für diese Domäne eine Vielzahl von Amplifikaten erzeugt, sequenziert, und aus den Sequenzen Stammbäume erstellt werden.<sup>[1, 13, 199, 200]</sup> Im Folgenden werden die bisherigen Ergebnisse phylogenetischer Auswertungen von KS-Sequenzen aus Schwamm-Metagenomen vorgestellt.

### C 4.1 Phylogenie der KS-Domänen

Der phylogenetische Ansatz zum Finden von Genen für bioaktive Substanzen wurde ursprünglich von Piel *et al.* 2004 beschrieben<sup>[201]</sup>. In der Studie wurden degenerierte PCR-Primer für die KS-Domäne eingesetzt, um die metagenomische DNA auf PKS-Gene hin zu untersuchen. Die Primer amplifizierten eine ~700 bp lange Region zwischen den konservierten Motiven DPQQ und HGTGT.<sup>[155]</sup> Diese Motive finden sich in allen PKS, bzw. PKS/NRPS-Genen vom Typ I, die für bioaktive Polyketide, bzw. Hybride von Polyketiden mit nichtribosomalen Peptiden kodieren. Die KS-Sequenzen der Typ-II-PKS und -FAS, sowie der bakteriellen FAS I des Primärstoffwechsels weisen diese Motive in der Form nicht auf, werden also mit den Primern nicht erfasst (**Abb. 13**).

In der metagenomischen Untersuchung des Schwammes *T. swinhoei* aus dem Jahr 2004 fielen zum ersten Mal unzählige, einander sehr ähnliche KS-Sequenzen auf (3-20 unterschiedliche Nukleotide im PCR Produkt). Sie kamen in den chemisch unterschiedlichen gelben und weißen Chemotypen gleichermaßen vor.<sup>[201]</sup> Der phylogenetische Baum der KS-Sequenzen zeigte, dass die fraglichen Sequenzen eine nahe der Basis abzweigende, isolierte Gruppe bildeten und folglich einem bisher noch unbekanntem PKS-Typ angehören mussten.

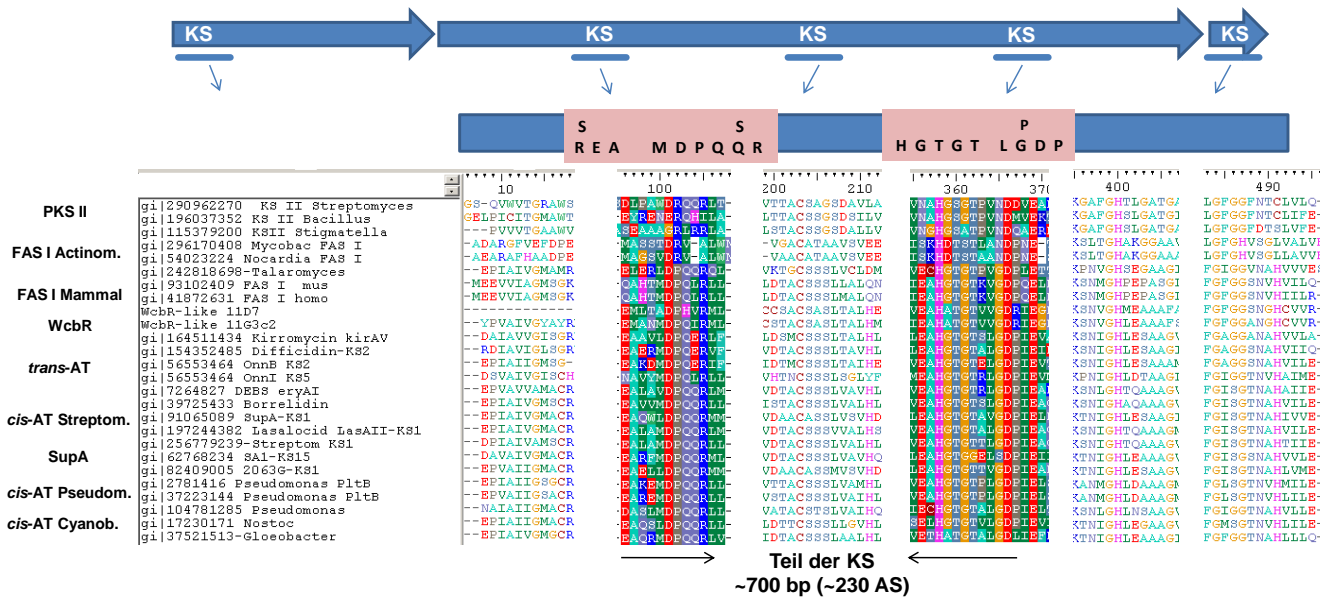


Abb. 13: Konservierte Motive der KS-Domänen, sowie die Bindung der universalen Primer KSDPQQ/KSHGTGT an den konservierten Motiven DPQQ und HGTGT von Typ I PKS.

Bei allen folgenden Untersuchungen von KS Sequenzen aus Schwamm-Metagenomen wurden diese dominanten, bisher nur in Schwämmen identifizierten Gene gefunden, die später als *sup*-Gene ("sponge symbiont ubiquitous *pk*s") bezeichnet wurden.<sup>[1]</sup> Den Stammbaum der bisher größten und umfassendsten Untersuchung<sup>[1]</sup> von KS-Sequenzen zeigt Abb. 14.

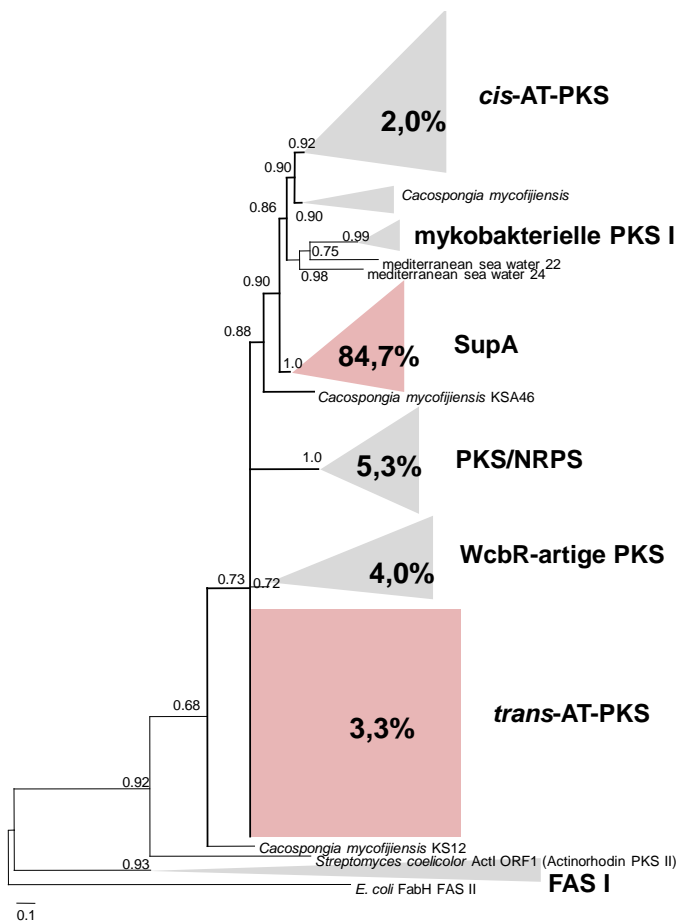


Abb. 14: Stammbaum mit KS-Sequenzen von 20 Schwämmen.<sup>[1, 2]</sup>

Die Sequenzen wurden mit den DPQQ/HGTGT-Primern (siehe Abb. 13) amplifiziert; zusätzlich wurden Sequenzen aus der Genbank verwendet. Als Außengruppe diente die Typ-II-FAS *FabH* von *E. coli*.

Die aus den Schwämmen gewonnenen Sequenzen fanden sich hauptsächlich in der SupA-Klade wieder, einige Sequenzen fielen aber auch in die *trans*-AT-Gruppe (z. B. die der Onnamid-PKS), in die PKS/NRPS- und in die WcbR-Typ-Gruppe.

Der Stammbaum bestätigte Untersuchungen, wonach *cis*-AT- und *trans*-AT-PKS evolutiv deutlich voneinander getrennt sind.<sup>[161, 202]</sup> Die SupA-Klade, die ausschließlich Schwammsequenzen enthielt, ist näher mit der *cis*-AT-Gruppe (Untergruppe Actinobacteria) verwandt und die WcbR-artigen Sequenzen haben eher Ähnlichkeit mit dem *trans*-AT-Typ als mit dem *cis*-AT-Typ.

Bezüglich des schwammspezifischen SupA-Typs konnte festgestellt werden, dass die Längen der Abzweigungen in dieser Klade auffallend kurz waren, was einer großen Sequenzähnlichkeit entspricht, obwohl die Sequenzen aus vielen völlig unterschiedlichen Schwämmen aus verschiedensten geographischen Regionen stammten (**Abb. 14**).<sup>[1]</sup> Schirmer *et al.* kamen mit ihrem Stammbaum von Sequenzen der KS-Domänen prinzipiell zu den gleichen Ergebnissen.<sup>[15]</sup>

## C 4.2 Diversität der KS-Domänen

In der ersten Studie von 2004 wurden insgesamt 21 verschiedene KS-PCR Produkte vom *T. swinhoei* Metagenom sequenziert. Drei dieser Sequenzen (darunter die Onnamid-Sequenz) fielen in die *trans*-AT-PKS-Klade, wo sich die Pederin-Sequenz befand. Die restlichen gehörten alle zum SupA-PKS-Typ.<sup>[201]</sup>

Ein Jahr später fanden Schirmer *et al.* auf der Suche nach dem Gencluster für Discodermolid (**12**) im Metagenom des Schwammes *D. dissoluta* 85 weitere KS-Sequenzen. Es gehörten 17 Sequenzen zur *cis*-AT-Gruppe, vier zur *trans*-AT-Gruppe und drei zur PKS/NRPS-Gruppe. Die restlichen 18 Sequenzen gehörten zum SupA-PKS-Typ, darunter der bis heute einzige bekannte multimodulare Vertreter (SA1) dieses Typs (siehe C 5.2.1).<sup>[15]</sup>

In der großen Untersuchung von 20 marinen Schwämmen aus fünf verschiedenen geographischen Regionen wurden von den insgesamt 150 KS-Amplifikaten nur 23 Sequenzen gefunden, die nicht zur dominanten SupA-Gruppe gehören: jeweils drei (aus je einem Schwamm) gehörten zum *trans*-AT- oder *cis*-AT-Typ, sechs (aus einem Schwamm) waren vom PKS/NRPS-Typ und fünf (aus vier Schwämmen) gehörten zur WcbR-artigen Gruppe.<sup>[1]</sup>



Im Rahmen der Suche nach dem Psymberin-Cluster in *Psammocinia* aff. *bulbosa*, bzw. anderen Wirkstoffgenen in *C. mycofijiensis* wurden hunderte weiterer KS-Amplifikate sequenziert und analysiert. Alle 81 (*P.* aff. *bulbosa*), bzw. 276 (*C. mycofijiensis*) KS-Sequenzen gehörten dem SupA-Typ an. Eine statistische Auswertung ergab, dass die Diversität an *supA*-Sequenzen innerhalb eines einzigen PCR-Produktes der DPQQ/HGTGT Primer 17-224 (*P.* aff. *bulbosa*), bzw. 54-154 (*C. mycofijiensis*) betrug.<sup>[6]</sup>

Alle bisherigen Studien zur PKS-Diversität in marinen Schwämmen verwendeten eine begrenzte Anzahl (z. B. 20 oder 40) zufällig ausgewählter PCR-Produkte. Um einen möglichst umfassenden Einblick in die Diversität von PKS-I-Genen in Schwamm-Metagenomen zu bekommen, wurde als neue Methode die 454-Sequenzierung des PCR-Produkts gewählt.<sup>[12]</sup> Als Modellschwamm wurde *C. mycofijiensis* gewählt, der zu den chemisch interessantesten Schwämmen gehört. Die PCR-Produkte (DPQQ/HGTGT-Primer, siehe Abb. 13) aus zwei Schwammindividuen beinhalteten insgesamt 30.473 Sequenzen. Eine "Rarefaction"-Analyse zeigte bereits bei ~2.000 Sequenzen eine Sättigung. Nach Abzug von Duplikaten und sehr ähnlichen orthologen Sequenzen (>95% Ähnlichkeit) wurden 57 (Individuum #2) und 76 (Individuum #5) verschiedene KS-Sequenzen ermittelt. Interessanterweise waren den zwei Individuen der gleichen Spezies und des gleichen Fundortes nur 15 dieser Sequenzen gemeinsam. Von den insgesamt 118 Sequenzen gehörten nur fünf nicht zum SupA-Typ. Diese fünf Sequenzen setzten sich aus zwei Dinoflagellaten-Sequenzen, sowie jeweils einer *cis*-AT-, *cis*-AT-PKS/NRPS und *cis*-AT-PKS als Modul einer *trans*-AT-PKS zusammen. Dies zeigt die sehr hohe Diversität der *sup*-Gene, sogar mit Unterschieden zwischen einzelnen Individuen derselben Art am selben Ort.<sup>[12]</sup>

### **Schlussfolgerungen aus der KS-Diversität**

Die SupA-PKS ist ein neuartiger Typ einer modularen PKS aus Schwammsymbionten. Sie ist nur aus marinen Schwämmen bekannt, in diesen aber ubiquitär und dominant vorhanden. Weniger häufig sind andere Typen von PKS I, wie z. B. die PKS/NRPS, WcbR-artigen PKS und die *trans*-AT-PKS im Schwammmetagenom vertreten. Interessanterweise sind die *cis*-AT-PKS im Vergleich zu *trans*-AT-PKS in marinen Schwämmen stark unterrepräsentiert (siehe Abb. 14). Die zahlenmäßige Dominanz der SupA-PKS bereitet meist Schwierigkeiten beim Durchmustern von Metagenomen.

## C 5 Isolierte PKS-Gencluster bakterieller Symbionten mariner Schwämme

Von der mittels PCR gefundenen KS-Sequenz zum isolierten vollständigen PKS-Gencluster führt der Weg meist über die Durchmusterung<sup>[203]</sup> einer Klonbibliothek der metagenomischen DNA. Bedingt durch die hohe Diversität und Abundanz an Symbionten ist metagenomische DNA aus marinen Schwämmen äußerst komplex. Diese Komplexität ist oft der Grund für auftretende Schwierigkeiten bei der PCR-Analyse sowie der Erstellung von Klonbibliotheken aus metagenomischer DNA. Bisher konnten daher nur von wenigen Schwammsymbionten die Biosynthesen für komplexe Polyketide aufgedeckt werden.

Trotzdem sind in den letzten 10 Jahren seit der Jahrtausendwende mit unterschiedlichen Methoden ~25 Naturstoffgencluster aus marinen Organismen isoliert worden.<sup>[204]</sup> Darunter stammen allerdings die meisten aus freilebenden Bakterien, oder solchen, die nicht zu den bakteriellen Symbionten gezählt werden können. Nur die Gencluster der Onnamide, von Psymberin (**55**) sowie der Bryostatine und Patellamide stammen aus nichtkultivierten Symbionten.

Dieser Abschnitt widmet sich allen bekannten bakteriellen Naturstoffsymbiosen mariner Schwämme. Da Zellseparationsstudien in vielen Fällen zweifelhafte Ergebnisse liefern, (z. B. wegen der Diffusion der Wirkstoffe in Nachbarzellen), ist neben der sehr seltenen Kultivierung des Symbionten die Auffindung des Biosynthese-Genclusters der eigentliche Beweis einer Naturstoffsymbiose.

### C 5.1 Substanzen der Pederin-Familie

Nachdem mithilfe des phylogenetischen Ansatzes KS-Sequenzen detektiert wurden, die Ähnlichkeit mit Sequenzen wirkstoffproduzierender PKS haben, können die entsprechenden kompletten Gencluster aus der Klonbibliothek isoliert werden (siehe Abb. 6). Der Gruppe um Jörn Piel gelang es auf diese Art bereits mehrfach, Wirkstoffgene zu finden und zu isolieren. Dabei handelt es sich um die PKS-Cluster von Pederin (**52**), Onnamid (**11**) und Psymberin (**55**) (**Abb. 15**). Vorläufer der Untersuchungen war die Entdeckung der Biosynthesegene für Pederin (**39**), die zu dem damals weitgehend unbekanntem neuen Typ der *trans*-AT-PKS gehören. Inzwischen sind auch von anderen Arbeitsgruppen viele neue

*trans*-AT-Gene entdeckt worden.<sup>[7]</sup> Vom *cis*-AT-Typ sind interessanterweise bisher überhaupt noch keine PKS-Gene aus Symbionten bekannt.<sup>[27]</sup>

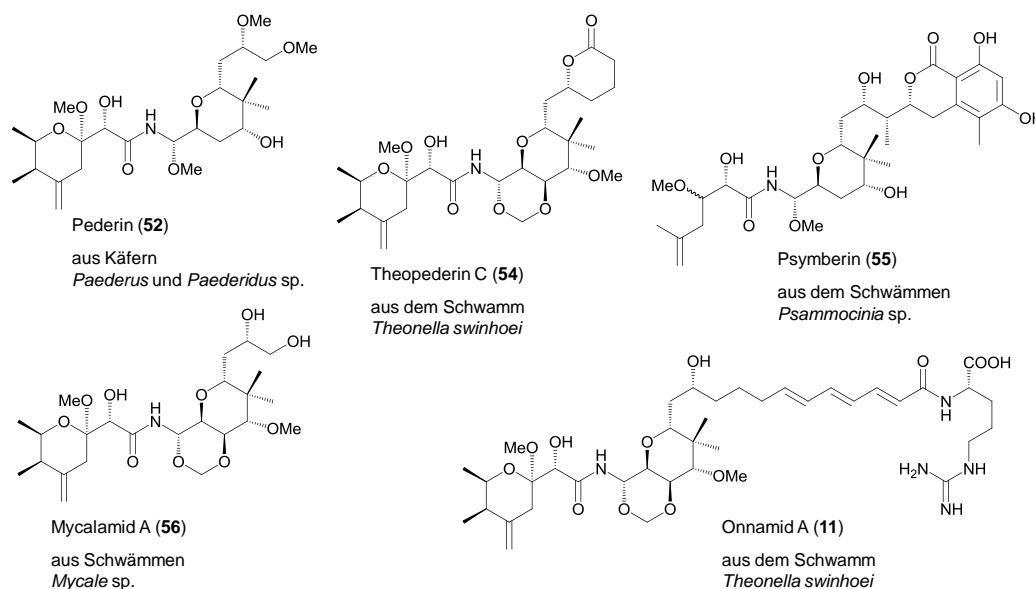


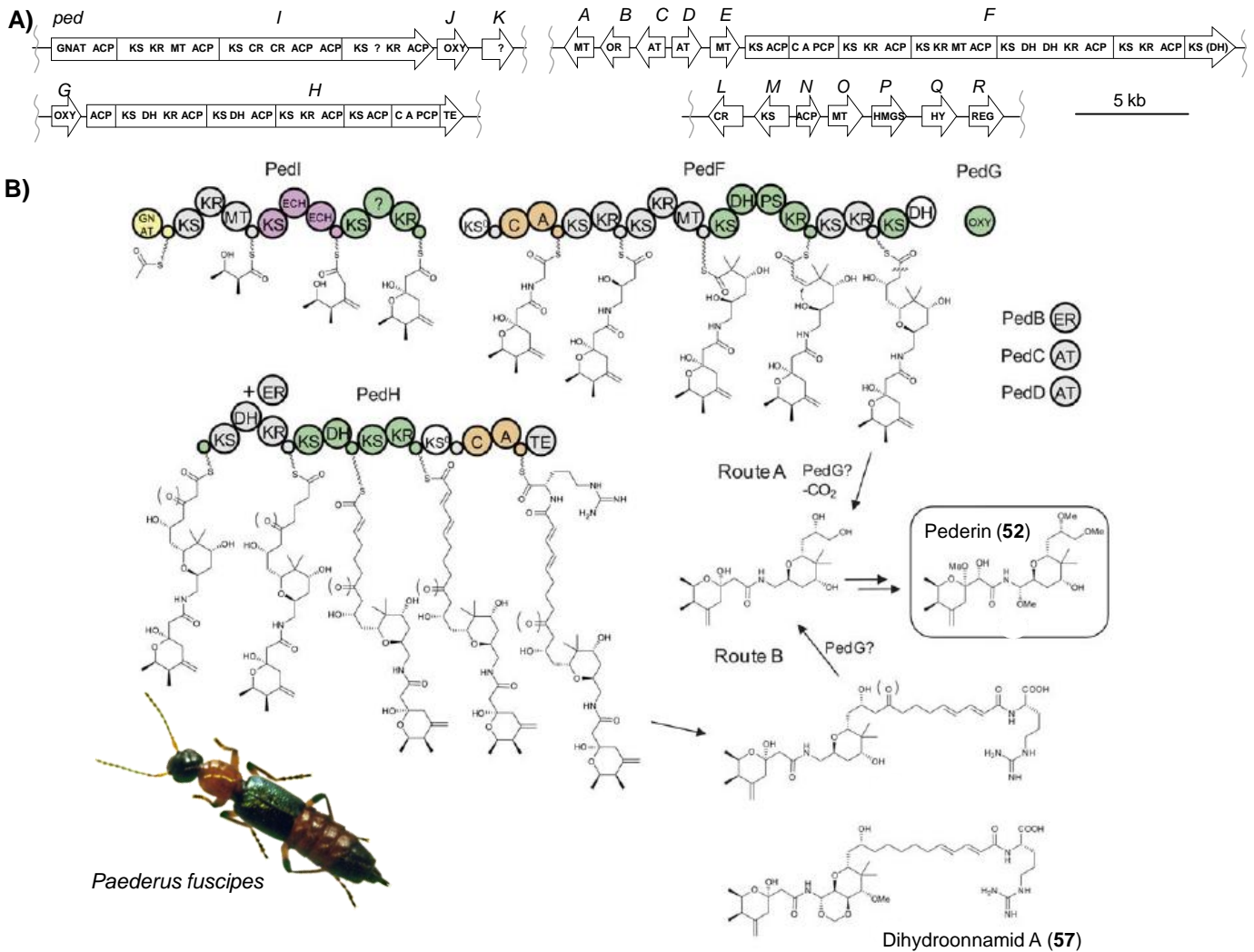
Abb. 15: Substanzen der Pederin-Familie.

### C 5.1.1 Pederin aus Käfern

Eine Endosymbiose zwischen Bakterien der Gattung *Pseudomonas* und Käfern der Gattungen *Paederus* und *Paederidus* ist die Ursache für die Produktion des stark zytotoxischen und dermatotoxischen Polyketids Pederin (52) in den Käfern.<sup>[27]</sup> Es gibt Pederin (52)-haltige (+)-Weibchen und Weibchen mit geringen oder keinen Mengen an Pederin (52), sogen. (-)-Weibchen. Die männlichen Käfer enthalten das Polyketid nicht.

J. Piel konnte mittels PCR-Durchmusterung von metagenomischer DNA der *Paederus* Käfer den Pederin-Gencluster isolieren und zeigen, dass nur Käfer mit hohem Pederin-Gehalt diese PKS-Gene enthielten.<sup>[155]</sup> In unmittelbarer Umgebung des Clusters fanden sich auch Bakteriengene mit hoher Sequenzähnlichkeit zu *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>[205]</sup> Nach mikroskopischer Untersuchung<sup>[206]</sup> und FISH-Analyse (U. Hentschel, Uni Würzburg, nicht publizierte Daten) wurde ausschließlich in den (+)-Weibchen in deren Abdomen ein dominantes Bakterium nachgewiesen, dessen 16S-rRNA am nächsten mit der von *Pseudomonas aeruginosa* übereinstimmt. In speziellen Anhangsdrüsen des Ovarien-Ausführgangs konnten Reinkulturen von hoher Bakteriendichte des Symbionten („*Pseudomonas paederii*“) visualisiert werden. Der bakterielle Symbiont konnte bisher nicht kultiviert werden.<sup>[206]</sup>

Beim Pederin-Gencluster handelt es sich um den seltenen Fall eines Clusters, der auf drei unterschiedliche genomische Regionen mit insgesamt ~77 kb Länge verteilt ist (Abb. 16).<sup>[155, 205]</sup> Die Biosynthese von Pederin (52) erfolgt erst über PedI und PedF. PedG ist eine Oxygenase, die vermutlich den fertigen Pederin-Vorläufer vom Enzym trennt (Route A). Interessanterweise sind die letzten sechs Module (PedH) für die Produktion von Pederin (52) eigentlich überflüssig. Würden theoretisch diese Module mit einbezogen, entstünde Dihydroonnamid A (57), ein Onnamid-Kongener, das aus dem marinen Schwamm *Theonella* sp. bekannt ist.<sup>[207]</sup> Die andere Biosynthesemöglichkeit (Route B) wäre, dass über PedH erst die Verlängerung zum Dihydroonnamid A (57) erfolgte, die danach durch eine PedG-katalysierte Abspaltung wieder rückgängig gemacht würde. Der so entstandene Pederin-Vorläufer wäre identisch mit dem aus Route A und würde nach einigen „Tailoring“-Schritten zum Pederin (52) (Abb. 16).



**Abb. 16:** Biosynthese von Pederin. **A)** Die drei genomischen Regionen des Genclusters für Pederin. **B)** Biosyntheschema für Pederin, aus Piel 2010.<sup>[7]</sup>

Die Genclusteranalyse von Pederin zeigt also, dass die Biosynthesen von Pederin (**52**) aus Käfern und den sehr ähnlichen Substanzen aus marinen Schwämmen in einem engen Zusammenhang stehen müssen.

### C 5.1.2 Substanzen der Pederin-Familie aus marinen Schwämmen

Interessanterweise ist die Struktur von Pederin (**52**) der Struktur der Onnamide, Theopederine, Irciniastatine, Mycalamide und ähnlichen zytotoxischen Polyketiden, die nur aus marinen Schwämmen bekannt sind, sehr ähnlich. Man spricht daher von der „Pederin-Familie“ (siehe Abb. 15).<sup>[205]</sup> Bis jetzt ist Pederin (**52**) der einzige Vertreter dieser Familie, der nicht aus einem marinen Schwamm isoliert wurde. Da Pederin (**52**) von bakteriellen Symbionten produziert wird, komplexe Polyketide generell nicht von Tieren biosynthetisiert werden und zudem marine Schwämme große Mengen an symbiotischen Bakterien beherbergen, war es naheliegend, dass auch die marinen Vertreter der Pederin-Familie von Symbionten produziert werden müssen.

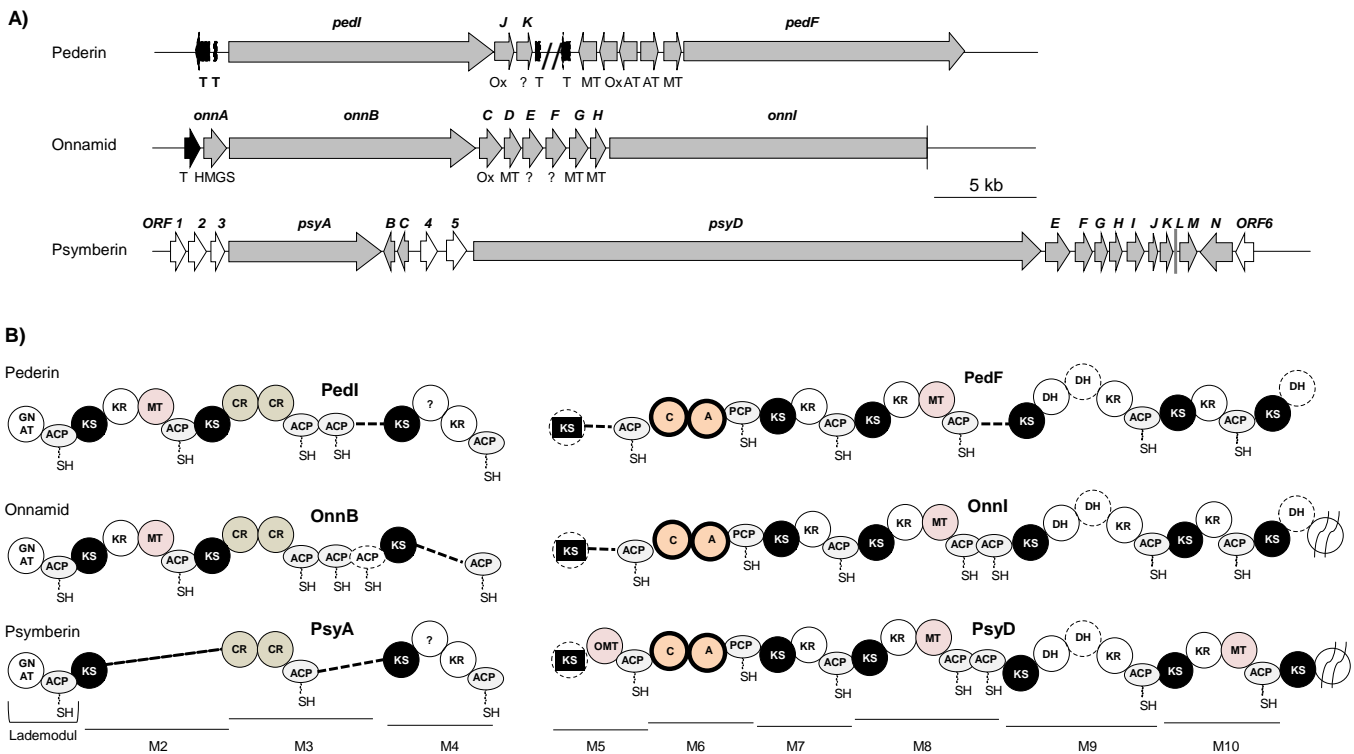
#### Onnamide

Die Onnamide und Theopederine [z. B. Theopederin C (**54**)] kommen in Schwämmen der Gattungen *Theonella*, *Trachycladis* und *Discodermia* vor.<sup>[7]</sup> In *T. swinhoei* ist eine Strukturbibliothek aus ~15 Vertretern gefunden worden.

Da der Pederin-Cluster bereits entdeckt worden war, konnte eine recht spezifische Sondierung des ~30 Gbp umfassenden Metagenoms von *T. swinhoei* (gelber Chemotyp) nach ähnlichen Genen zum Erfolg führen.<sup>[201]</sup> Die Durchmusterung der ~860,000 Klone der Bibliothek führte zu einem positiven Klon. Nicht überraschend handelte es sich wie bei Pederin (**52**) um einen *trans*-AT-PKS-Gencluster mit NRPS Beteiligung. Der Cluster ist allerdings nicht ganz komplett, da z. B. Homologe für PedH fehlen.<sup>[208]</sup> Er ist fast identisch mit dem von Pederin (**52**); die großen PKS-Gene *onnB* und *onnI* entsprechen den Pederin-Genen *pedI* und *pedF* (**Abb. 17**). Der einzige größere Unterschied ist das Fehlen der KR Domäne in Modul 4 (OnnB), sowie zusätzliche ACP-Domänen in Modul 4 (OnnB) und Modul 8 (OnnI). Über die Identität des bakteriellen Symbionten ist bis heute nichts Genaues bekannt. Ein gefundenes Haushaltsgen (*ftsZ*) legt eine Verwandtschaft mit Chloroflexi nahe. Da in einem Exemplar von *T. swinhoei* drei etwas unterschiedliche Cluster detektiert wurden, könnte es sein, dass es mehrere verschiedene Produzenten gibt, die durch verschiedene Versionen des Clusters zur Strukturbibliothek beitragen.<sup>[7]</sup>

## Psymberine

Psymberin (**55**) („Psammocin symbiont pederin“)<sup>[209]</sup> ist identisch mit dem fast zeitgleich aus dem Schwamm *Ircinia ramosa* isolierten Irciniastatin A. *I. ramosa* enthielt auch das verwandte Irciniastatin B.<sup>[210]</sup> Die Irciniastatine gehören zur Pederin-Familie und besitzen ebenso wie Pederin (**52**) und Onnamid A (**11**) sehr starke Antitumoraktivität.



**Abb. 17:** Vergleich der Gencluster von Pederin, Onnamid und Psymberin.

**A)** Gegenüberstellung von homologen Bereichen der Gencluster von Pederin, Onnamid und Psymberin. **B)** Vergleich der Domänenarchitekturen der drei Cluster der Pederin-Familie, nach Fisch et al. 2009<sup>[6]</sup> Abkürzungen siehe Abb. 7 und 10.

Um den Cluster zu finden, durchmusterten Fisch *et al.* das Metagenom des Schwammes mit zwei Primer-Paaren („Nested-PCR“): das erste Paar waren die bekannten DPQQ/HGTGT-Primer deren Produkt die Matrize für ein zweites, *trans*-AT-KS spezifisches Paar war. Mit dieser Methode konnte eine Psymberin KS-Sequenz gefunden werden, mit Hilfe derer es gelang, die Gene für den kompletten Biosyntheseweg von Psymberin (**55**) aus einer Klonbibliothek von 410,000 Klonen zu isolieren. Die Sequenzierung ergab einen *trans*-AT-PKS Cluster von ~62 kb Länge. Da der Cluster nur einmal vorkam, kann folglich die Größe des Metagenoms auf mindestens 8 Gb geschätzt werden. Wie erwartet, gab es große Ähnlichkeiten zu den Clustern von Pederin (**52**) und Onnamid A (**11**) (**Abb. 17**). Die zwei großen PKS Gene *psyA* und *psyD* wiesen große Homologien

zu *pedI/OnnB* und *pedF/onnI* auf. Es gab auch einige Variationen, die sich aus Unterschieden in der Struktur von Psymberin (**55**) gegenüber Pederin (**52**) und Onnamid A (**11**) erklären lassen.<sup>[6]</sup>

Eine Besonderheit war die Entdeckung, dass die Gene für viele „Tailoring“-Enzyme (*psyEFGHIJN*) nur geringe Sequenzähnlichkeiten mit Pederin/Onnamid-Genen hatten und überdies fast identisch zu Genen aus einem nur unvollständig sequenzierten und biochemisch uncharakterisierten *trans*-AT-Cluster aus *D. dissoluta* waren.<sup>[15]</sup> Interessanterweise wurden die beiden Schwämme ~16.000 km voneinander entfernt gesammelt.<sup>[6]</sup> Es ist durchaus möglich, dass diese Schwämme den gleichen Symbionten beherbergen, was eingehender untersucht werden müsste. Substanzen der Pederin-Familie sind zudem auch in einem Schwamm der Gattung *Discodermia* gefunden worden.<sup>[211]</sup>

Durch PCR-Studien an Psymberin-positiven und -negativen *Psammocinia* aff. *bulbosa* Schwamm-Individuen konnte nahegelegt werden, dass der Psymberin-negative Chemotyp einen sehr nah verwandten Symbionten beherbergt, dem aber der *psy*-Cluster fehlt.<sup>[6]</sup>

### **Mycalamide**

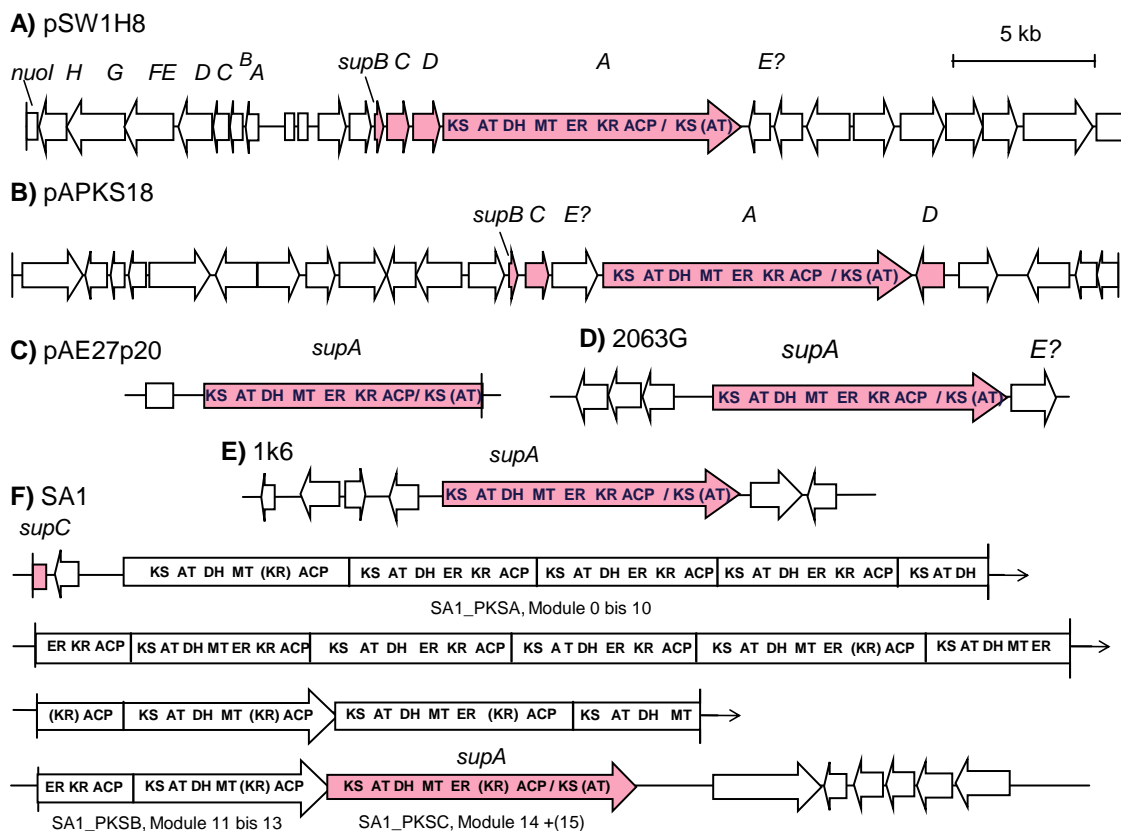
Die Mycalamide [z. B. Mycalamid A (**56**)] sind ebenfalls potente Zytotoxine aus der Pederin-Familie. Sie wurden bisher aus den Schwämmen *Mycale hentscheli* und *Stylus* sp. extrahiert.<sup>[212, 213]</sup> Der Schwamm *M. hentscheli* kommt (ähnlich wie *P.* aff. *bulbosa* und *T. swinhoei*) in zwei Chemotypen vor, wobei ein Chemotyp Mycalamide enthält und der andere nicht.<sup>[214]</sup> Mit einer analogen Methode wie bei Psymberin (**55**) konnte aus der metagenomischen DNA eines Mycalamid-positiven Chemotyps von *M. hentscheli* eine KS-Sequenz (mit 76% Homologie zur KS11 von Pederin) amplifiziert werden.<sup>[6]</sup>

## **C 5.2 SupA-PKS**

Nachdem die *supA*-Sequenzen als neuer PKS-Typ wegen ihrer weiten Verbreitung, ihrer Sequenzvielfalt und ihres unbekanntem Produkts großes Interesse hervorriefen, wurde aus der Metagenombibliothek von *T. swinhoei* (gelber Chemotyp) der gesamte Cluster (sponge11) isoliert (Cosmid pSW1H8, Anhang Abb. 5).<sup>[201]</sup>

### C 5.2.1 Der *sup*-Cluster

Auf dem Cosmid pSW1H8 befindet sich ein Gencluster von ~14 kb mit einem einzigen ~10,4 kb großen PKS-Gen (*supA*) und den akzessorischen ORFs für eine ACP (*supB*), eine PPTase (*supC*) und eine putative Hydrolase (*supD*) (**Abb. 18 A**).<sup>[1]</sup> Beim ORF für eine putativen Transporter/Permease (*supE*) ist noch fraglich, ob er dem Cluster zuzurechnen ist oder nicht. Bis heute sind von verschiedenen Arbeitsgruppen insgesamt sechs Gencluster dieses Typs aus vier verschiedenen marinen Schwämmen isoliert worden (**Abb. 18**).



**Abb. 18:** Übersicht über alle bekannten *sup*-Cluster. **A)** pSW1H8 aus *T. swinhoei*.<sup>[1]</sup> **B)** pAPKS18 aus *A. aerophoba*.<sup>[1]</sup> **C)** pAE27p20 aus *A. aerophoba*.<sup>[1]</sup> **D)** 2063G aus *Pseudoceratina clavata*.<sup>[13]</sup> **E)** 1k6 aus *A. aerophoba*.<sup>[14]</sup> **F)** SA1 Cluster aus *D. dissoluta*.<sup>[15]</sup>

Das Cosmid pAPKS18 aus *A. aerophoba* enthält ebenfalls den *sup*-Cluster, jedoch mit vollkommen unterschiedlicher genomischer Umgebung. Auch sind in diesen Cluster die Positionen von *supE* und *supD* gegenüber dem Cluster aus *T. swinhoei* vertauscht (**Abb. 18 B**). Der *supA*-ORF hat eine identische Architektur und hohe Sequenzähnlichkeit zu SupA aus *T. swinhoei*, was ebenso für alle anderen komplett sequenzierten *supA*-Gene gilt.<sup>[1]</sup>

Das ebenfalls aus *A. aerophoba* stammende Fosmid pAE27p20 enthält lediglich den *supA*-ORF, dessen C-terminales Ende nicht mehr innerhalb des Inserts liegt



(**Abb. 18 C**).<sup>[11]</sup> Der 1k6 *sup*-Cluster wurde beim Durchmustern einer Klonbibliothek aus WGA-Sequenzen von FACS-sortierten Schwammsymbionten von *A. aerophoba* gefunden.<sup>[14]</sup> Dem Cluster auf 1k6 fehlen alle akzessorischen *sup*-Gene. Ein hochvariabler GC-Gehalt stromabwärts von *supA*, sowie eine Transposase lassen auf HGT des *supA*-ORFs schließen. Der GC-Gehalt ist mit ~64% fast identisch mit dem der anderen *sup*-cluster (**Abb. 18 E**).<sup>[14]</sup>

Kim und Fuerst berichteten 2006 über einen *sup*-Cluster (2063G) aus dem Metagenom von *Pseudoceratina clavata*.<sup>[13]</sup> Es fehlten hier die Gene für *supBCD*, jedoch ist *supE* vorhanden (**Abb. 18 D**).

Eine Abweichung zu den vorgenannten Vertretern des *sup*-Clusters bildet der von Schirmer *et al.* isolierte SA1 Cluster aus einer metagenomischen Bibliothek von *Discodermia dissoluta*. Es handelte sich um einen riesigen Gencluster (110 kb), bestehend aus drei ORFs. Er enthielt ein Startermodul zuzüglich 14 Verlängerungsmodule mit vollständiger Reduktionsschleife (außer in einem Modul). In 8 der 14 Module befand sich eine MT-Domäne. Das 15. Modul enthielt einen verkürzten und degenerierten KS-AT-Terminus und entspricht damit exakt dem *supA*-Gen der anderen Cluster (**Abb. 18 F**). Die Autoren vermuteten als Produkt eine multi-methylverzweigte C-30 Fettsäure. Es wurden aus demselben Schwamm noch zwei weitere ähnliche Cluster isoliert, die aber nicht im Detail bekannt sind.<sup>[15]</sup>

### C 5.2.2 SupA - eine neuartige PKS aus marinen Schwämmen

Dem Aufbau nach erinnert die SupA-PKS an Typ I-FAS aus Säugetieren. Sie gehört zum *cis*-AT-Typ und besitzt eine vollständige Reduktionsschleife. Im Unterschied zur tierischen cytosolischen FAS I besitzt SupA jedoch keine Lade-AT und keine TE-Domäne. In der Mitte (zwischen DH und ER) des *supA*-ORFs befindet sich eine MT. Allerdings ist auch in der FAS I der Säugetiere unlängst eine rudimentäre MT an genau derselben Position nachgewiesen worden.<sup>[115]</sup> Von der SupA-Architektur her wären mittkettig methylverzweigte Fettsäuren (MBFA) als Produkte zu erwarten, wie sie tatsächlich auch in vielen Schwämmen vorkommen (siehe E 2.4.3).

Interessant an SupA ist auch das Vorkommen einer zweiten KS- und AT-Domäne am C-terminalen Ende, wobei die AT das Motiv GHGLG anstelle des normalerweise konservierten Motivs GHSVG (mit Serin als aktiver AS) sowie einige Deletionen aufweist. Daher ist die zweite AT (=AT2) wahrscheinlich

funktionsunfähig. Jedoch spricht das Vorhandensein genau desselben KS2-(AT2) C-Terminus' bei allen bekannten SupA-Enzymen dafür, dass dieser eventuell doch eine Funktion haben könnte.

Bei Betrachtung der AS-Sequenz von SupA fällt eine geringere Ähnlichkeit zu tierischen FAS I als zu modularen PKS auf. Besonders mykobakterielle PKS I sind unter den sequenzähnlichsten Enzymen zu finden. Diese PKS sind an der Bildung von Lipiden mit methylverzweigten Fettsäuren beteiligt, die in den Mykobakterien Virulenzfaktoren zur Besiedlung ihrer Wirte und Etablierung in denselben darstellen.<sup>[215, 216]</sup> Da Schwämme sich von Bakterien ernähren, müssen die Symbionten sich, ähnlich wie Mykobakterien auch, vor dem Verdau schützen.

Möglicherweise stellt die SupA-PKS eine evolutive Übergangsform zwischen FAS und PKS dar. Neben der besonderen Kombination aus Architektur und Sequenz dieser Megasyntase wird diese Vermutung von dem besonderen Umstand des engen Zusammenlebens einer der ursprünglichsten Tierformen mit symbiotischen Bakterien gestützt.

Der *sup*-Cluster enthält alle typischen Merkmale bakterieller Gencluster, wie das Fehlen von Introns und größeren Zwischenräumen zwischen den ORFs sowie das Vorhandensein von Shine-Dalgarno-artigen Sequenzen. Der Produzent ist daher wahrscheinlich ein dominanter bakterieller Symbiont, da in der Bibliothek mehr als ein positiver Klon pro 1.000 auftreten. Beim Onnamid-Cluster handelte es sich um einen Klon in einer Million.

Das *supA*-Gen aus verschiedenen Clustern aus verschiedenen Schwämmen ist weitgehend identisch, jedoch ist die genomische Umgebung völlig unterschiedlich. Dies spricht gegen ein Gen in mehreren ähnlichen Bakterien, sondern für mehrere paraloge Gene in verschiedenen Bakterien. Außerdem ist die Verbreitung des *supA*-Gens durch HGT in verschiedene Bakterienspezies sehr wahrscheinlich.

Seit der Isolierung des *supA*-Gens auf dem Cosmid 1k6<sup>[14]</sup> gelten Poribakterien (siehe C 3.2.3) als potentielle Kandidaten für SupA Produzenten. Damals konnten 16S-rRNA Analysen FACS-sortierter Symbiontenfraktionen die bakterielle Herkunft dieses Clusters auf nur zwei Bakterienzellen eingrenzen: ein Poribakterium und ein Chloroflexi.<sup>[14]</sup> Die Frage ob Poribakterien die *supA*-Gene enthalten oder nicht wurde endgültig mit der Genomanalyse beantwortet, die auch ein Teil der vorliegenden Arbeit ist (siehe E 2.1).

## D ZIEL DER ARBEIT

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte vor allem der neu entdeckte ungewöhnliche *sup*-Cluster aus dem marinen Schwamm *T. swinhoei* eingehend *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Die SupA-PKS ist bisher nur aus Schwammsymbionten bekannt, aber in marinen Schwämmen ubiquitär und außerordentlich häufig. Dabei können in demselben Schwammexemplar unzählige, einander sehr ähnliche Varianten vorhanden sein. Die Sequenz und Architektur der PKS lassen auf MBFA als Produkte schließen, welche in großer Abundanz und Diversität in vielen Schwämmen vorkommen.

Daher stellten sich vor allem Fragen nach der Funktion des *sup*-Clusters sowie nach der Funktionsweise der einzelnen Enzyme, insbesondere der SupA-PKS. Antworten auf diese Fragen sollte die heterologe Expression des Clusters in verschiedenen bakteriellen Wirten mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der gebildeten Produkte geben. Zur funktionellen Charakterisierung des *sup*-Clusters sollten weiterhin sowohl die SupA-PKS, als auch das ACP SupB und die PPTase SupC als His8-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert, aufgereinigt und *in vitro* analysiert werden. Hierzu boten sich vor allem Assays zum Acyltransfer von der AT zum ACP mit radioaktiv markiertem Acetyl (**33**)- sowie Malonyl-CoA (**34**) an.

Auch die Korrelation zwischen der Diversität des *SupA*-Gens und der MBFA in marinen Schwämmen sollte in diesem Zusammenhang erörtert werden. Dazu waren umfangreiche Fettsäureanalysen verschiedener *supA*-positiver- und negativer mariner Schwämme geplant.

Nicht zuletzt war die Herkunft der SupA-PKS von großem Interesse. Diesbezüglich wurden Poribakterien vermutet, da diese Bakterien, ähnlich dem *sup*-Cluster phylogenetisch eine Sonderstellung einnehmen und (fast) ausschließlich in Meeresschwämmen, dort aber ubiquitär, nachgewiesen wurden. Diese Vermutung sollte durch eine positive Korrelation von *supA*-Genen, MBFA und Poribakterien in marinen Schwämmen, sowie mit der Analyse eines Poribakteriengenoms überprüft werden.

## E ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### E 1 Funktion des *sup*-Clusters

Aufgrund der Architektur der PKS des *sup*-Clusters werden als Produkte methylverzweigte Fettsäuren vermutet. Daher sollte nach erfolgreicher Transformation der Gene in verschiedene heterologe Wirte eine Bestimmung des bakteriellen Fettsäureprofils erfolgen. Besonders die MBFA, die vor allem in marinen Schwämmen vorkommen, können von den klassischen „Laborbakterien“ nicht produziert werden.

Neben den *In-vivo*-Studien sollten auch die Proteine der PKS, der PPTase und des ACP des *sup*-Clusters, sowie einzelne enzymatische Funktionen der PKS (z. B. SupA<sub>AT</sub>, SupA<sub>ACP</sub>) heterolog überexprimiert werden, um sie *in vitro* auf ihre Funktionalität hin zu untersuchen.

#### E 1.1 *Sup*-Cluster – heterologe Expression, Fettsäureprofile

Zur heterologen Expression sollte der *sup*-Cluster in verschiedene bakterielle Wirte transformiert werden. Die „Laborbakterien“ *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Streptomyces albus* gelten als geeignete Expressionswirte. Von diesen ist *Pseudomonas putida* mit einem GC-Gehalt von ~62% dem GC-Gehalt des *sup*-Clusters (~64%) am ähnlichsten. Abweichungen von etwa  $\pm 10\%$  weisen *Escherichia coli* (~51%) und *Streptomyces albus* (~72%) auf. *Corynebacterium glutamicum* (GC-Gehalt ~53%) wurde als weiterer Expressionswirt gewählt, da er natürlicherweise MBFA produzieren kann. Die postulierten Vorläufersubstanzen Acetyl-CoA (**33**) und Malonyl-CoA (**34**) werden ausreichend in allen verwendeten Bakterien produziert, da sie für deren Fettsäureproduktion unabdingbar sind. Nach der Expression sollten von den Bakterienzellen Fettsäureprofile erstellt und mit Negativkontrollen verglichen werden. Hierbei sollte insbesondere auf das Vorhandensein von MBFA geachtet werden. Zur Probenvorbereitung für die GC/MS-Messungen der Fettsäuren sollten entweder zuerst die Lipide extrahiert und dann einer milden alkalischen Methanolyse unterzogen (PLFA-Methode), oder die Fettsäuren wurden direkt aus den Zellkulturen in einer einzigen Prozedur (MIDI, "microbial identification system") extrahiert werden. Die PLFA-Methode sollte entweder mit Lipidfraktionierung

(PL-, GL-, NL-Fraktionen) oder ohne diese durchgeführt werden. Standardmäßig sollten die Fettsäuren als Methyl ester (FAME) gemessen werden, in seltenen Fällen sollten die FAME zu Picolinyestern umgeestert werden (siehe F 4). Sowohl die PLFA- als auch die MIDI-Methode sind prinzipiell gut geeignet, verschiedenste Fettsäuren von ~10 bis ~28 C-Atomen zu detektieren, MBFA eingeschlossen.<sup>[217]</sup> Die Anteile der einzelnen Fettsäuren jeder Probe werden in den Diagrammen in „mol %“ angegeben und anhand der Flächen unter den jeweiligen Peaks im TIC der GC/MS-Chromatogramme im Verhältnis zu einem mitgemessenen Standard (Nonadecansäure-Methyl ester, 19:0 FAME) bestimmt.

### Kurzschreibweise der Fettsäuren

Im Text der Arbeit wurde die sehr gebräuchliche Kurzschreibweise für die Bezeichnung der Fettsäuren angewandt. Die Zahl vor dem Doppelpunkt steht immer für die Gesamtzahl der C-Atome und die Zahl nach dem Doppelpunkt für die Zahl der vorhandenen Doppelbindungen. Die Position der Doppelbindung steht dahinter und wird entweder mit  $\Delta$  oder mit  $\omega$  angegeben. Dabei folgt die  $\Delta$ -Zählung der IUPAC-Norm und beginnt mit der Carboxylgruppe und die  $\omega$ -Zählung beginnt vom anderen, dem Methylende. Steht hinter der Positionsangabe der Doppelbindung ein *c* oder *t*, bedeutet dies *cis*- oder *trans*-Doppelbindungen.

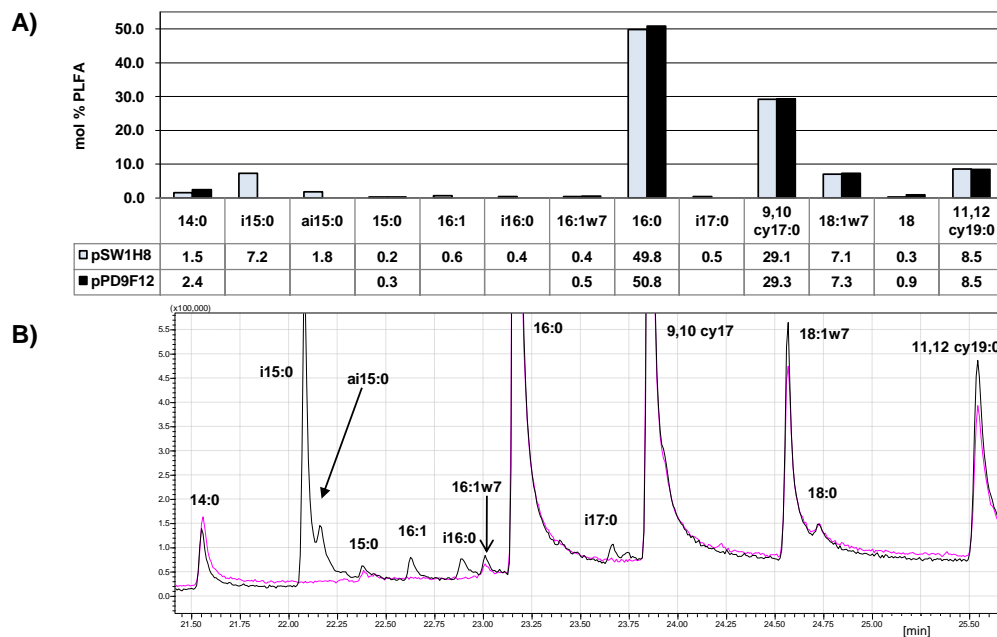
Die methylverzweigten Fettsäuren werden durch Angaben vor der Zahl der C-Atome gekennzeichnet. Ein *i*, *ai*, *aai* vor der C-Zahl bedeutet, dass die Fettsäure eine Methylverzweigung in *i*-, *ai*-, oder *aai*-Position besitzt. Das C-Atom der Verzweigung ist in der Angabe der C-Zahl miteinbegriffen. Der Präfix „cy“ indiziert Cyclopropyl-Fettsäuren, analog zu *i/ai* Fettsäuren mit Einbeziehung des zusätzlichen Kohlenstoffs in die Gesamtzahl der C-Atome. Steht vor der Zahl der C-Atome die Angabe der konkreten Position der Methylgruppe, so geschieht dies in Form des Präfixes „Me“. So bedeutet z. B: 10Me18:0 eine Fettsäure mit 18 C-Atomen und keiner Doppelbindung und einer zusätzlichen Methylgruppe an Position C18, also von der Carboxylgruppe aus gezählt. Man beachte, dass diese Fettsäure insgesamt 19 C-Atome hat.

Im Text bedeutet „C22“ immer die Länge der unverzweigten Kohlenstoffkette, bzw. das Kohlenstoffatom dieser Kette, an dem sich die Verzweigung befindet (vom Carboxylende aus gezählt) und „N22“ bedeutet ausdrücklich die Gesamtanzahl der Kohlenstoffatome, also inklusive aller Methylverzweigungen.

### E 1.1.1 Expressionswirt *Escherichia coli*

Für Expression von PKS in *E. coli* ist immer zusätzlich die Expression einer geeigneten PPTase notwendig.<sup>[76]</sup> Da in der vorliegenden Arbeit der Stamm *E. coli* BAP1 nicht zur Verfügung stand, der die PPTase Sfp bereits im Genom integriert enthält,<sup>[152]</sup> wurde das Gen für die PPTase Svp koexprimiert, bzw. die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die PPTase des *sup*-Clusters funktionsfähig ist (siehe Abb. 18 und 27). Normalerweise sollten die im Cluster befindlichen Gene generell am besten für die Produktion des entsprechenden Metaboliten geeignet sein.

Im initialen Versuch der vorliegenden Dissertation wurde das Cosmid pSW1H8, das auf dem Standard-Cosmid für die Erstellung metagenomischer Bibliotheken (pWEB, Epicentre) basiert in *E. coli* elektroporiert und die Bakterienkultur mittels Fettsäure-Analyse auf eine *in vivo* Expression hin getestet (**Abb. 19**).



**Abb. 19:** *In vivo* Expression des *sup*-Clusters in *E. coli* BL21(DE3). **A)** Fettsäureprofile (Prozentwerte). pSW1H8 versus pPD9F12 (Negativkontrolle). **B)** MIC  $m/z$  74 und 55, schwarz: pSW1H8 (Probe 1001), pink: pPD9F12 (Probe 1002). Kultivierung/Aufbereitung: 20 mL LB + Amp<sup>100</sup> in 100 mL EM, 37°C ü/N; PL-Fractionen, milde alkalische Methanolyse, Picolinylester nach Destillats und Angers (siehe F 4.3.4). MIC, Massenspur; PL, "polar lipids"; PLFA, "Polar lipid fatty acid analysis".

Da die Fettsäuremuster stark wachstumsabhängig sind, wurde als Negativkontrolle nicht der Stamm ohne Cosmid verwendet, da ohne zusätzliche metabolische Last und Selektion durch das Antibiotikum ein schnelleres Wachstum eintreten würde als mit Cosmid. Stattdessen diente als

Negativkontrolle ein ebenfalls auf pWEB basierendes Cosmid gleicher Größe mit einem anderen Insert (pPD9F12 mit Teilen des Pederin-Clusters).

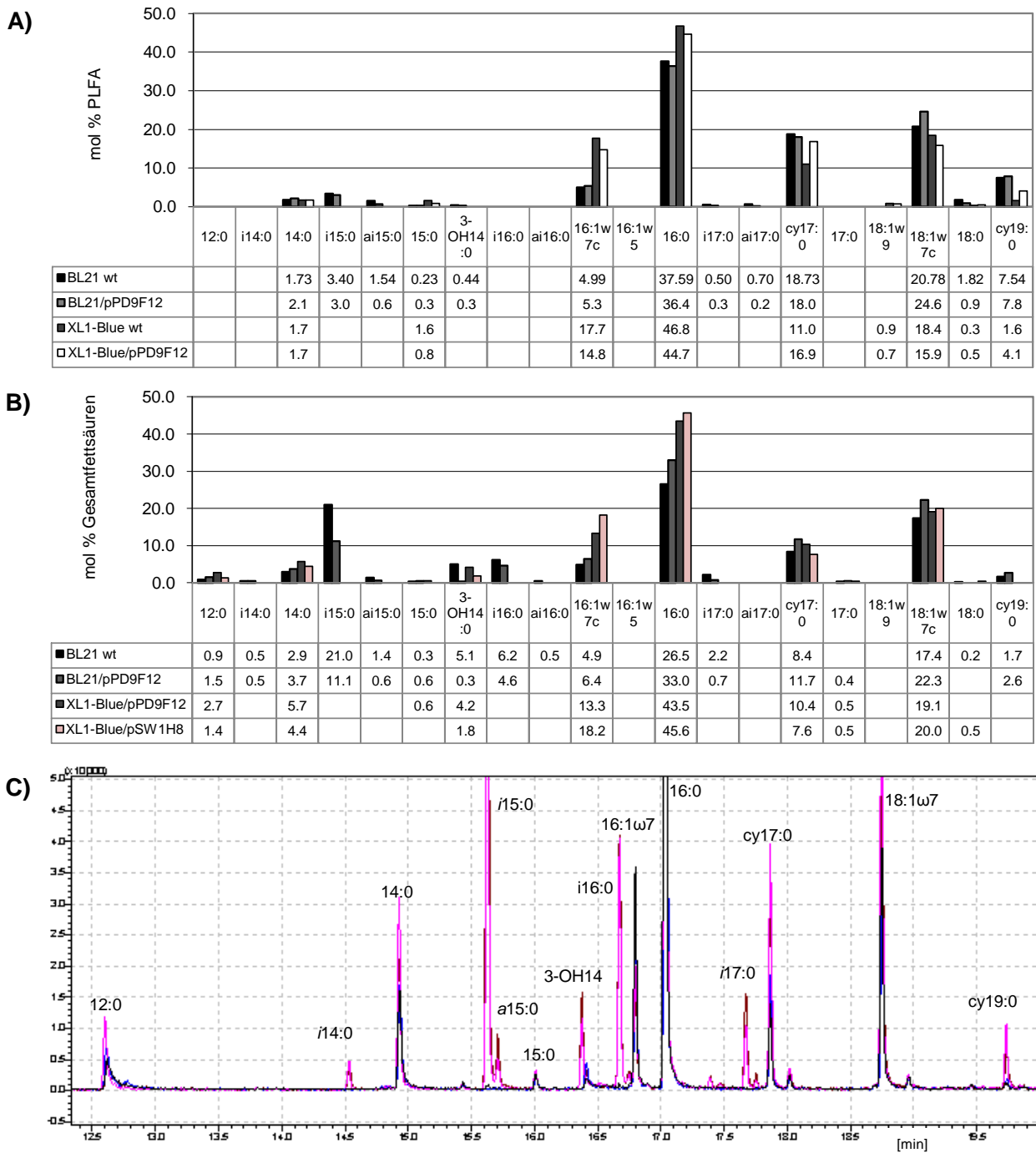
Die GC/MS-Chromatogramme zeigten lediglich im Vorkommen von *iso*- und *anteiso*-verzweigten Fettsäuren (*i/ai*-FS) Unterschiede zwischen der Probe mit pSW1H8 und der Negativkontrolle (**Abb. 19**). Ansonsten traten nur die gewöhnlichen, für *E. coli* typischen Fettsäuren auf (**Abb. 20**, Anhang Tab. 7, Anhang Tab. 8). Neben den gesättigten Fettsäuren (SAFA) 14:0, 15:0, 16:0, 17:0 und 18:0 traten zwei einfach ungesättigte Fettsäuren (18:1 $\omega$ 7 und 16:1 $\omega$ 7) und zwei Cyclopropyl-Fettsäuren (cy17:0 und cy19:0) auf. Für die SAFA von *E. coli* ist charakteristisch, dass der Palmitinsäure (**39**) (16:0)-Peak stets der höchste Peak ist, was auch in den gemessenen Fettsäure-Spektren der Fall war (**Abb. 19, Abb. 20**).

Bei weiteren Expressionsversuchen zeigte sich, dass auch der Wildtyp des *E. coli*-Expressionsstamms BL21(DE3) *i/ai*-FS mit insgesamt 15 oder 17 C-Atomen (N15 oder N17) produziert, wenn die Kultur sehr lange inkubiert wurde (länger als 16 h bei 16 °C). Je länger inkubiert wurde, desto höher war der Anteil der *i/ai*-FS. Beim Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF' wurden jedoch nie *i/ai*-FS beobachtet (**Abb. 20**). Das Vorkommen solcher terminal methylverzweigter Fettsäuren ist generell für *E. coli* untypisch; laut Literaturangaben wäre es jedoch durchaus möglich, dass die AT der *E. coli* FAS II in bis zu 10% der Fälle die Bildung von *i/ai*-FS katalysiert, indem sie methylverzweigte Startermoleküle verwendet.<sup>[218]</sup>

In den Fällen in denen zur Negativkontrolle kein Plasmid zur Verfügung stand, wurde auf den Wildtyp (gegebenenfalls mit Chaperon-Plasmid) zurückgegriffen. Bei der Erstellung der Fettsäuremuster musste dann aber streng auf die Einhaltung der gleichen Wachstumsphasen von Probe und Kontrolle geachtet werden.

Aus **Abb. 20 B,C** ist ebenfalls ersichtlich, dass auch mit der MIDI-Methode kein wesentlicher Unterschied zwischen dem *E. coli* Stamm mit pSW1H8 und ohne dem Cosmid zu messen war. Diese Methode wurde zum Vergleich herangezogen, da sie die am meisten verwendete Standardmethode zur Bestimmung von Fettsäureprofilen aus Mikroorganismenkulturen ist. Sie wird z. B. auch von der DSMZ benutzt (siehe F 4.5). Die Fettsäureprofile, die mit der MIDI Methode erstellt wurden, enthielten relativ höhere Anteile an *i/ai*- und OH-FS, als die mit der PLFA-Methode erstellten (Anhang Abb. 51). OH-FS sind Fettsäuren mit einer

oder mehrerer Hydroxy-Gruppen. Vor allem gesättigte Fettsäuren mit einer OH-Gruppe an C3 sind häufig Bestandteile von Lipid A der Lipopolysacharid (LPS)-schicht Gram-negativer Bakterien.<sup>[219]</sup>



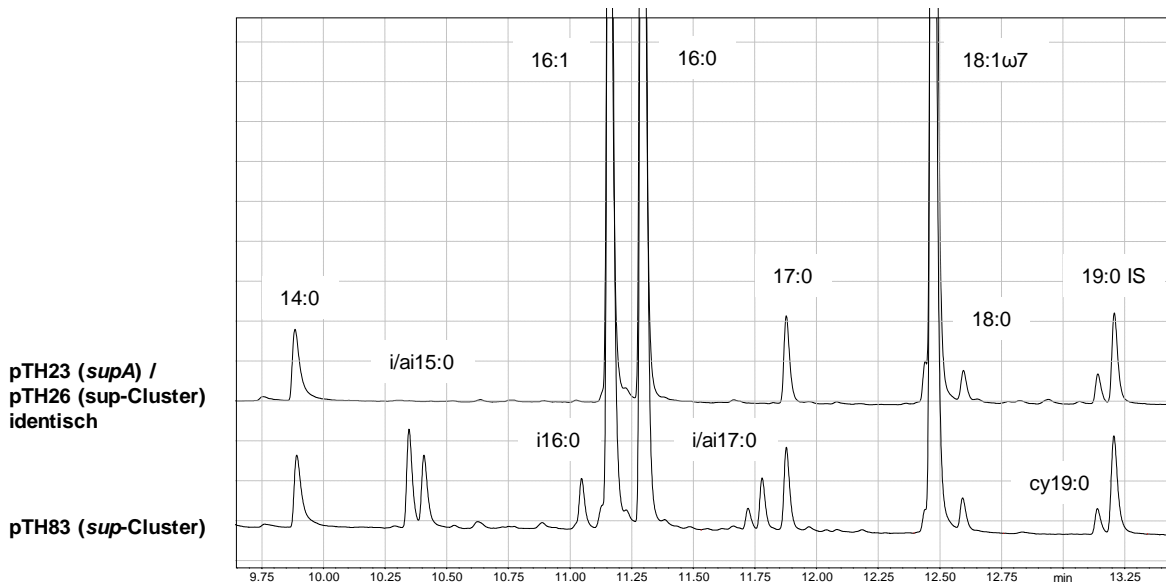
**Abb. 20:** Fettsäureprofile von *E. coli* Wildtypen und Transformaten mit *sup*-Cluster. Vergleich *E. coli* BL21(DE3) vs. *E. coli* XL1-Blue MRF. **A)** Fettsäureprofile PLFA-Methode; BL21 wt (Probe 0215); BL21/pPD9F12 (Negativkontrolle, Probe 0213); XL1-Blue wt (Probe 0214); XL1-Blue/pPD9F12 (Negativkontrolle, Probe 0211). **B)** Fettsäureprofile MIDI-Methode; BL21 wt (Probe 0209M); BL21/pPD9F12 (Negativkontrolle, Probe 0207M); XL1-Blue/pPD9F12 (Negativkontrolle, Probe 0205M); XL1-Blue/pSW1H8 (Probe 0218M). **C)** MIC *m/z* 74 und 55 der Proben aus B). Kultivierung: PLFA: 20 mL LB + Amp<sup>100</sup>, 24 h bei 30 °C; MIDI: LB + Amp<sup>100</sup>, 1 Quadrant der dicht bewachsenen LB-Agarplatte (ü/N bei 30 °C) in 2 mL H<sub>2</sub>O suspendiert. wt, Wildtyp. Detaillierte Informationen zu den Proben finden sich in Tabellenform im Anhang (H 3).



Wurde jedoch die PLFA-Methode um eine zusätzliche saure Methylierung der MeOH/H<sub>2</sub>O-Phasen (= M/H-Phasen) ergänzt (siehe F 4.3.2), konnten auch mit dieser Methode OH-Fettsäuren gemessen werden. Dies lässt darauf schließen, dass diese Fettsäuren nicht als *O*-Ester gebunden waren. Ein Vorteil der PLFA-Methode waren die sehr klaren Chromatogramme, die fast ausschließlich Fettsäuren abbildeten. Außerdem bietet diese Methode die Möglichkeit näherer Zuordnung der Fettsäuren zu den drei Lipidklassen Neutrallipide (NL), Glycolipide (GL) und polare Lipide (PL) (siehe F 4.2). Der Vorteil der MIDI-Prozedur ist jedoch, dass sie schnell und einfach ist.

In weiteren Experimenten wurden auch die den *sup*-Cluster enthaltenden Plasmide pTH26, pTH27 und pTH35, pTH36, pTH83 auf Fettsäureproduktion *in vivo* getestet. Die Plasmide unterscheiden sich hauptsächlich in der Art ihrer Ausgangsvektoren (**Tab. 29**, Anhang Tab. 1). Hier zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zur Negativkontrolle, sowohl mit als auch ohne Induktion des Promotors durch Zugabe von IPTG. Ebenso wurden die Chaperon-Plasmide pKJE7 und pTf16 der Firma Takara koexprimiert, die mit L-Arabinose induziert wurden (Anhang Tab. 7 und 9). Die Chaperon-Plasmide enthalten jeweils mehrere verschiedene Chaperone (**Tab. 15**), die die korrekte Faltung der überexprimierten Proteine in *E. coli* unterstützen sollen um möglichst viel lösliches und damit aktives Protein zu erhalten.

In der SupA-PKS (Abb. 28) ist keine TE Domäne vorhanden, wie es z. B. bei der FAS I der Tiere der Fall ist (siehe Abb. 10 A). Daher kann das fertige Produkt nicht von der Synthase selbst abgelöst werden. Auch in dem *sup*-Cluster sind keine weiteren Enzyme vorhanden, die das Produkt von der PKS ablösen oder transferieren könnten. Vor diesem Hintergrund wurden in einem abschließenden Experiment die Plasmide pTH26 (enthält den *sup*-Cluster) bzw. pTH23 (enthält nur das *supA*-Gen) mit dem Plasmid pTH91 und dem Plasmid pKJE7 (trägt die Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE) koexprimiert. PTH91 enthält die klonierte TE I aus *E. coli*,<sup>[220]</sup> die eine Breitband-Arylesterase-Aktivität besitzt und daher möglicherweise an CoA (**36**) gebundene Fettsäuren freisetzen könnte. Das Ergebnis glich jedoch dem schon vorher erhaltenen Fettsäuremuster von *E. coli* ohne *i/ai*-FS (**Abb. 21**).

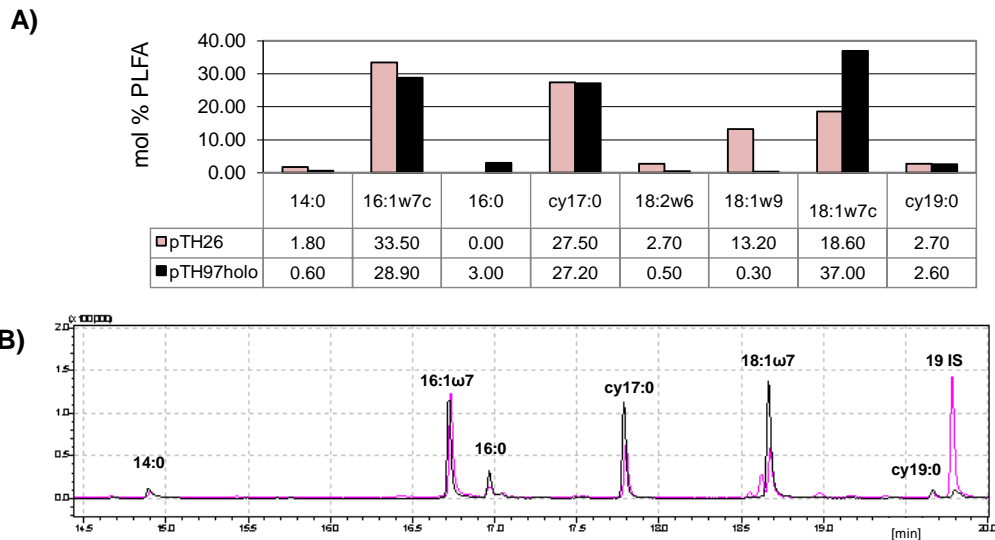


**Abb. 21:** Koexpression der *sup*-Gene mit der TE I (pTH91) und Chaperone (DnaK, DnaJ, GrpE auf pKJE7) in *E. coli* BL21(DE3). GC-Spektren. **pTH83** (*sup-Cluster*)/pKJE7 (Probe 0148); 50 mL LB + Amp/Cam + 5 mM L-Arabinose (zur Induktion des *araB* Promoters auf pKJE7), 37 °C bis zur Induktion mit 1 mM IPTG; 19 h bei 16 °C; milde alkalische Methanolyse. **pTH23** (*supA*)/pKJE7/pTH91 (Probe 0149); **pTH26** (*sup-Cluster*)/pKJE7/pTH91 (Probe 0150); Kultivierung von 0149 und 0150: 1 mL ü/N zu 50 mL LB + Amp/Cam/Kan + 5 mM L-Arabinose, 37 °C bis zur Induktion mit 1 mM IPTG, 4,5 h bei 16 °C; Lipid Extraktion von 50 mL Kultur, milde alkalische Methanolyse. IS, interner Standard.

### Fettsäuren der Proteinlysate

Dieser Versuch sollte dazu führen, die möglicherweise fehlende Ablösung oder Übernahme der gebildeten Fettsäuren von der PKS aufgrund der nicht vorhandenen TE-Domäne durch *In-vitro*-Hydrolyse zu ermöglichen. Bei einer Überexpression der PKS sollten theoretisch genügend PKS Moleküle vorhanden sein, um eine messbare Menge an Produkt freizusetzen. Von den Proteinlysaten, die mittels SDS-PAGE nach Expression des *sup*-Clusters untersucht wurden, zeigte pTH26 in Verbindung mit dem Chaperon Tig (auf dem Plasmid pTf16) eines der besten Ergebnisse (siehe Abb. 32). Aus 2,5 L Kultur wurde ein Proteinlysat hergestellt; dann wurden die Proteine im Anschluss mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und die gebundenen Fettsäuren durch alkalische Hydrolyse (mit KOH, bzw. Hydroxylamin) abgespalten. Die freien Fettsäuren (FFA) wurden im Folgenden mit HCl in MeOH sauer methyliert und der Harnstofffraktionierung unterzogen (siehe F 4.4). Die Harnstofffraktionierung sollte dazu dienen, methylverzweigte Fettsäuren anzureichern bzw. die dominierenden SAFA zu reduzieren, um die Sensitivität für MBFA zu erhöhen. Als Negativkontrolle diente das Plasmid pTH97*holo*, das keine PKS-Gene außer

einer ACP Domäne enthielt. Die Proben wurden im Anschluss hinsichtlich ihres Fettsäureprofils untersucht (**Abb. 22**).



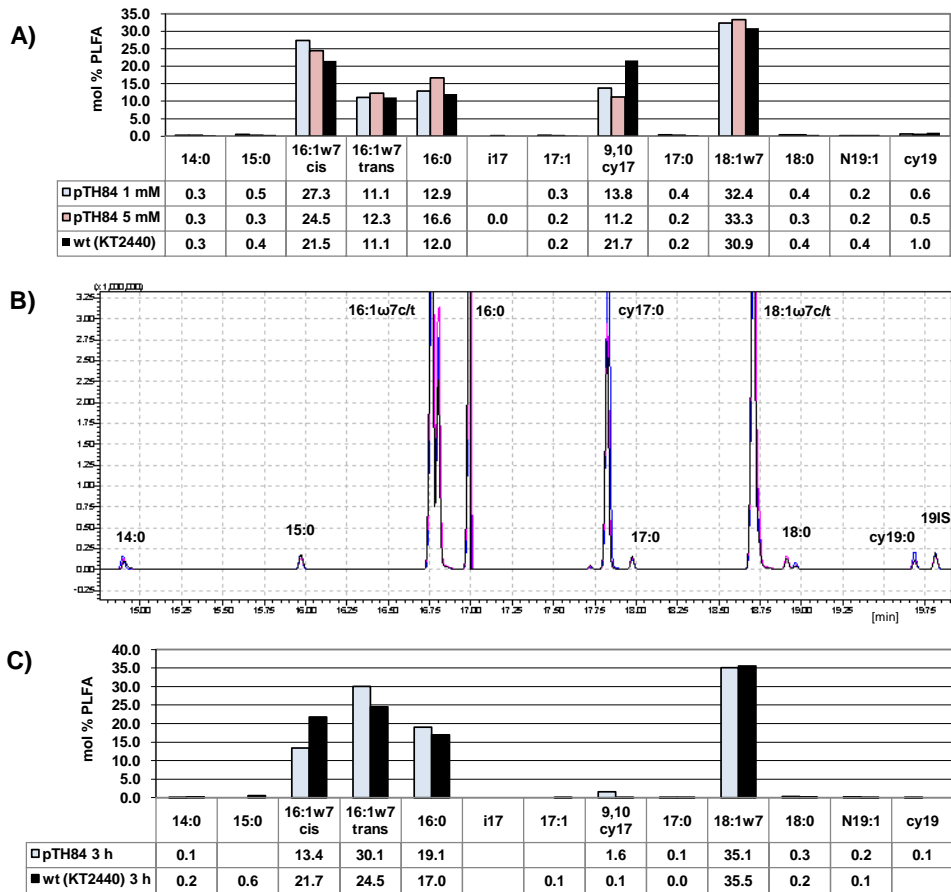
**Abb. 22:** Fettsäureprofile der Proteinlysate von *E. coli* nach Expression des sup-Clusters. **A)** Fettsäureprofile. pTH26, sup-Cluster, Proteinlysate von pTH26; pTH97holo, Negativkontrolle. **B)** MIC  $m/z$  74 und 55, Overlay pTH26 und pTH97holo. Kultivierung/Aufbereitung: 2,5 L LB + Kan/Cam + 5 mM L-Arabinose, *E. coli* BL21(DE3), ü/N bei 16 °C, Pellets in 50 mL Lysepuffer (MES), French Press.

Die Ergebnisse zeigten keine Bildung anderer Fettsäuren in der Proteinprobe als in den Gesamtzellen. Die detektierten Fettsäuren haben ihren Ursprung wahrscheinlich in dem Vorhandensein von FAS II der Wirtsbakterien. Bezüglich der Methodik kann die Harnstofffraktionierung jedoch als erfolgreich bezeichnet werden, da die sonst dominanten SAFA (vor allem 16:0) nun kaum mehr zu messen waren (**Abb. 22**).

Mögliche Gründe für die nicht erfolgreiche heterologe Expression werden in der Zusammenfassung dieses Abschnittes diskutiert.

### E 1.1.2 Expressionswirt *Pseudomonas putida*

Der Stamm *P. putida* KT2440 (DSM 6125) eignet sich generell sehr gut für die Expression von PKS-Genen, da er in der Lage ist, die ACP posttranslational in ihre holo-Form umzuwandeln.<sup>[221]</sup> Mit pJB861<sup>[222]</sup> stand ein Expressionsvektor für *Pseudomonas* zur Verfügung, dessen *Pm*-Promotor mit *m*-Toluylsäure induziert wird. Der mit dem sup-Cluster versehene Vektor pJB861 (=pTH84) wurde in auf *in vivo* Expression mittels Fettsäure-Analytik getestet. Wie auch bei *E. coli* konnten keine Unterschiede der Proben zur Negativkontrolle festgestellt werden (**Abb. 23**).

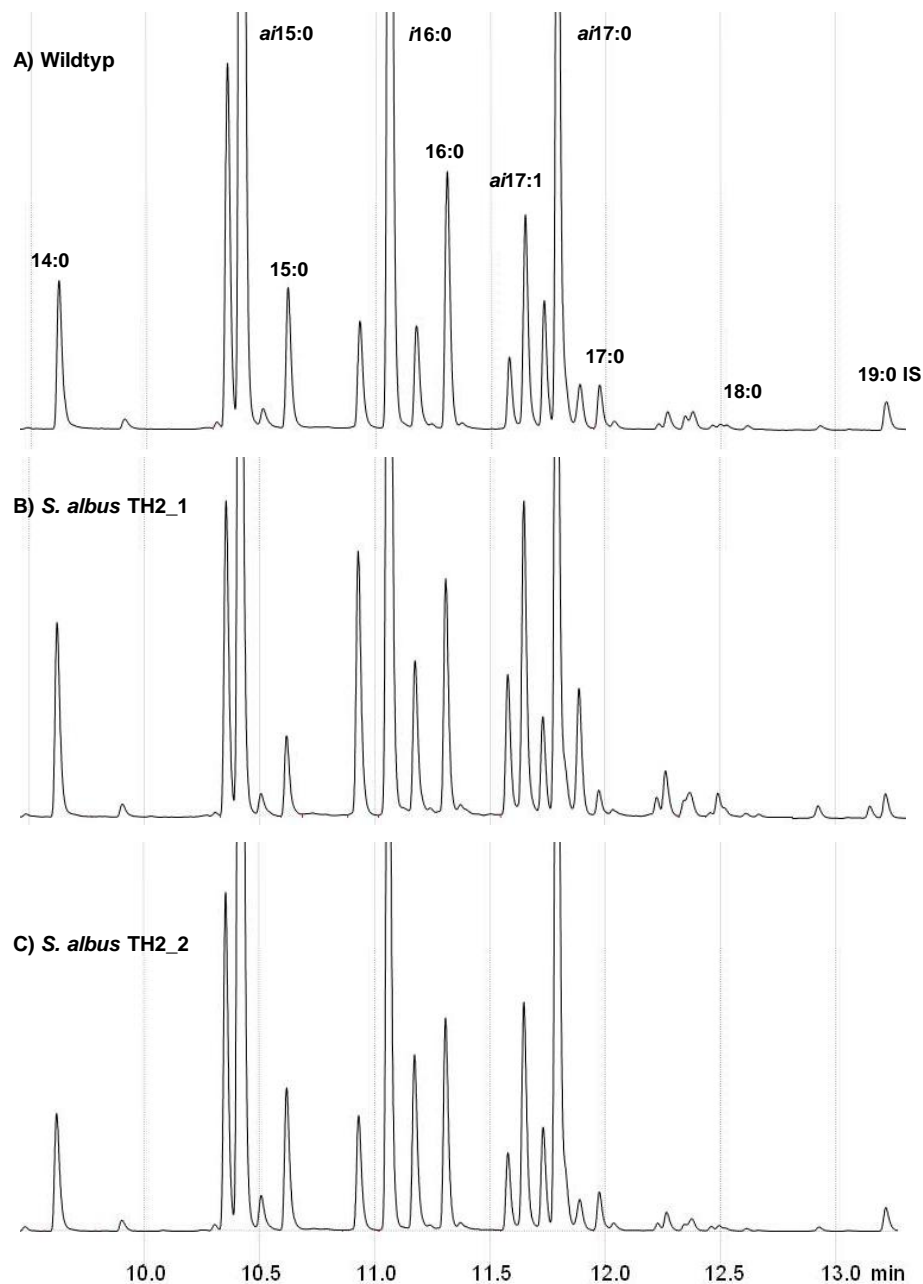


**Abb. 23:** Expression des *sup*-Clusters in *P. putida*. Fettsäureprofile. **A)** pTH84 1mM *m*-Toluylsäure zur Induktion des *Pm*-Promotors (Probe 1306); pTH84 5 mM *m*-Toluylsäure (Probe 1305); wt (KT2440) (Probe 1302) 5 mM *m*-Toluylsäure. Kultivierung/Aufbereitung: 50 mL LB + Kan<sup>50</sup> (außer bei wt) in 100 mL EM, 2 h bei 30 °C, dann Induzierung mit *m*-Toluylsäure (2,5 M Stammslg.) dann 18 h bei 20 °C; milde alkalische Methanolyse. **B)** MIC *m/z* 74 und 55 der Proben aus A). **C)** pTH84 (Probe 1308); wt (KT2440) (Probe 1307); Kultivierung/Aufbereitung: 25 mL LB + Kan<sup>50</sup> (außer bei wt), 2 h bei 30 °C, dann Induzierung mit 5 mM *m*-Toluylsäure, dann 3 h bei 20 °C; milde alkalische Methanolyse. 19IS, 19:0 interner Standard; wt,

*P. putida* enthielt, ähnlich wie *E. coli* ca. 10-15 verschiedene Fettsäuren. Die dominanten Fettsäuren waren die einfach ungesättigten 18:1 $\omega$ 7 und 16:1 $\omega$ 7. Das *trans*-Isomer der 16:1 $\omega$ 7 trat, wie bei *Pseudomonas* üblich, stark in Erscheinung (Abb. 23).<sup>[223]</sup> Weitere Fettsäuren von *P. putida* waren die cy17:0 und cy19:0, sowie die SAFA 14:0, 15:0, 16:0, 17:0 und 18:0. Im Gegensatz zu *E. coli* wurden *i/ai*-FS nur in Spuren gefunden (*i*17:0). In den Chromatogrammen erschien knapp hinter dem 18:0 Peak ein kleinerer Peak einer putativen N19:1 Fettsäure, die möglicherweise eine kurzketting-methylverzweigte Fettsäure darstellt. Für eine eindeutige Bestimmung war die Konzentration allerdings zu gering. Da diese Fettsäure aber auch (und sogar am deutlichsten) im Wildtyp zu messen war, wurde sie nicht näher untersucht (Abb. 23).

### E 1.1.3 Expressionswirt *Streptomyces albus*

Der GC-Gehalt von *S. albus* (~72%) liegt etwas näher an dem des *sup*-Clusters (~64%) als es bei *E. coli* der Fall ist. Ein weiterer Grund für die Wahl von *S. albus* ist, dass Streptomyceten (im Gegensatz zu *E. coli*) generell natürlicherweise eine Vielzahl von PKS exprimieren, also bestens gerüstet für die Expression von großen Multienzymen sind. *Streptomyces* Bakterien produzieren auch Methylmalonyl-CoA (**35**) zum Einbau von Methylgruppen in Polyketide (Bsp. Erythromycin), was eventuell von Vorteil sein könnte.



**Abb. 24:** Expression des *sup*-Clusters in *S. albus*. Vergleich der GC-Spektren von *S. albus* TH2 mit dem Wildtyp. **A)** *S. albus* Wildtyp (Probe 1403). **B)** *S. albus* TH2\_1 (Klon 1, Probe 1411). **C)** *S. albus* TH2\_2 (Klon 2, Probe 1405). Kultivierung/Aufbereitung: 25 mL LB + Apr<sup>35</sup> (außer bei wt), 92 h bei 29 °C, 210 rpm, Ultraschall, Bligh & Dyer, milde alkalische Methanolyse (entspricht PLFA-Methode). wt, Wildtyp.

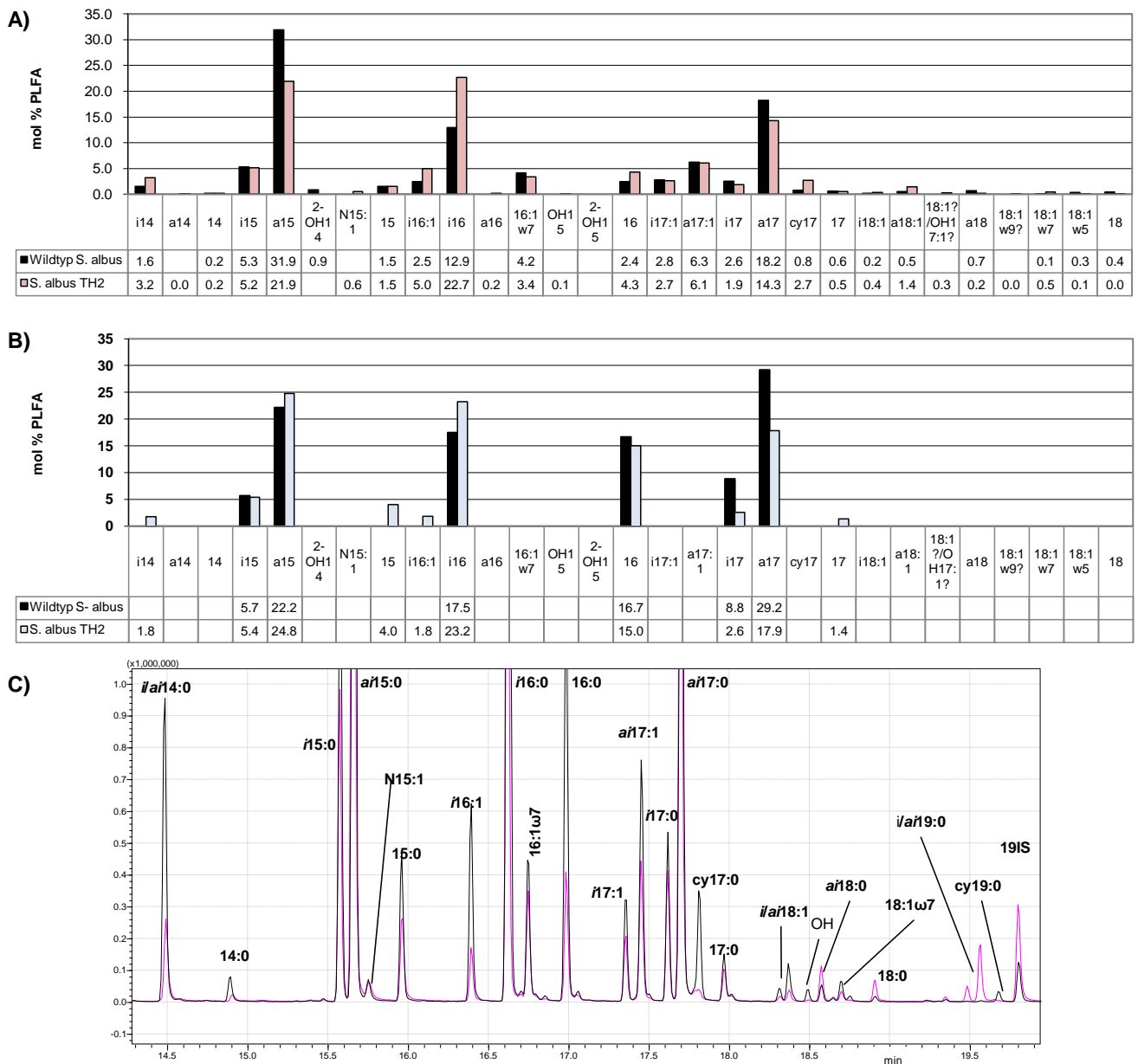
Die den *sup*-Cluster enthaltenden *S. albus* Stämme *S. albus* TH1 und TH2 wurden durch Transformation des Wildtyps mit den Plasmiden pTH35 bzw. pTH60 erzeugt und auf *In-vivo*-Produktion von methylverzweigten Fettsäuren getestet. PTH35 und pTH60 wurden auf der Basis von pKJ55<sup>[224]</sup> konstruiert. Letzterer ist ein Expressionsvektor für *Streptomyces* mit dem konstitutiven Promotor *PerME\**.

Bei einer ersten Analyse der Fettsäuren mittels GC zeigte sich bereits, dass die Chromatogramme des Stammes *S. albus* TH2, der den *sup*-Cluster im Genom integriert enthält, fast identisch mit dem Spektrum des Wildtyps waren. Es wurden also keine weiteren Fettsäuren gebildet (**Abb. 24**).

Auch die eingehende Analyse ausgewählter Proben mit GC/MS ergab keine Veränderungen im Fettsäureprofil im Vergleich zur Negativkontrolle (**Abb. 25**). Die Anzahl der Fettsäuren in *S. albus* war mit 20-25 Fettsäuren deutlich höher war, als die von *E. coli* und *P. putida*. Der Stamm enthielt eine große Anzahl und Abundanz von *i/ai*-FS. Die *ai15:0*, *ai17:0* und *i16:0* waren die abundantesten Fettsäuren in *S. albus*. Typisch für Streptomyceten ist das oft stärkere Auftreten des *ai*- gegenüber dem *i*-Isomer.<sup>[225]</sup> Neben den SAFA von N12 bis N20 kamen die Cyclopropyl-Fettsäuren *cy17:0* und *cy19:0* vor, wobei letztere immer deutlich geringer konzentriert war als erstere. An OH-FS kamen im Unterschied zu den gram-negativen Bakterien keine 3-OH, sondern die 2-OH14:0 und die 2-OH15:0 vor. An ungesättigten Fettsäuren wurden nur einfach ungesättigte (MUFA) gemessen, vor allem die 16:1 $\omega$ 7 und die 18:1 $\omega$ 7 (**Abb. 25**, Anhang Tab. 9).

### Fettsäuren der Proteinlysate

Ebenso wie bei *E. coli* wurden auch von den *S. albus* Expressionsstämmen Proteinlysate angefertigt und mit SDS-PAGE analysiert. Von *S. albus* TH2 und TH3 (enthält nur das *supA*-Gen) wurden die Fettsäuren der Proteinlysate gemessen. Im Ergebnis zeigten sich in etwa die gleichen Fettsäuremuster wie die der Gesamtzellen (Anhang Tab. 9). Die Fettsäuren stammen vermutlich alle aus den Typ-II-Synthasen, die ebenfalls im Lysat vorhanden waren oder von cytosolischen Fettsäureestern.



**Abb. 25:** Expression des *sup*-Clusters in *S. albus*. Fettsäureprofile der GC/MS Messungen.

**A)** Fettsäureprofile (N14:0 bis N18:0) **Wildtyp *S. albus*** (Probe 1404); ***S. albus* TH2** (Probe 1411). **B)** Fettsäureprofile der Methanol/Wasser (M/H) Phasen (N14:0 bis N18:0): **Wildtyp *S. albus*** M/H-Phase (Probe 1404w); ***S. albus* TH2** M/H-Phase (Probe 1411w). **C)** Ionenspuren (MIC) *m/z* 74 und 55 von 1404 (wt) vs. 1411 (*sup*-Cluster). Kultivierung/Aufbereitung: 25 mL LB + Apr<sup>35</sup> (bei wt ohne Antibiotikum), 92 h (1411), bzw. 116 h (1404) bei 29 °C, 210 rpm, Ultraschall zum Probenaufschluss, Bligh & Dyer, milde alkalische Methanolanalyse (PLFA-Methode). 19IS, 19:0 interner Standard, wt, Wildtyp.

### E 1.1.4 Expressionswirt *Corynebacterium glutamicum*

Als ein Bakterium der CMN-Gruppe besitzt *C. glutamicum* einen reichhaltigen Fettsäurestoffwechsel (siehe C 2.2.1) mit FAS der Typen II und I.<sup>[226]</sup> Deshalb sollte in Kooperation mit dem AK L. Eggeling (FZ Jülich) dieses Bakterium als heterologer Wirt für den *sup*-Cluster auf Expression getestet werden. Die erste

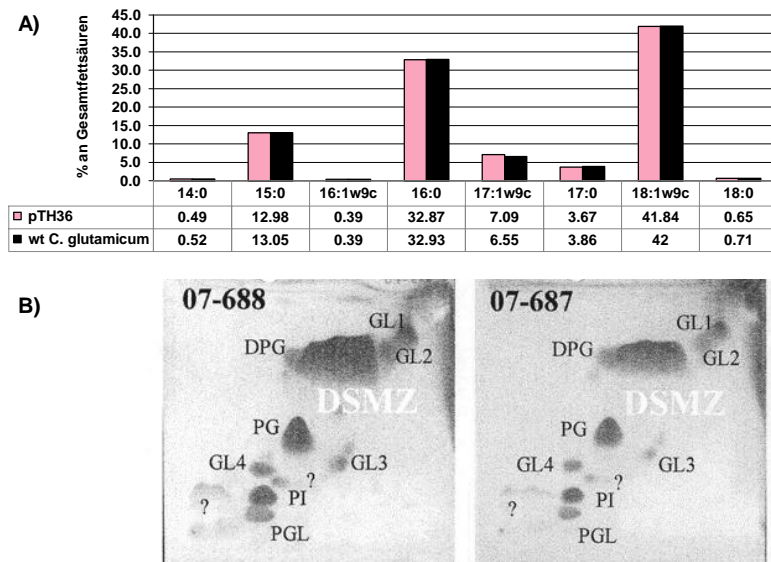
Strategie zur *In-vivo*-Expression war, das pGA1 Minimal-Replikon für Corynebakterien (*rep*, befindlich auf dem Plasmid pKG32ctRNAmut<sup>[227, 228]</sup>) in pSW1H8 zu klonieren. Das entstandene Cosmid (pTH12) konnte dann aber nicht in *C. glutamicum* repliziert werden. Der Grund könnte z. B. eine zufällige Mutation im Replikon gewesen sein. Da keine Gewissheit über die Funktionsfähigkeit des Replikons gegeben war, wurde dieser Ansatz aufgegeben und, umgekehrt, nun der Gencluster in ein für Corynebakterien tauglichen Expressionsvektor kloniert (siehe F 2.13.1). Es entstanden zwei Expressionsplasmide auf der Basis zweier unterschiedlicher Vektoren mit dem *sup*-Cluster als Insert (pTH26 und pTH36). Nur pTH36 wurde in *C. glutamicum* auf Fettsäurezusammensetzung hin untersucht.

Die Ergebnisse zeigten keinerlei Unterschiede in der Fettsäure- und Lipidzusammensetzung zum Wildtyp *C. glutamicum*. Der Wildtyp enthielt nur eine geringe Anzahl von Fettsäuren. Die abundantesten Fettsäuren waren 18:1 $\omega$ 9 und 16:0. Es wurden keine methyl- oder cyclopropyl-verzweigten Fettsäuren detektiert (**Abb. 26**, Anhang Abb. 34).

Da der *sup*-Cluster in pTH26, im Gegensatz zu pTH36 (*Ptac*-Promotor), nicht der Kontrolle eines starken Promotors unterliegt, sondern keinen ausgewiesenen Promotor besitzt, erschien die Expression von pTH26 aufgrund des Ergebnisses von pTH36 wenig Erfolg versprechend. Deshalb wurde nach dem Transfer von pTH26 in *C. glutamicum* auf die kostenintensiven Lipidanalysen in der DSMZ verzichtet.

Die gewöhnlich in diesen Bakterien vorkommenden zahlreichen Mykolsäuren<sup>[229]</sup> wurden mit der angewandten Methode (MIDI) vom Analytikservice der DSMZ nicht erfasst, und die in der Literatur für diese Bakterien beschriebenen Fettsäuren 18:1 $\omega$ 7 und 10Me18:0 konnten auch nicht gefunden werden.<sup>[226]</sup> Die Zusammensetzung der Polarlipide (PL) die zusätzlich angefertigt wurde, zeigte keinerlei Unterschiede zwischen pTH36 und dem Wildtyp. Die dominanten PL dieses Bakteriums waren Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylinositol (PI) (**Abb. 26**).





**Abb. 26:** Expression des *sup*-Clusters in *C. glutamicum*. Fettsäuren und Lipide. **A)** pTH36 (*sup*-Cluster, Probe 07-688) versus wt *C. glutamicum* (Probe 07-687). MIDI-Methode. **B)** Ergebnisse der Lipid-Analyse. 07-688 (pTH36, (*sup*-Cluster) versus 07-687 (wt *C. glutamicum*). Die Analysen wurden vom Analytik-Service der DSMZ und Dr. B. J. Tindall (Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. DPG, Diphosphatidylglycerol; PG, Phosphatidylglycerol; PI, Phosphatidylinositol; PGL, Phosphoglycolipid; GL, Glycolipid; ?, nicht identifizierte Lipide.

### E 1.1.5 Heterologe Expression des *sup*-Clusters – Zusammenfassung und Diskussion

In allen vier getesteten heterologen Wirten zeigten die Fettsäureprofile keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Proben und Negativkontrollen. Es traten lediglich wachstumsbedingte Schwankungen in den Fettsäureprofilen auf. In *E. coli* BL21(DE3) tauchten *i/ai*-verzweigte Fettsäuren nur auf, wenn die Kulturen sehr lange inkubiert wurden. Mit diesem Stamm wurden vielfältige Wachstumsbedingungen, sowie die Koexpression mit Chaperonen, sowie TE I aus *E. coli* getestet, jedoch konnten nie neue Fettsäuren detektiert werden. MBFA kamen in keinem der heterologen Wirte vor.

Die Gründe dafür können vielfältig sein. Es könnte daran liegen, dass erstens der *sup*-Cluster trotz der vorhandenen MT-Domäne in SupA (siehe Abb. 18 und 28) eine ganz „normale“ Fettsäure, wie z. B. Palmitinsäure (39) (16:0) produziert. Da es immer Schwankungen in den Fettsäureprofilen gibt, ließe sich das nicht nachweisen. Zweitens wäre auch eine Produktion eines mit GC/MS nicht messbaren Produktes denkbar. Drittens könnte es sein, dass durch die fehlende Ablösung des Produktes oder die fehlende Übertragung des Produktes von Transferasen das Enzym blockiert wird. Möglicherweise wäre dann nicht genügend PKS-Protein vorhanden um die Messschwelle zu überschreiten.

Gründe für die nicht erfolgreiche funktionelle Expression könnten folgende sein: Ein nicht angepasster Codongebrauch könnte zu einer unzureichenden Translation der Gene geführt haben. Im Vergleich zu *E. coli* war der Unterschied im Codongebrauch im Mittel 30,3%. Besonders die GC-reichen Codons könnten für die Translation in *E. coli* ein Problem darstellen (Anhang Abb. 52). Nach der Translation könnte eine unkorrekte Proteinfaltung eine funktionelle Expression verhindert haben. Andere Gründe könnten in der fehlenden Genregulation liegen. Beispielsweise wurden kürzlich für die PKS-Biosynthese in *Streptomyces* bestimmte positive Regulatoren als notwendig nachgewiesen.<sup>[230]</sup> In diesem Zusammenhang ist auch die Möglichkeit des Fehlens geeigneter Promotoren zu nennen.

Neben der erwähnten möglicherweise fehlenden Transferase könnten auch andere Enzyme, z. B. für die Produktion von Vorläufersubstanzen für eine erfolgreiche heterologe Expression vonnöten sein. Eventuell ist auch die Cluster-eigene PPTase (SupC) nicht funktionell gewesen. Als Konsequenz daraus könnte im ungünstigsten Fall der *supA*-ORF ein Pseudogen sein.

## E 1.2 SupA-PKS – *In-vitro*-Studien

Der gesamte ORF der *supA*-PKS (Abb. 27) sollte für *In-vitro*-Studien heterolog in *E. coli* und *S. albus* überexprimiert werden. Zusätzlich sollten *In-vitro*-Studien mit separat überexprimierten SupA-Domänen (z. B. KS, AT, ACP; Abb. 28) Einsichten in die Biosynthese dieser neuartigen PKS liefern.

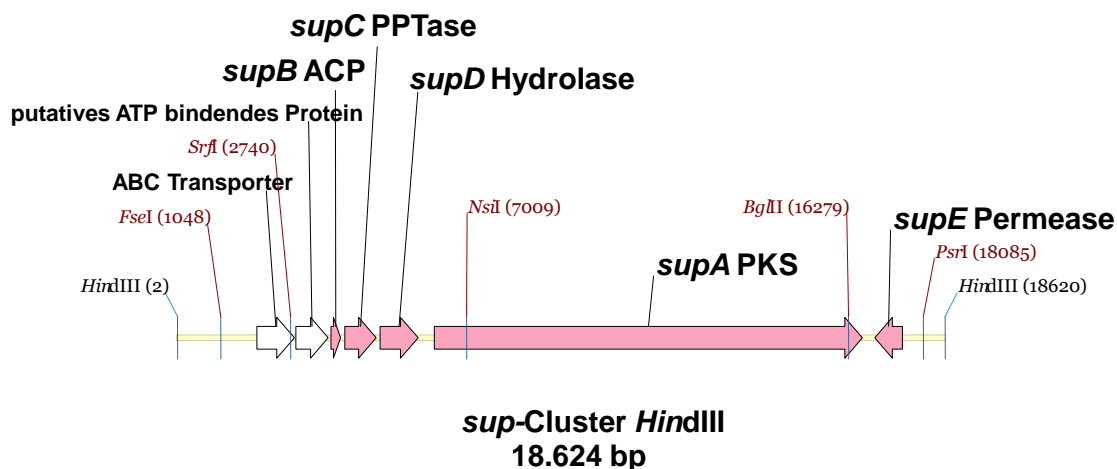


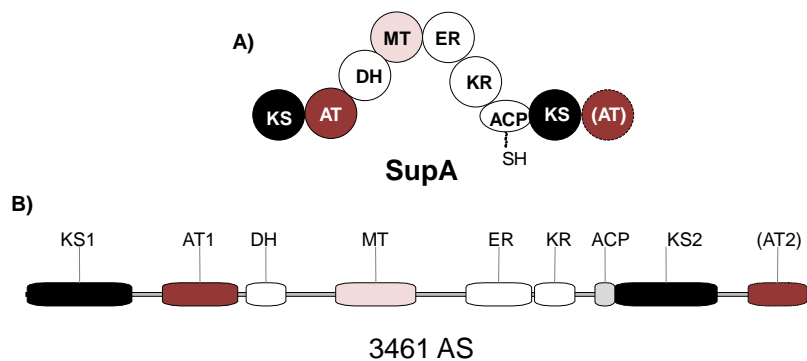
Abb. 27: HindIII-Fragment von pSW1H8 mit dem *sup*-Cluster. Identisch mit dem Insert von pTH27 (18,6 kb)

### E 1.2.1 SupA als Multienzym

Die SupA-PKS sollte *in silico* analysiert, heterolog exprimiert und das Protein massenspektrometrisch, sowie biochemisch mit  $^{14}\text{C}$ -CoA-markierten Vorläufersubstanzen untersucht werden.

#### *in silico* Analyse der SupA-PKS

Die große modulare Typ-I-PKS SupA (**Abb. 28**) besteht aus 3.462 Aminosäuren (AS). In der geplanten exprimierten His8-Tag-Form sind es 3.485 AS bei einer Masse von ~371 kDa.



**Abb. 28:** Domänenorganisation von SupA. **A)** Schematische Darstellung eines Monomers im Kugelmodell. **B)** Maßstabsgerechte Darstellung der Domänenanordnung auf einem Monomer. Die eingeklammerte AT-Domäne ist wahrscheinlich nicht funktionell. Abkürzungen siehe Legende **Abb. 7**.

Der berechnete isoelektrische Punkt der exprimierten PKS liegt bei pH 5,05. Der GC-Gehalt beträgt 66,5% und liegt damit zwischen dem von *E. coli* (~51%) und *S. albus* (~72%). Der Codongebrauch weicht im Mittel 14,7% von *E. coli* ab. Vor allem die Codons CGG, GAG und TCG werden im Vergleich zu *E. coli* wesentlich häufiger gebraucht (Anhang Abb. 52).

Eine BLAST-Analyse ("blastp") ergab 68% Identität auf AS-Ebene mit der nächsthomologen SupA Sequenz des nichtkultivierten Bakteriums 2063G<sup>[13]</sup> aus dem Schwamm *P. clavata* (**Tab. 1**, siehe C 5.2.1). Die nächsten Homologen PKS außerhalb von Schwammsymbionten waren mit 34% Identität eine PKS/NRPS aus dem Cyanobakterium *Cyanothece* sp. (YP\_001804493.1) laut "blastp", bzw. mit 38% Identität die Soraphen-PKS A aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* (AAK19883) laut „NCBI distance tree“. Der mit SupA nächstverwandte biochemisch charakterisierte "blastp"-Treffer war JamJ aus dem Cyanobakterium *Lyngbya majuscula* mit 34% AS-Identität. JamJ ist ein Modul

der Jamaicamid-PKS/NRPS, das wie SupA eine MT enthält, um eine Methylgruppe in die Polyketidkette einzufügen.<sup>[21]</sup>

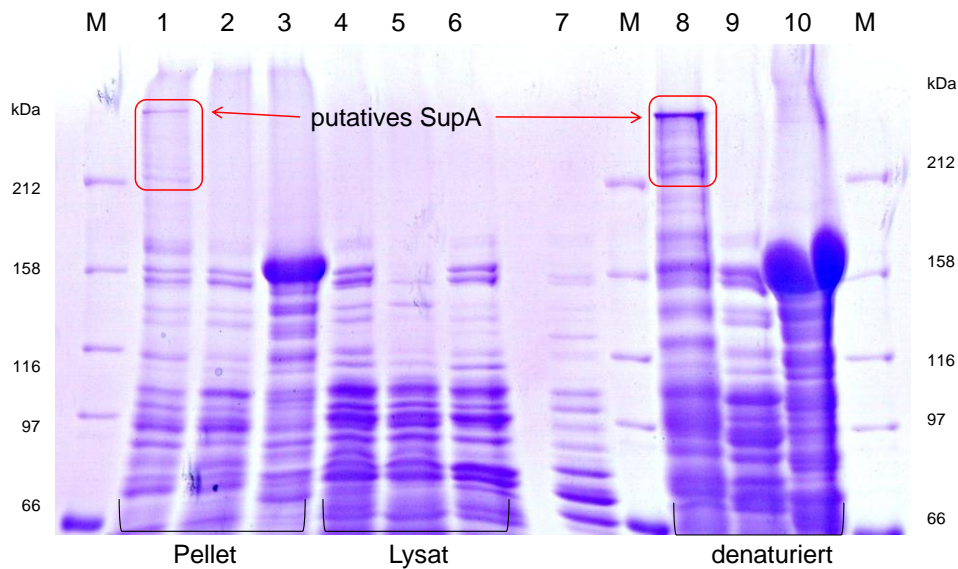
**Tab. 1:** "blastp"-Treffer für SupA (gb|ABE03935.1).

Genbanknummer	Organismus	Position/AS	ident./posi. <sup>[a]</sup>	E-Wert <sup>[b]</sup>
gb ABB73286.1  putative PKS	<i>P. clavata</i> , uncultured bacterium 2063G	10-3416/3419	68/78	0.0
gb ABE03895.1  PKS	<i>A. aerophoba</i> , bacterial symbiont clone pAE27P20	13-3244/3248	64/76	0.0
gb ACX49735.1  SupA	<i>A. aerophoba</i> , uncultured marine bacterium 1k6	18-3453/3453	62/73	0.0
<sup>[a]</sup> identische AS/ positive AS [%]; <sup>[b]</sup> "Expect"-Wert.				

### Proteinexpression von *supA* in *E. coli*

Der gesamte ORF von *supA* wurde sowohl mit als auch ohne *svp*-Gen in Form eines His8-Fusionsproteins in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Dazu wurde zunächst *supA* in den Expressionsvektor pHIS8-Svp kloniert um das Plasmid pTH23 zu erhalten. Um dieses Plasmid ohne das *svp*-Gen zu erhalten, wurde dieses mit *Sfi*I herausgeschnitten und das resultierende Plasmid als pTH23*apo* bezeichnet (siehe F 2.13.2). Nach der Proteinexpression wurden die Proteine mit der Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Ohne Verwendung zusätzlicher Chaperone befand sich das Protein nur im Zellpellet, vermutlich in Form von unlöslichen Einschlusskörpern (**Abb. 29**). Außerdem zeigten die SDS-Polyacrylamid-Gele nicht eine einzelne Bande, sondern mehrere, was auf Degradation durch Proteasen hindeutet. Die Größe des gebildeten Proteins war deutlich über der höchsten Bande des Markers (212 kDa) und könnte im Bereich von SupA liegen (368 kDa), was aber bei der Verwendung dieser Gele nicht genau abgeschätzt werden kann (**Abb. 29**). Daher wurde versucht, mit anderen Methoden die Identität des gebildeten Proteins zu beweisen.

Die Verwendung anderer Wirtsstämme (*E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL, *E. coli* Rosetta-gami®2(DE3)plysS) zeigte keine anderen Ergebnisse (ohne Abb.).

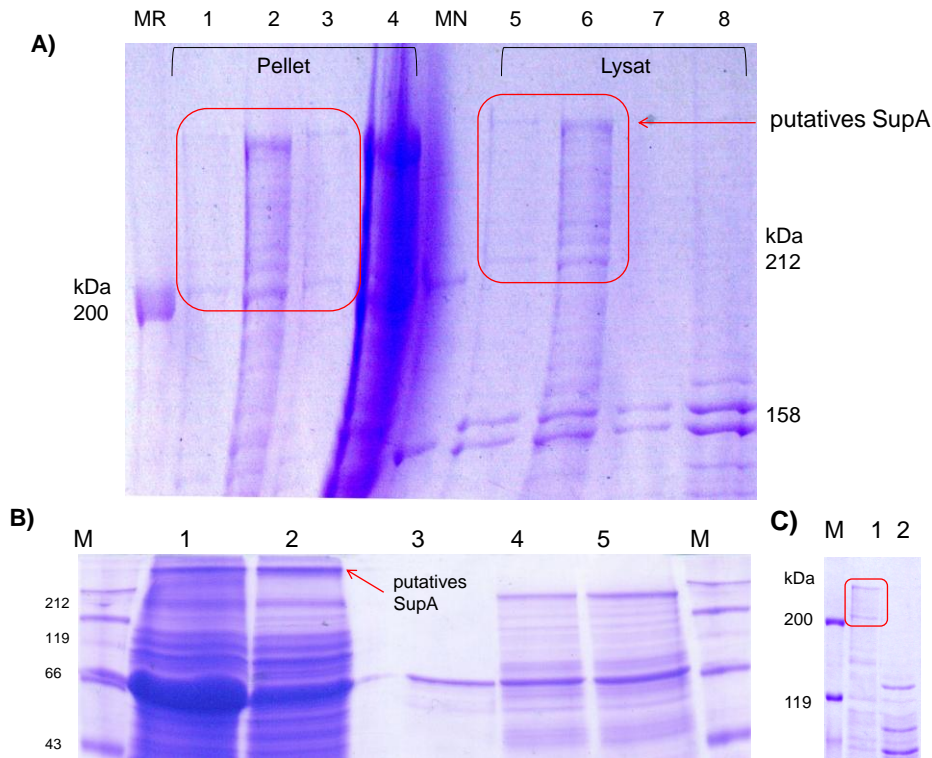


**Abb. 29:** Proteinexpression von SupA. 8% SDS-PAGE. Alles pTH23 (mit *svp*), außer 3, 6, 10, pHN10 (anderes Protein von 162 kDa in demselben Vektor). 1, pTH23 induziert, Pellet; 2, pTH23 uninduziert, Pellet; 3, pHN10 induziert, Pellet; 4, pTH23 induziert, Lysat; 5, pTH23 uninduziert, Lysat; 6, pHN10 induziert, Lysat; 7, pTH23 Eluat von Ni-NTA-Säule; 8, pTH23 induziert, denaturiertes Lysat; 9, pTH23 uninduziert, denaturiertes Lysat; 10, pHN10 induziert, denaturiertes Lysat. Kultivierung/Aufbereitung: 100 mL LB + Kan<sup>50</sup>, *E. coli* BL21(DE3), induziert mit 1 mM IPTG, 22 h bei 16 °C; 4 mL Lysepuffer.

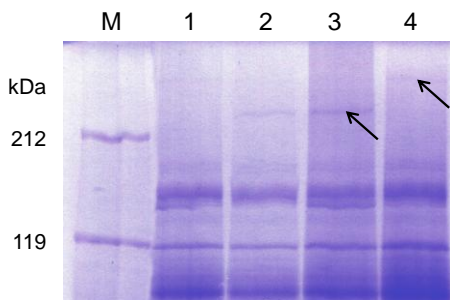
Erst die Koexpression mit Chaperon-Plasmiden lieferte lösliches putatives SupA Protein. Mit zwei der fünf getesteten Chaperon-Plasmide (pKJE7 und pTf16) wurden ähnliche Banden in den Proteinlysaten wie in den Pellets erzielt (**Abb. 30**).

Es war jedoch trotzdem nicht möglich, das Protein mit dem N-terminalen His8-Tag aufzureinigen (ohne Abb.).

Die Ursache könnte z. B. in einer ungünstigen Tertiärstruktur von SupA oder im Fehlen des N-Terminus des Proteins aufgrund von Protease-Tätigkeit gelegen haben. Daher wurde ein weiteres Expressionsplasmid (pTH63) konstruiert, das die genetische Information für ein C-terminal verkürztes SupA von 2443 AS (~275 kDa) enthielt (siehe F 2.13.2, Tab. 29). Jedoch konnte auch die verkürzte Version des SupA Proteins nicht mit Ni-NTA aufgereinigt werden (ohne Abb.), es zeigte sich allerdings in der SDS-PAGE der Proteinlysate der Expression von pTH63 eine schwache Bande oberhalb der 212 kDa-Bande des Markers (**Abb. 31**). Da die Bande unterhalb der größten Bande lag, die mit der Expression des vollständigen *supA*-Gens (pTH23) erzielt wurde, unterstützte dieses Ergebnis die Aussage, dass SupA exprimiert wurde, wenn auch in sehr geringer Konzentration.

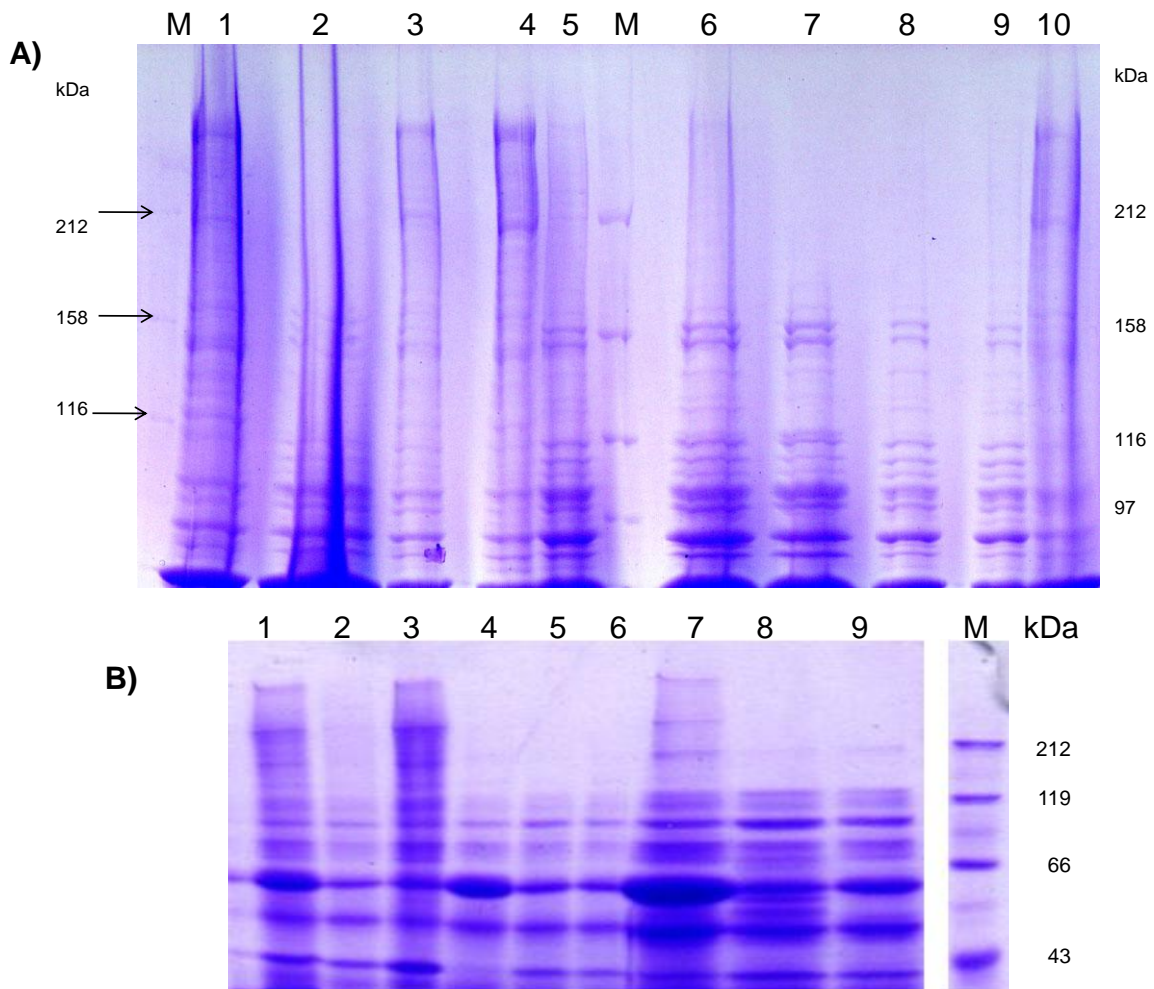


**Abb. 30:** Koexpression von pTH23 mit verschiedenen Chaperon-Plasmiden\*. **A)** 5% SDS-PAGE. **MR**, Rotimark Standard; **1**, pTH23/pKJE7 3 h, Pellet; **2**, pTH23/pKJE7 24 h, Pellet; **3**, pTH23/pTf16 3 h, Pellet; **4**, pTH23/pTf16 24 h, Pellet; **MN**, Broad Range Marker (NEB), **5-8**, Lysate von 1-4; **B)** 12% SDS-PAGE, **M**, Rotimark Standard; **1**, pTH23/pKJE7, Lysat, VivaSpin (Probe 18C); **2**, pTH23 $\alpha$ /pKJE7, Lysat, VivaSpin (Probe 18A); **3**, pHN10/pKJE7 VivaSpin nach Denaturierung (nur Chaperone); **4,5**, pHN10/pKJE7 VivaSpin. **C)** **M**, Marker Rotimark Standard, **1**, pTH26/pTf16, Lysat; **2**, pTH108, Lysat (Negativkontrolle). Kultivierung/Aufbereitung: *E. coli* BL21(DE3), 200 mL LB + Kan<sup>50</sup> + Cam<sup>25</sup> + 5 mM L-Arabinose zur Induktion der Chaperone, induziert mit 0,5/0,7 mM IPTG, inkubiert 64 h bei 16 °C, 2 mL Lysepuffer (MES). \*pKJE7 trägt die Chaperone DnaK (~70 kDa), DnaJ (~40 kDa) und GrpE (~22 kDa); pTf16 trägt das Chaperon Tf (~56 kDa).



**Abb. 31:** SDS-PAGE der SupA-Proteinexpression. pTH63 versus pTH23. 8% SDS-PAGE der Lysate. **M**, Rotimark Standard; **1**, pTH23 $_{holo}$  uninduziert; **2**, pTH63 uninduziert; **3**, pTH63 induziert; **4**, pTH23 induziert. Kultivierung/Aufbereitung: *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL, 200 mL LB, 0,5 mM IPTG, 24 h bei 11 °C, 245 rpm, 2 mL Lysepuffer (MES).

Mit den Plasmiden für die *in vivo* Expression, die den kompletten *sup*-Gencluster enthalten (z. B. pTH26, pTH27, pTH35), wurden dieselben Proteinbanden erzielt, wie mit den Expressionsplasmiden, die nur das *supA*-Gen enthalten (**Abb. 32**).



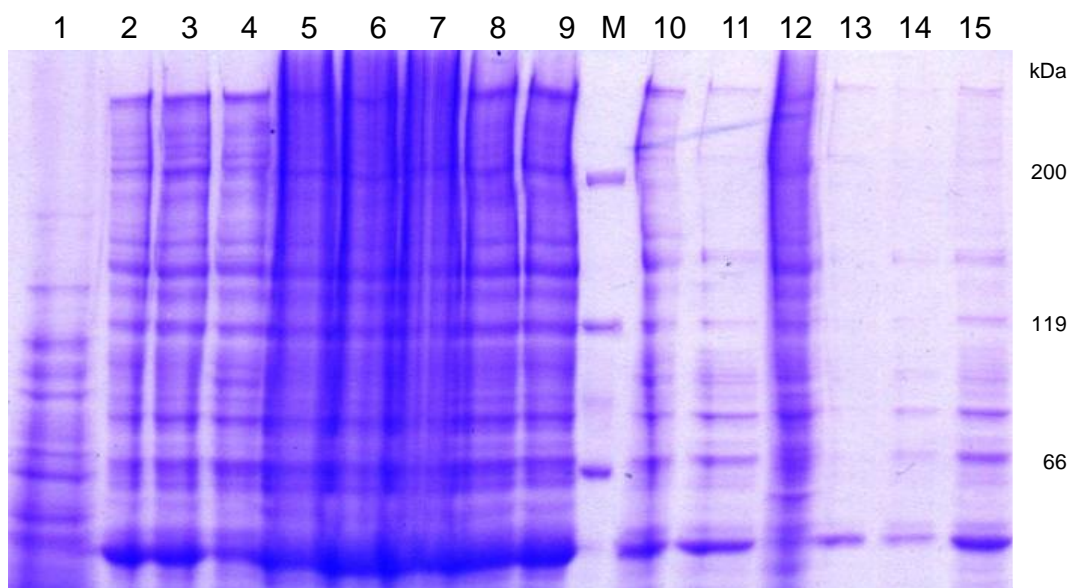
**Abb. 32:** SDS-PAGE der *in vivo* Expression des *sup*-Clusters in *E. coli* BL21(DE3). **A)** 5% SDS-PAGE. **M**, Broad Range Marker NEB, **1**, pTH26 Pellet; **2**, pTH27 Pellet; **3**, pTH35 Pellet; **4,5**, pTH23*holo*/pKJE7 Pellet; **6-10**, Lysate von 1-4. Kultivierung/Aufbereitung: 300 mL LB + Kan<sup>50</sup> + Cam<sup>25</sup> + 5 mM L-Arabinose, 1 mM IPTG, 16 h bei 16 °C, 30 mL Lysepuffer (MES), French Press. **B)** 7,5% SDS-PAGE. **1**, pTH26/pTf16 Pellet; **2**, pTH23*holo*/pTf16 Pellet; **3**, pTH23*apo*/pTf16 Pellet; **4-6**, Lysate von 1-3; **7-9**, aufkonzentrierte Lysate von 4-6; **M**, Rotimark Standard. Kultivierung/Aufbereitung: 200 mL LB + Kan<sup>50</sup> + Cam<sup>25</sup> + 5 mM L-Arabinose, 25 h bei 16 °C, 0,7 mM IPTG, 1 mL Lysepuffer (MES). Informationen zu den Chaperon-Plasmiden in Abb. 30.

### Aufkonzentrierung von SupA

In weiteren Versuchen sollte das Protein SupA mit anderen Methoden als der His-Tag-Affinitätschromatographie aufkonzentriert und aufgereinigt werden. Da die PKS wesentlich größer ist, als sämtliche *E. coli*-eigenen Proteine, sollte es möglich sein, die Banden zu lokalisieren und nach Aufkonzentrierung (z. B. durch Fällung) auch zu isolieren.

Eine Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (Start: 50mM NaCl, Ende: 1M NaCl, pH 5,2) scheiterte an der spontanen Ausfällung von SupA in der geringen Anfangskonzentration an Salz. Eine mit FPLC in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis (AK) M. Famulok durchgeführte Gelfiltration (Säule: Superdex 200) lieferte zwar eine geringe Proteinmenge, aber die Reinheit war gegenüber dem Ausgangsprodukt nicht deutlich höher, wohingegen die Konzentration noch viel geringer war als vorher. Im Ergebnis konnte also nicht selektiv genug nach Proteingröße aufgereinigt werden.

Zur nativen Aufkonzentrierung der Proteinlysate und -Fraktionen wurde, neben einfachem Eindampfen in der SpeedVac und Ammoniumsulfatfällung (**Abb. 33**), vor allem die Filtrierung durch VivaSpin-Zentrifugaleinheiten erfolgreich angewendet (siehe F 3.1.5). Diese Membranfilter haben den Vorteil, dass sie Proteine nicht nur aufkonzentrieren, sondern in gewissen Grenzen auch aufreinigen und entsalzen können. Eine weitere Methode zur Aufkonzentrierung von Proteinlysaten war die denaturierende Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) (siehe F 3.1.5).



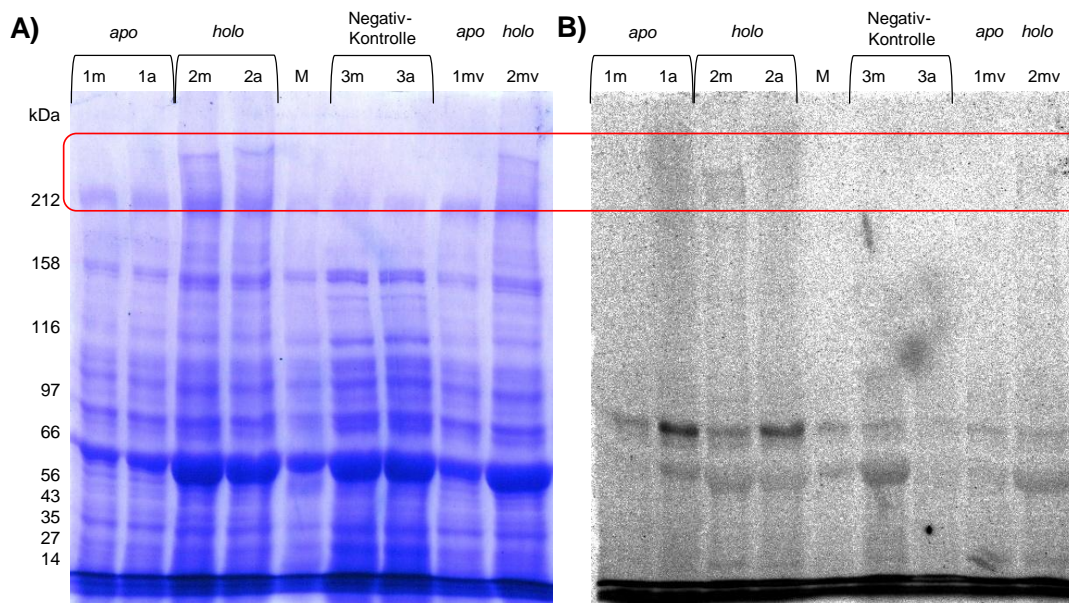
**Abb. 33:** Aufkonzentrierung von SupA durch Ammoniumsulfatfällung. 5% SDS-PAGE. **1**, Negativkontrolle *S. albus* TH3 Lysat gefällt; **2,3,8**, pTH23apo/pTf16 Pellet; **4,6,9**, pTH23/pTf16 Pellet; **5,7,10**, pTH26/pTf16 Pellet; **M**, Rotimark Standard; **11**, pTH26/pTf16 Lysat gefällt; **12**, pTH23holo/pTf16 Lysat gefällt; **13**, pTH23apo/pTf16 Lysat gefällt; **14,15**, pTH23/pTf16 Lysat. Kultivierung/Aufbereitung: *E. coli* BL21(DE3), 200 mL LB + Kan<sup>50</sup> + Cam<sup>25</sup> + 5 mM L-Arabinose, induziert mit 0,5 mM IPTG, ü/N bei 16 °C; für Fällung: 25 mL Lysepuffer (MES), French Press, plus 10 g Ammoniumsulfat; für Lysate ohne Fällung: 2 mL Lysepuffer (MES). ü/N, über Nacht. Informationen zu den Chaperon-Plasmiden in Abb. 30.



## Verifizierung der Gelbanden als SupA

### Radio-SDS-PAGE von SupA

Für den Nachweis der Funktionalität der SupA-PKS wurde eine Radio-SDS-PAGE mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Substrat durchgeführt. Hierfür erfolgte die Inkubation des Proteinlysates mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Malonyl-CoA (**34**) und Acetyl-CoA (**33**). Die Detektion einer Substratübertragung erfolgt dann mittels eines Radiogramms. Ein Ergebnis diverser Experimente war ein äußerst schwaches Signal (**Abb. 34 B** Spuren 2m und 2mv).



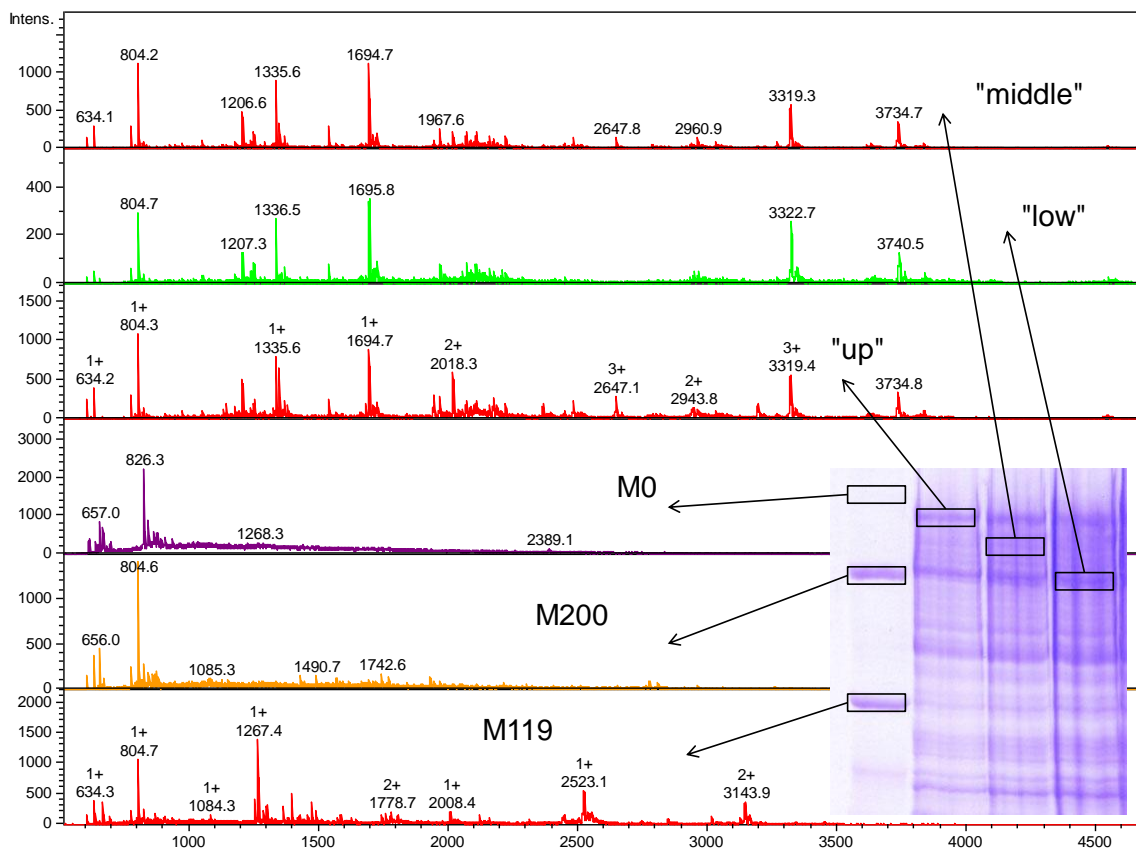
**Abb. 34:** Radio-SDS-PAGE von SupA nach  $^{14}\text{C}$  Malonyl-CoA, bzw.  $^{14}\text{C}$  Acetyl-CoA Markierung. **A)** 8% SDS-PAGE. **1,** pTH23 $_{apo}$ /pKJE7 (Probe 18A); **2,** pTH23/pKJE7 (*holo*, Probe 18C); **3,** Negativkontrolle (nur pKJE7, Probe 18F); **M,** Broad Range Marker NEB; **m,** Malonyl-CoA; **a,** Acetyl-CoA; **mv,** Malonyl-CoA-Inkubation nach VivaSpin Aufkonzentrierung. **B)** Radiogramm von A). Kultivierung/Aufbereitung: *E. coli* BL21(DE3), 200 mL LB + Kan<sup>50</sup> (außer 18F) + Cam<sup>25</sup> + 5 mM L-Arabinose, induziert mit 0,7 mM IPTG, 64 h bei 16 °C; 1 mL Lysepuffer. PKJE7 trägt die Chaperone Dnak (~70 kDa), DnaJ (~40 kDa) und GrpE (~22 kDa).

Trotz der Schwäche der Signale (Spur 1a, 2m, 2a, 2mv in **Abb. 34.**) sind deutliche Unterschiede zwischen den Spuren mit  $^{14}\text{C}$ -Acetyl- (**33**) und  $^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA (**34**)-Markierung, sowie zwischen der *apo*- und der *holo*-Form von SupA ersichtlich. Die Spuren 1a und 2a [ $^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA (**33**)] weisen eine sehr diffuse Markierung auf; die Spuren 2m und 2mv [ $^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA (**34**)] zeigen eher deutlich abgegrenzte Banden, wenn auch nur schwacher Ausprägung. Die abgegrenzten Banden fanden sich nur bei der *holo*-Form von SupA. Die jeweils stärksten Signale wurden in Proteinen mit geringerer Masse als erwartet detektiert, die möglicherweise Abbauprodukte des großen Gesamtproteins

darstellen. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt, eindeutige Ergebnisse konnten jedoch nicht erzielt werden.

### Massenspektrometrie von SupA

Um Näheres über die Identität der putativen SupA-Banden zu erfahren, wurden drei Bereiche der gegenüber der Negativkontrolle neu gebildeten großen Proteinbanden aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und mit MALDI/MS und ESI/MS gemessen (**Abb. 35**, Anhang Abb. 29).



**Abb. 35:** Tryptischer In-Gel-Verdau von SupA. MALDI-Spektren. "up", "middle", "low", Spektren dreier verschiedener Bereiche von SupA (siehe eingefügtes 8% SDS-PAGE-Foto), wobei der unterste Bereich ("low") einer Größe von ~200 kDa entspricht; **M0**, Proteinfreies Gelstück (Negativkontrolle); **M200**, 200 kDa-Bande des Rotimark Standards; **M119**, 119 kDa-Bande des Rotimark Standards.

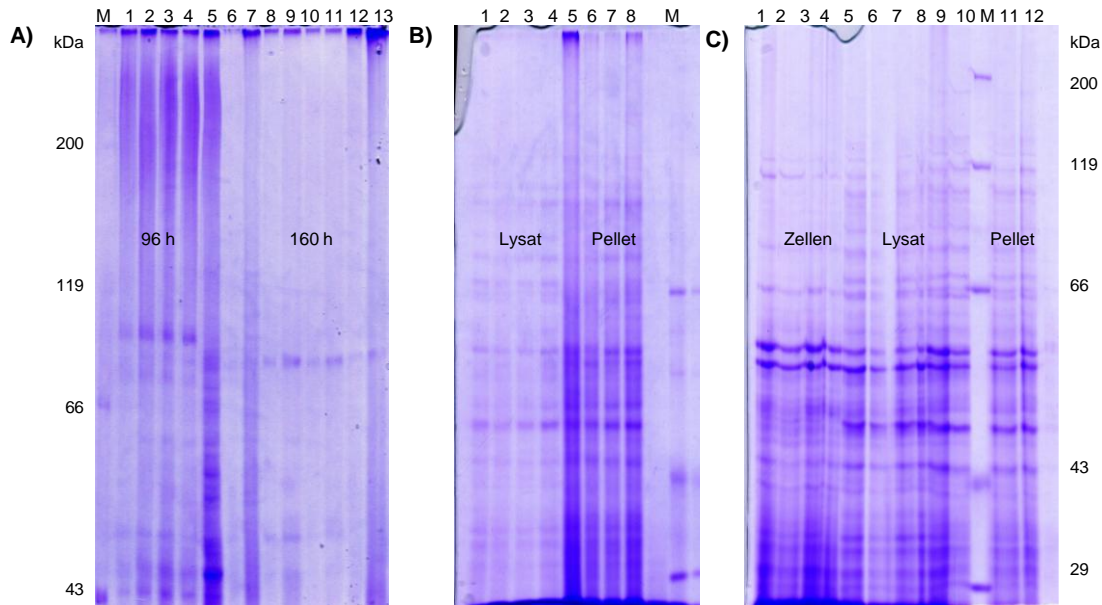
Da bei dieser Methode generell sehr viele Ionen zu messen sind, die oft nicht zu dem zu untersuchenden Protein gehören, wurden drei Kontrollen zum Vergleich analysiert (M0, M200, M119 in **Abb. 35**). Es konnte festgestellt werden, dass die drei aus dem Gel ausgeschnittenen Bereiche ("up", "middle", "low" in **Abb. 35**), die als SupA bzw. Abbauprodukte von SupA vermutet wurden, nahezu identische Spektren aufweisen (die von den Negativkontrollen verschieden sind) und folglich

von ein und demselben Protein herrühren. Eventuelle Unterschiede zwischen den Proteinen, die die Ursache der verschiedenen Bandengrößen im SDS-PAGE sein müssen, konnten mit dieser Methode nicht ermittelt werden.

Die zweite Frage, die die MALDI/MS-Daten beantworten sollten, war, ob das gebildete Protein auch wirklich SupA ist. Hierzu wurden die gemessenen Massen mit dem Freeware-Programm PAWS ausgewertet (Anhang Abb. 19). Das Programm vergleicht die gemessenen Massen mit denen, die aufgrund der AS-Sequenz eines Proteins für einen Verdau mit Trypsin errechnet wurden. Da es aufgrund der großen Größe des Proteins sehr viele errechnete Fragmente gab und die Messtoleranz von MALDI-Messungen relativ hoch ist, trat das Problem falsch positiv zugeordneter gemessener Massen auf. Eine zweite Schwierigkeit besteht in dem Auftreten mehrerer gemessener Massen für dasselbe Fragment durch unterschiedliche Protonierungsgrade. Im Ergebnis kann jedoch konstatiert werden, dass die MALDI/MS Massen das gesamte SupA Protein abdeckten und eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den gemessenen und den berechneten Massen bestand. Zur Kontrolle wurden dieselben gemessenen Massen mit den errechneten Fragmenten für eine andere PKS (auf pHN10, 162 kDa) verglichen. Es konnten nur 10 von den 26 Massen der anderen PKS zugeordnet werden, die auch für die SupA Sequenz gepasst haben (Anhang Abb. 20). Das bestätigt die Aussage, dass das exprimierte Protein auch wirklich SupA ist, wenn auch möglicherweise in einem nicht ganz vollständigem Zustand.

### **Proteinexpression von SupA in *S. albus***

Auch in *S. albus* sollte versucht werden, die komplette SupA-PKS zu überexprimieren. Dazu wurde der Stamm *S. albus* TH3 erzeugt, der die genetische Information für das mit einem N-terminalem His6-Tag versehene SupA unter der Kontrolle des konstitutiven *PermE\**-Promotors enthält (siehe F 2.13.2). Jedoch konnten nach Kultivierung von *S. albus* TH3 in den SDS-Polyacrylamidgelen keine neuen Proteinbanden detektiert werden (**Abb. 36**). Die diffusen Signale an möglicherweise hochmolekularem Protein >200 kDa (**Abb. 36 A** Spuren 1-5) konnten nicht reproduziert, bzw. als SupA identifiziert werden. Auch die Kulturen der für die *in vivo* Expression des *sup*-Clusters erzeugten Stämme *S. albus* TH1 und TH3 wurden mit SDS-PAGE analysiert. Aber auch hierbei konnten keine Unterschiede zur Negativkontrolle gefunden werden (**Abb. 36 B, C**).



**Abb. 36:** Proteinexpression von SupA in *S. albus*. **A)** *S. albus* TH3 (SupA). 8% SDS-PAGE. **1-5**, 96 h Kultivierung, **6-13**, 160 h Kultivierung; **M**, Rotimark Standard; **1**, Pellet; **2**, Lysat; **3**, Lysat konz.; **4**, Lysat konz. und 15 min bei 65 °C inkubiert; **5**, Lysat konz. und 5 min bei 99 °C inkubiert; **6**, Pellet; **7**, Pellet 5 min bei 99 °C inkubiert; **8**, Lysat; **9**, Lysat konz.; **10**, Lysat 15 min bei 65 °C inkubiert; **11**, Lysat konz. und 15 min bei 65 °C inkubiert; **12**, Lysat 5 min bei 99 °C inkubiert; **13**, Lysat konz. und 5 min bei 99 °C inkubiert. **B)** 7,5% SDS-PAGE. 72 h Kultivierung. **1**, *S. albus* TH1 Zellen; **2**, *S. albus* TH2 Zellen; **3**, *S. albus* TH3 Zellen; **4**, *S. albus* ME5 Zellen (Negativkontrolle); **5-8**, Pellets von 1-4. **M**, Rotimark Standard. **C)** 7,5% SDS-PAGE. 96 h Kultivierung. **1**, *S. albus* TH1 Zellen; **2**, *S. albus* TH2 Zellen; **3**, *S. albus* TH3 Zellen; **4**, *S. albus* ME5 Zellen (Negativkontrolle); **5-8**, Lysate von 1-4; **M**, Rotimark Standard; **9-12**, Pellets von 1-4. Kultivierung/Aufbereitung: 30 mL LB + Apr<sup>70</sup> + NaI<sup>25</sup>, 48 h bei 27 °C, plus 270 mL LB + Apr<sup>50</sup>, davon 100 mL geerntet nach 72 h, 100 mL nach 96 h und 100 mL nach 160 h bei 27 °C, 35 mL Lysepuffer, French Press.

### E 1.2.2 SupA<sub>KS1</sub>

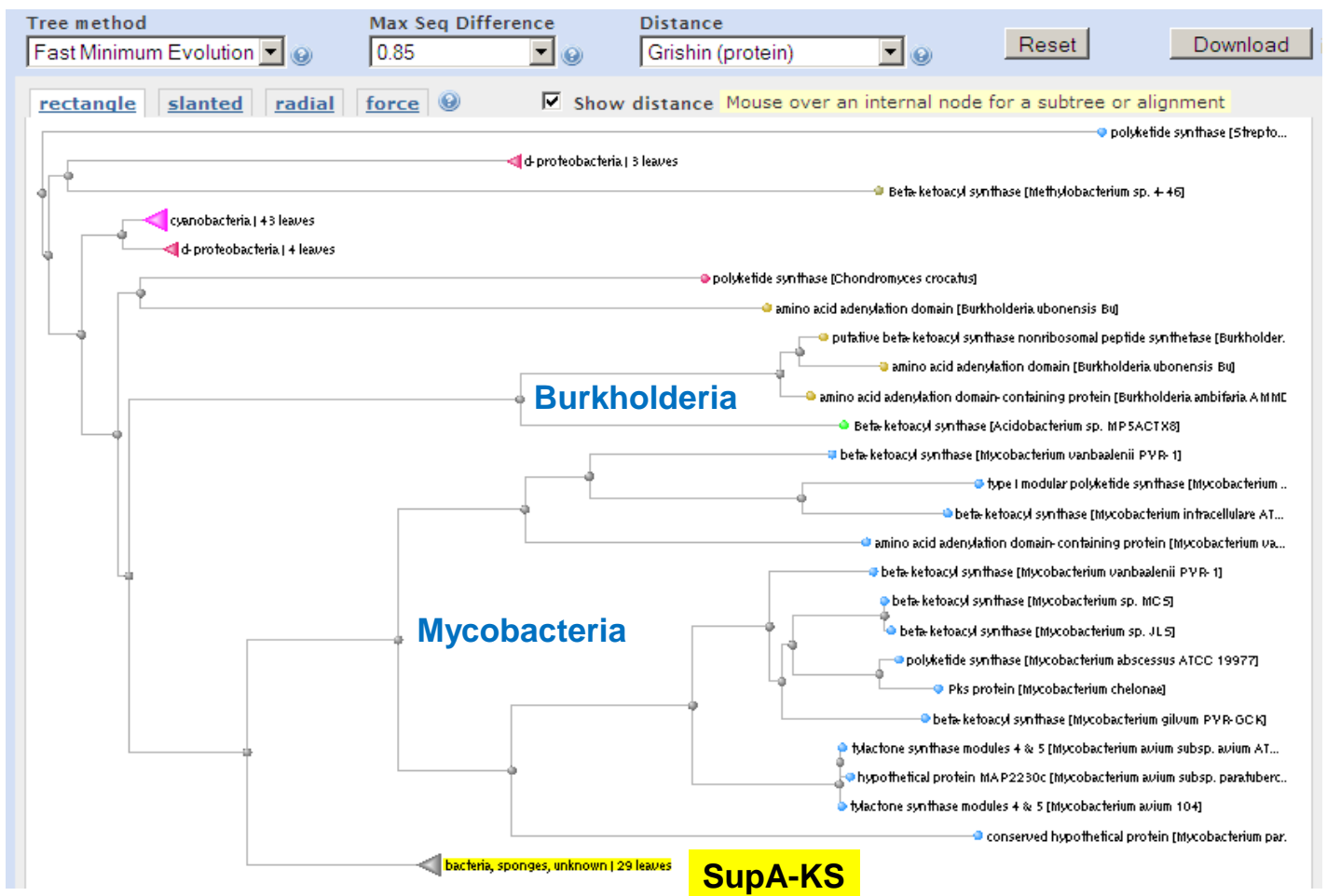
Die erste KS-Domäne (KS1) der SupA-PKS sollte als His8-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert werden.

#### *In silico* Analyse von SupA<sub>KS1</sub>

Die SupA<sub>KS1</sub> ist eine  $\beta$ -Ketoacylsynthase aus der Superfamilie „kondensierende Enzyme (cl09938)“. Nach Alinierung (Anhang Abb. 12) mit anderen biochemisch charakterisierten KS-Domänen wurde ein Bereich von 458 AS zur Klonierung festgelegt. Durch den zusätzlichen His8-Tag, der durch Klonierung in den Expressionsvektor pHIS8 N-terminal angefügt wird (siehe F 2.13.2), hat das überexprimierte Protein 481 AS und ein Molekulargewicht von 50,5 kDa. Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,83.

Die "blastp"-Analyse der KS-Domäne ergab, dass, wie erwartet, die KS-Domänen der anderen *supA*-Vertreter (siehe C 5.2.1) die nächsten Homologen sind. Der nächstliegende "blastp"-Treffer außerhalb von Sequenzen aus

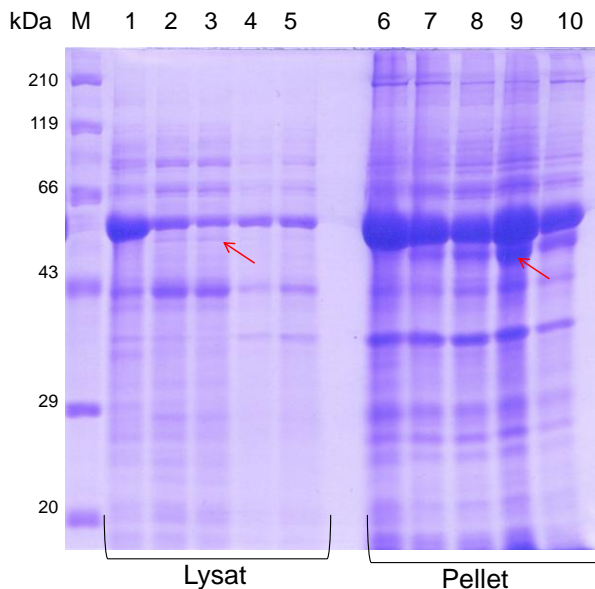
Schwammsymbionten war die KS-Domäne der PKS/NRPS ORF9 aus *Burkholderia contaminans* (gb|ACN32489.1 mit einem E-Wert  $2e-122$  und 52% AS-Identität). Dieser Stamm produziert das stark fungizide, mit Zuckerrest versehene Oligopeptid Occidiofungin.<sup>[231]</sup> Danach folgt eine KS aus *Mycobacterium vanbaalenii* (gb|ABM11841.1, E-Wert  $2e-121$ , 53% AS-Identität) und das „Pks-Protein“<sup>[232]</sup> aus *Mycobacterium abscessus* (gi|146760179,  $2e-120$ , 54% Identität) und viele andere KS-Sequenzen aus den unterschiedlichsten Bakterien mit ~50% AS-Identität. Das „Pks-Protein“ ist in vielen pathogenen Mykobakterien verbreitet und befindet sich in einem Gencluster zur Produktion von Glycopeptidolipiden (GPL), wobei es an der Biosynthese der Fettsäurekette beteiligt ist.<sup>[232]</sup> Laut „NCBI distance tree“ bilden die mykobakteriellen KS eine Schwestergruppe zu den SupA-KS (Abb. 37).



**Abb. 37:** Stammbaum der AS-Sequenzen der vollständigen KS-Domänen. Erstellt online mit "NCBI distance tree" mit der SupA<sub>KS1</sub> als Abfragesequenz.

### Proteinexpression der SupA<sub>KS1</sub>

Eine Überexpression der SupA<sub>KS1</sub> als His8-Fusionsprotein konnte im Stamm *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL erfolgreich durchgeführt werden (**Abb. 38**). Da jedoch Enzymassays mit der SupA<sub>KS1</sub> aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden konnten, wurde auch auf eine Optimierung der Expression und Aufreinigung des Enzyms verzichtet. Die Überexpression der Didomäne aus SupA<sub>KS1</sub> und SupA<sub>AT1</sub>, die auch die enzymatische Funktion der KS1 enthält, gelang außerdem in etwas höherer Ausbeute (siehe nächster Abschnitt). Chen *et al.* berichteten ebenfalls, dass sich die KS-AT Didomäne der DEBS wesentlich besser in *E. coli* überexprimieren ließ, als die einzelnen Domänen, vermutlich aufgrund der durch Linker vermittelten Dimerisierung der Enzyme.<sup>[5]</sup>



**Abb. 38:** Proteinexpression von SupA<sub>KS1</sub>. pTH127 (KS1), 50,5 kDa. **M**, Rotimark Standard; **1-5**, Lysate; **1**, uninduziert; **2**, 0,1 mM IPTG 18 h; **3**, 1 mM IPTG 18 h; **4**, 0,1 mM IPTG 42 h; **5**, 1 mM IPTG 42 h; **6-7**, Pellets von 1-5. Kultivierung: Kleinmaßstab: 3 mL *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL, bei 11 °C, 245 rpm, 100 µL Lysepuffer.

### E 1.2.3 SupA<sub>AT1</sub> und SupA<sub>KS-AT1</sub>

Für *In-vitro*-Studien sollten die erste AT-Domäne (AT1) bzw. die KS-AT1-Didomäne der SupA-PKS als His8-Tag-Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert werden.

#### *In silico* Analyse von SupA<sub>AT1</sub>

Die SupA<sub>AT1</sub> ist eine AT der “Acyltransferase\_1” Superfamilie (c108282). Nach Alinierung mit biochemisch charakterisierten AT-Domänen wurde ein Bereich von 470 AS zur Klonierung festgelegt (Anhang Abb. 13). Durch den zusätzlichen His8-Tag, der durch Klonierung in den Expressionsvektor pHIS8 N-terminal

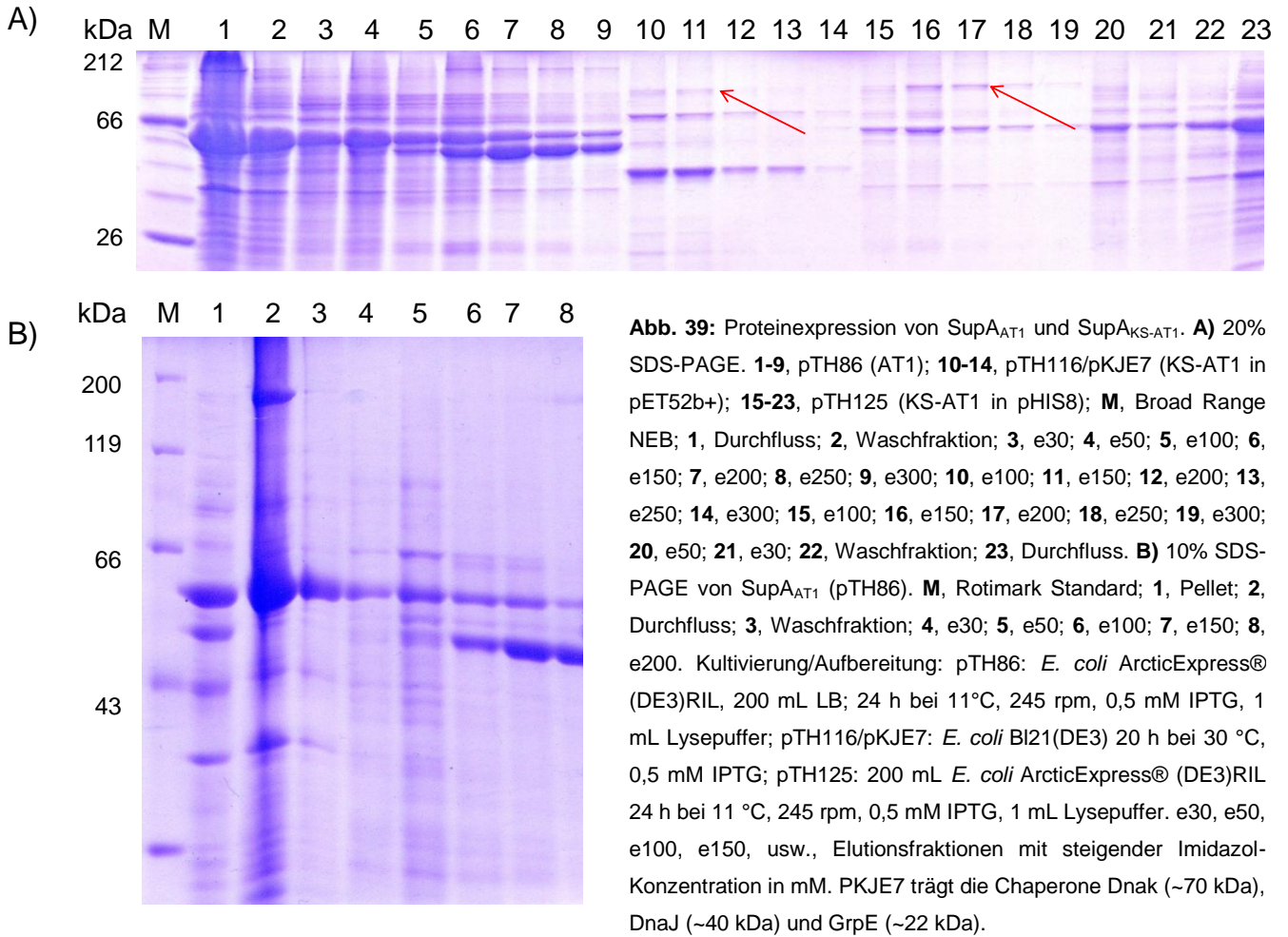
angefügt wird (siehe F 2.13.2), besteht das überexprimierte Protein aus 493 AS und hat ein Molekulargewicht von 52,8 kDa. Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei pH 6,15.

Die "blastp"-Analyse der AT-Domäne ergab, dass, wie erwartet, die AT – Domänen der anderen SupA Enzyme die nächsten Homologen sind. Dabei bestand im Falle der SA1\_PKS genau wie bei der SupA<sub>KS1</sub> die größte Ähnlichkeit nicht zu SA1\_PKSC (dem SupA-Modul, siehe Abb. 18), sondern zu SA1\_PKSA, gefolgt von SA1\_PKSB. Alle weiteren "blastp"-Treffer hatten ähnlich hohe E-Werte (> e-100) und damit geringe Ähnlichkeiten und AS Identitäten (<50%).

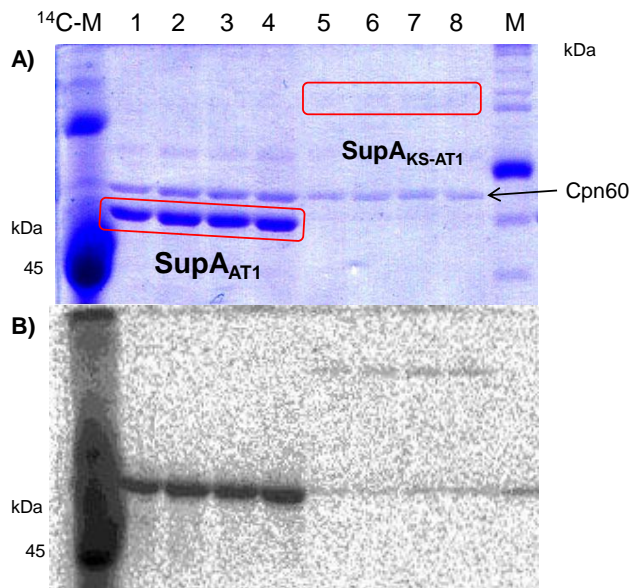
Die AS 786-789 von SupA bilden ein wichtiges Motiv für die Wahl des Substrates der SupA<sub>AT1</sub>. Im Falle der SupA<sub>AT1</sub> lautet dieses Motiv RAFH, woraus sich als Substrat der SupA<sub>AT1</sub> auf Malonyl-CoA (**34**) schließen lässt.<sup>[233]</sup> Der Histidinrest ist stark konserviert (entspricht His-201 in *E. coli* FabD), und besonders der Größenunterschied der Seitenketten der vorangehenden AS (im Falle von SupA ist es Phenylalanin) bestimmt, welches Substrat gewählt wird. Im Falle von Malonyl-CoA (**34**) ist es stets Phenylalanin (Motive [HTVY]AFH), bei Methylmalonyl-CoA (**35**) immer ein Serinrest (Motive [YVW]ASH), und im Falle von Ethylmalonyl-CoA ist es oft ein Glycinrest (Motive TAGH, VAGH oder CPTH).<sup>[233]</sup> Es gibt auch sogenannte Hybridmotive, z. B. HASH, das eine Mischung aus HAFH und YASH darstellt. Dieses Motiv gibt einen Hinweis darauf, dass die entsprechende AT sowohl Malonyl- als auch Methylmalonyl-CoA als Substrat verwendet.<sup>[234]</sup> Ein anderes Motiv, das RVDVVQ-Motiv, ist in der SupA<sub>AT1</sub> nicht vorhanden, was ebenfalls gegen eine Verwendung von Methylmalonyl-CoA (**35**) spricht. Weiterhin ist bei der SupA<sub>AT1</sub> in dem GHSxG-Motiv das x ein V (Valin), also eine verzweigte hydrophobe AS, was auch für die Verwendung von Malonyl-CoA (**34**) als Substrat spricht. In ATs, die Methylmalonyl-CoA (**35**) verwenden, ist das x im obengenannten Motiv ein weniger voluminöser AS-Rest.<sup>[97]</sup>

### **Proteinexpression der SupA<sub>AT1</sub> und SupA<sub>KS-AT1</sub>**

Sowohl die SupA<sub>AT1</sub> als auch die SupA<sub>KS-AT1</sub>-Didomäne wurden als His8-Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert. Die Didomäne hat eine Größe von ~103 kDa [50,5 kDa (KS1) plus 52,8 kDa (AT1)] (**Abb. 39**).



Sowohl die SupA<sub>AT1</sub> als auch die SupA<sub>KS-AT1</sub> ließen sich mit <sup>14</sup>C-Malonyl-CoA (**34**) markieren (**Abb. 40**). Dies bedeutet, dass die SupA PKS Malonyl-CoA (**34**) als Baustein der Biosynthese verarbeiten kann. Näheres dazu wird im Abschnitt E 1.5.2 erläutert.





### E 1.2.4 SupA<sub>MT</sub>

Die MT-Domäne der SupA-PKS sollte als His8-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert werden.

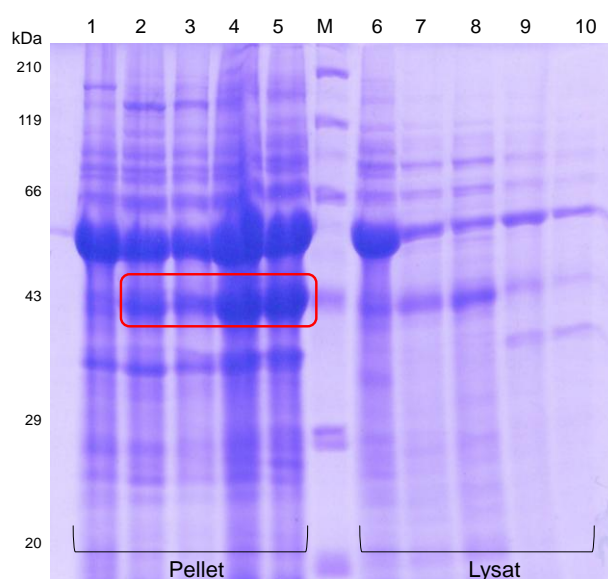
#### *In silico* Analyse von SupA<sub>MT</sub>

Die SupA<sub>MT</sub> ist eine MT der Superfamilie SAM-abhängiger Methyltransferasen (pfam08242). Nach Alinierung mit biochemisch charakterisierten MTs wurde ein Bereich von 351 AS für die Expression festgelegt (Anhang Abb. 14). Als His8-Tag Fusionsprotein hat die SupA<sub>MT</sub> 575 AS bei einer Masse von 40,6 kDa und einem berechneten isoelektrischen Punkt von pH 5,16.

Die "blastp"-Analyse der MT-Domäne ergab die MT-Domänen der anderen SupA Enzyme als nächste Homologe mit 74% bis 55% AS-Identität und E-Werten von 2e-145 bis 3e-99. Danach folgten mit E-Werten von 2e-66 bis ~e-40 eine Gruppe von MT aus ausschließlich cyanobakteriellen PKS/NRPS (alle ~40% AS-Identität).

#### Überexpression der SupA<sub>MT</sub>

Eine Überexpression der SupA<sub>MT</sub> als His8-Tag-Fusionsprotein konnte im Stamm *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL erfolgreich durchgeführt werden (**Abb. 41**). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Proteinassays mit der MT aus zeitlichen Gründen erfolgen sollten, wurde auf eine Optimierung der Expression und Aufreinigung des Enzyms verzichtet.



**Abb. 41:** Überexpression von SupA<sub>MT</sub>. pTH129, 40,6 kDa. 15% SDS-PAGE. **1**, uninduziert; **2**, 0,1 mM IPTG, 18 h; **3**, 1 mM IPTG, 18 h; **4**, 0,1 mM IPTG, 42 h; **5**, 1 mM IPTG, 42 h. **M**, Rotimark Standard; **6-10**, Lysate von 1-5. Kultivierung: Kleinmaßstab: 3 mL *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL, bei 11 °C, 245 rpm, 100 µL Lysepuffer.

### E 1.2.5 SupA<sub>ACP</sub>

Das SupA<sub>ACP</sub> sollte sowohl in seiner *apo*- als auch in seiner *holo*-Form als His8-Tag-Fusionsprotein für *In-vitro*-Studien in *E. coli* überexprimiert werden.

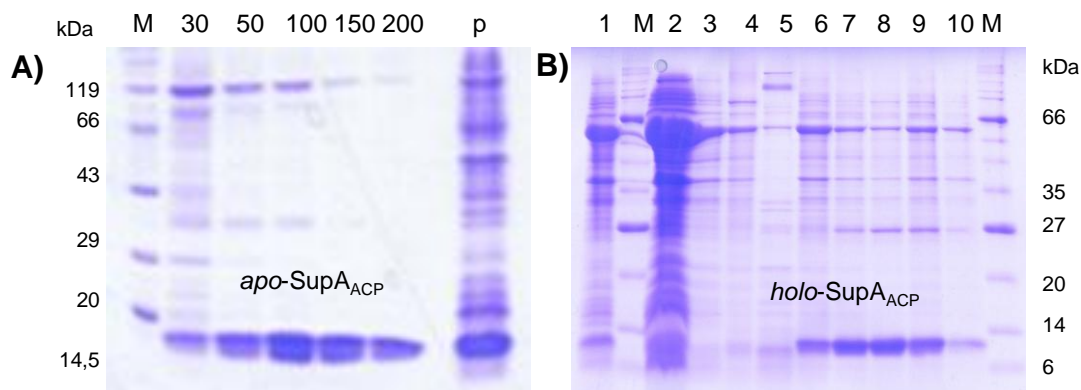
#### *In silico* Analyse des SupA<sub>ACP</sub>

Die Sequenz der SupA<sub>ACP</sub> wurde mit den Sequenzen anderer ACP aliniert und ein Bereich von 87 AS für die Klonierung ausgewählt (Anhang Abb. 15). Als His8-Fusionsprotein hat das Enzym eine Länge von 113 AS bei einer Masse von ~12,6 kDa und einem isoelektrischen Punkt von pH 5,88.

Eine "blastp"-Analyse der SupA<sub>ACP</sub> ergab als nächste Homologe sämtliche ACP der anderen bekannten SupA-Vertreter mit E-Werten von 5e-30 (79% Identität) bis 8e-25 (66% Identität). Danach folgen Sequenzen von Macrolid-PKS I, wie beispielsweise der Tylacton-Synthase<sup>[153]</sup> mit E-Werten von 2e-17 (54% Identität) bis 1e-14 (50% Identität).

#### Proteinexpression des SupA<sub>ACP</sub>

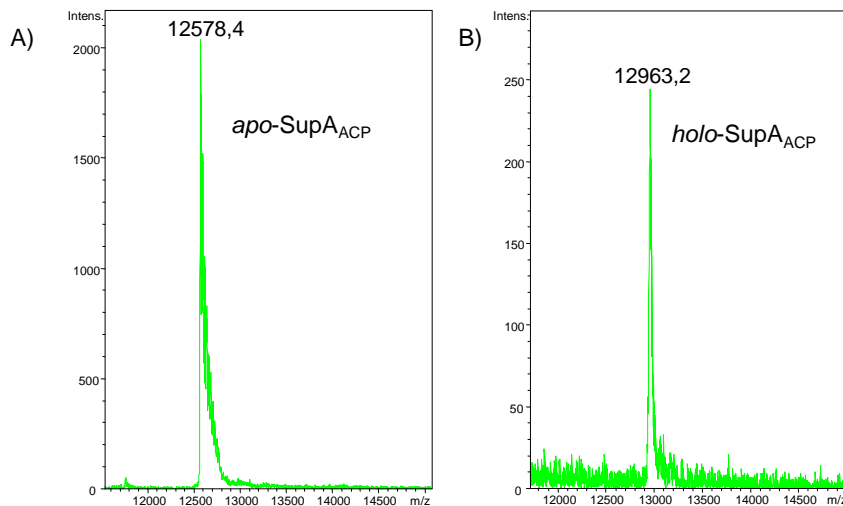
Für die Überexpression der *holo*-SupA<sub>ACP</sub> wurde der Expressionsvektor pHis8-Svp verwendet, der eine Koexpression der ACP mit der PPTase Svp ermöglichte. Um die *apo*-Form der SupA<sub>ACP</sub> zu überexprimieren, wurde aus dem Plasmid für das *holo*-SupA<sub>ACP</sub> (pTH97*holo*) das *svp*-Gen durch Restriktionsverdau wieder entfernt, mit dem Resultat pHN80 (siehe F 2.13.2). Die Expression als His8-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* war in beiden Fällen erfolgreich (Abb. 42), wobei die Expression der *apo*-Form zum Teil durch H. Niederkrüger (AK J. Piel) erfolgte.



**Abb. 42:** Proteinexpression von SupA<sub>ACP</sub>. SDS-PAGE. **A)** *apo*-SupA<sub>ACP</sub> (pHN80). **M**, Rotimark Standard; **30**, e30; **50**, e50; **100**, e100; **150**, e150; **200**, e200; **p**, Pellet. **B)** *holo*-SupA<sub>ACP</sub> (pTH97*holo*). **1**, Pellet; **M**, Broad Range Marker NEB; **2**, Durchfluss; **3**, Waschfraktion; **4**, e30; **5**, e50; **6**, e100; **7**, e150; **8**, e200; **9**, e250; **10**, e300. Kultivierung/Aufbereitung: pHN80: *E. coli* BL21(DE3); 37 °C bis OD<sub>600</sub> = 1, 0,5 mM IPTG, ü/N bei 16 °C. pTH97: *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL, 200 mL 24 h bei 11°C, 245 rpm, 0,5 mM IPTG, 1 mL Lysepuffer. e30, e50, e100, e150, usw., Elutionsfraktionen mit steigender Imidazol-Konzentration in mM.

### Nachweis der *In-vivo*-Phosphopantetheinylierung von SupA<sub>ACP</sub>

Die *holo*-Form des SupA<sub>ACP</sub> konnte *in vivo* erfolgreich durch Koexpression mit der Svp PPTase<sup>[111]</sup> auf dem selben Vektor erreicht werden. Mit MALDI/MS wurde eine Masse von  $m/z$  12.963,2 gemessen, was der Berechnung ( $m/z$  12.963,6) entspricht (**Abb. 43 B**).



**Abb. 43:** MALDI-TOF-TOF-MS Spektren des SupA<sub>ACP</sub>. **A)** *apo*-SupA<sub>ACP</sub>. **B)** *holo*-SupA<sub>ACP</sub>. Die vollständigen Spektren befinden sich im Anhang (Anhang Abb. 21 und Anhang Abb. 22).

War in dem Vektor kein *svp*-Gen vorhanden, erfolgte ausschließlich die Expression der *apo*-Form. Mit MALDI-TOF-TOF-MS wurde  $m/z$  12.577,5 (bzw.  $m/z$  12.578.4) gemessen, ein Wert, der -46 Da von der Berechnung  $m/z$  12.623,4 abweicht (**Abb. 43 A**). Diese Abweichung kann zur Zeit nicht erklärt werden, zumal negative Abweichungen eher selten sind.<sup>[235]</sup>

Das *holo*-SupA<sub>ACP</sub> ließ sich mit [2-<sup>14</sup>C]-Malonyl-CoA (**34**) und (in geringerem Maße) mit [1-<sup>14</sup>C]-Acetyl-CoA (**33**) markieren, was die Anwesenheit der *holo*-Form und deren Funktionsfähigkeit beweist. Die *apo*-Form hingegen zeigte kein Signal. Damit konnte gezeigt werden, dass die *E. coli*-eigene PPTase AcpS das SupA<sub>ACP</sub> nicht in die *holo*-Form umwandeln kann (siehe E 1.5; Abb. 50 und 52).

### E 1.3 SupB, das Typ-II-Acyl-Carrier-Protein

Der ORF *supB* stellt ein nicht in die PKS integriertes ACP dar, was auch als Typ-II-ACP bezeichnet wird. Es befindet sich im *sup*-Cluster stromaufwärts von *supA* (Abb. 27). Das SupB-Protein sollte als His8-Fusionsprotein heterolog in *E. coli* exprimiert werden.

### E 1.3.1 *In silico*-Analyse von SupB

SupB enthält die konservierte Domäne pfam00550, bzw. COG0236 (AcpP) und gehört damit der "PP-binding"-Superfamilie (cl09936) an. **Tab. 2** zeigt die drei besten "blastp"-Treffer.

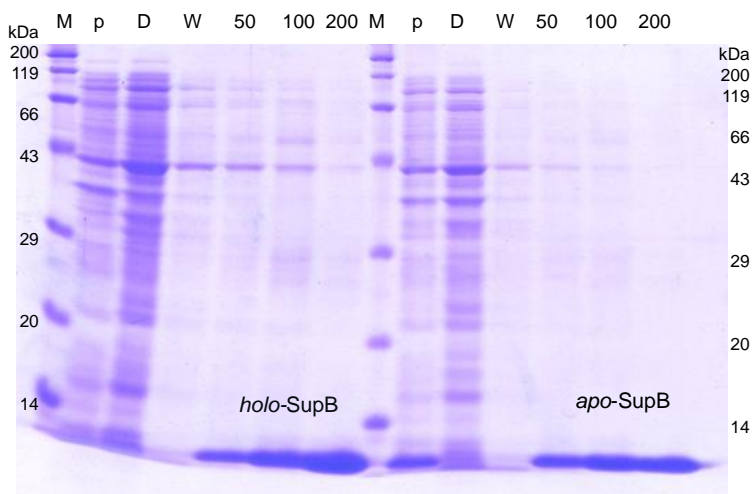
**Tab. 2:** "blastp"-Treffer für SupB (gb|ABE03933.1)

Genbanknr.	Organismus	Position/AS	ident./posit. <sup>[a]</sup>	E-Wert <sup>[b]</sup>
>gb ABE03911.1  SupB	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18	1-76/76	36/64	1e-09
gb ACV28697.1  phosphopantetheine-binding	<i>Anaerococcus prevotii</i> DSM 20548	5-73/74	31/63	0.002
gb EES92030.1  ACP	<i>Clostridium botulinum</i> D str. 1873	5-75/76	32/59	0.005
<sup>[a]</sup> identische/positive Aminosäuren [%]; <sup>[b]</sup> Expect-Wert				

Die beiden nächsten Treffer nach der Sequenz aus dem *sup*-Cluster von *A. aerophoba* stammen beide von Clostridia, die wie die Bacilli zu den Firmicutes (= "low GC gram-positive bacteria") gehören. Grundsätzlich sind die Ähnlichkeiten mit anderen Sequenzen, einschließlich der des anderen SupB-Vertreterers, mit 31-36% sehr gering, was vermuten lässt, dass SupB und SupA nicht immer zusammen evolutiv weitergegeben wurden.

### E 1.3.2 Proteinexpression von SupB

SupB konnte als His8-Fusionsprotein in *E. coli* sowohl in der *apo*- als auch in der *holo*-Form überexprimiert werden. Die Überexpression gelang ohne die Koexpression von Chaperonen in dem Stamm BL21(DE3) mit sehr guten Ausbeuten an aufgereinigtem Enzym (**Abb. 44**).



**Abb. 44:** Proteinexpression des ACP SupB (pTH89*apo*, pTH89*holo*). 20% SDS-PAGE. **M**, Rotimark Standard; **p**, Pellet; **D**, Durchfluss; **W**, Waschfraktion; **50**, e50; **100**, e100; **200**, e200. Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) 50 mL LB + Kan<sup>50</sup>, 1 mM IPTG, 19 h bei 16 °C; 1 mL Lysepuffer, 200 µL Ni-NTA Agarose; 400 µL Elutionsvolumen pro Fraktion; His-Tag gereinigtes Protein: ~800 µg/mL (*apo*), ~400 µg/mL (*holo*). e30, e50, e100, e150, usw., Elutionsfraktionen mit steigender Imidazol-Konzentration in mM.

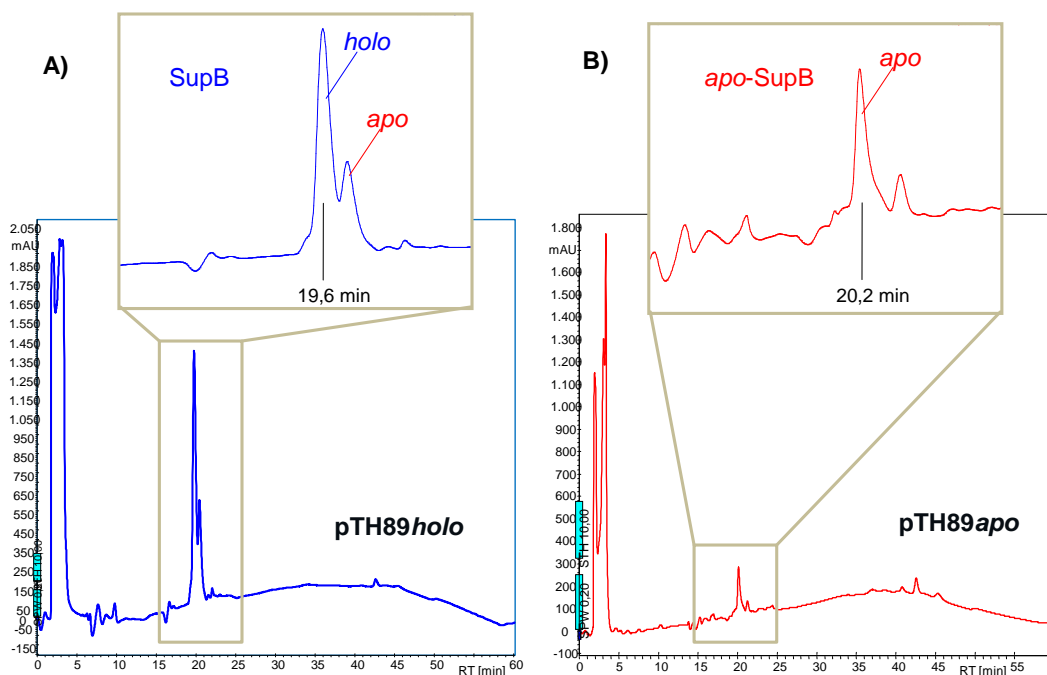
### E 1.3.3 Nachweis der *In-vivo*-Phosphopantetheinylierung

Das SupB-ACP konnte *in vivo* erfolgreich mit der Svp PPTase<sup>[111]</sup> auf dem selben Plasmid (pTH89*holo*) koexprimiert werden. Im Ergebnis wurde die *holo*-Form als His8-Fusionsprotein exprimiert und isoliert (**Abb. 44** links). Das unterstreicht die breite Substratspezifität der Svp. Ohne Koexpression mit der Svp (Plasmid pTH89*apo*) wurde ausschließlich die *apo*-Form des ACP als His8-Fusionsprotein gewonnen (**Abb. 44** rechts). Das beweist, dass die *E. coli*-eigene PPTase AcpS das Protein nicht phosphopantetheinylieren konnte, obwohl die AcpS spezifisch für Typ-II-FAS ist.<sup>[108]</sup>

Sowohl mithilfe der HPLC als auch durch Massenspektrometrie sollte die *apo*-Form von der *holo*-Form des ACP unterschieden werden. Außerdem sollte das Sup-ACP mit <sup>14</sup>C-Malonyl-CoA (**34**) und <sup>14</sup>C-Acetyl-CoA (**33**) radioaktiv markiert werden, um mittels Radio-SDS-PAGE sowohl die Anwesenheit der *holo*-Form, als auch die volle Funktionsfähigkeit zu beweisen.

#### HPLC

Mittels HPLC war eine Trennung der *apo*- und *holo*-Form von SupB voneinander aufgrund unterschiedlicher Retentionszeiten möglich. Dabei erschien in den Chromatogrammen die *holo*-Form 0,6 min vor der *apo*-Form (**Abb. 45**).



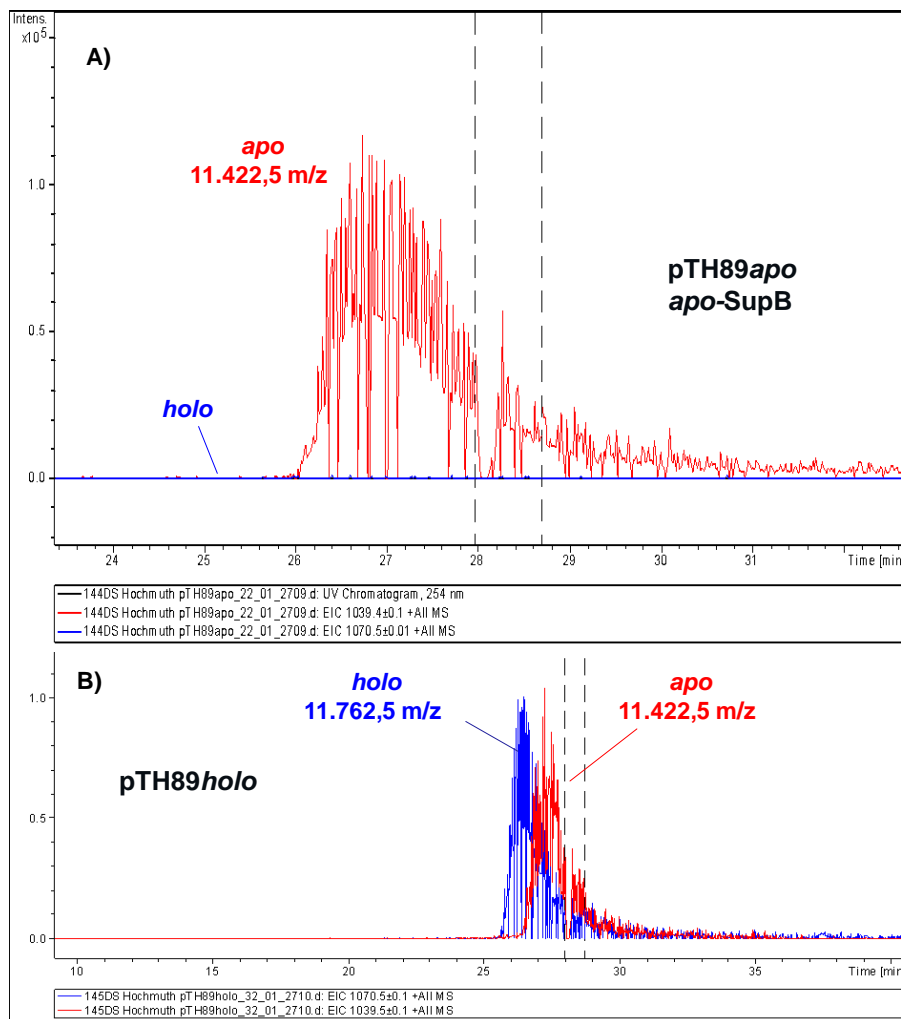
**Abb. 45:** HPLC-Chromatogramme von *apo*- und *holo*-SupB. **A)** pTH89*holo*. **B)** pTH89*apo*. Die höchste Absorption war bei 206 nm. Es wurden 100  $\mu$ L der Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol (e200) aus **Abb. 44** eingesetzt.

In der Elutionsfraktion von pTH89*holo* (enthält *supB* und das PPTase-Gen *svp*) war hauptsächlich die *holo*-Form, zu einem geringeren Anteil jedoch auch die *apo*-Form von SupB vorhanden. In der Elutionsfraktion von pTH89*apo* (enthält nur *supB*) war nur *apo*-SupB und keine Spur von der *holo*-Form zu finden.

### ESI-micro TOF-Q-MS

Dasselbe Ergebnis wie die HPLC-Messung zeigte sich durch Massenspektrometrie: Bei heterologer Expression des SupB-ACP ohne zusätzliche PPTase wurde ausschließlich die *apo*-Form exprimiert ( $m/z = 11.422,5$  für  $[M+H]^+$ ,  $11.422,93$  berechnet). Erst die Koexpression von SupB mit Svp führte zur Bildung einer Mischung aus *apo*- und *holo*-ACP ( $m/z = 11.762,5$  für  $[M+H]^+$ ,  $m/z 11.763,13$  berechnet für die *holo*-Form) (**Abb. 46**).

Die vollständigen Massenspektren der *apo*- und *holo*-Form des ACP SupB befinden sich im Anhang (Anhang Abb. 26, 27 und 28).



**Abb. 46:** Nachweis der *in vivo*-Phosphopantetheinylierung von SupB durch Svp. ESI-micro TOF-Q-MS-Spektren der angegebenen Massenspuren. **A)** Elutionsfraktion von pTH89*apo* (ohne Svp). **B)** Elutionsfraktion von pTH89*holo* (mit Svp).

## ESI-FT-ICR-MS

Die Elutionsfraktionen von pTH89*apo* und pTH89*holo* wurden außerdem mit ESI-FT/MS gemessen. Die Masse der *apo*-Form konnte mit  $m/z = 11.422,75$  für  $[M+H]^+$  bestimmt werden. Berechnet wurde eine exakte Masse von  $m/z = 11.422,52$ . Das Spektrum der *holo*-Form war kaum auswertbar, da die Proteinkonzentration für diese Methode zu gering war. Es zeigte hauptsächlich die *apo*-Form ( $m/z = 11.422,75 [M+H]^+$ ) und neben anderen Peaks auch die putative *holo*-Form, wobei die Masse mit  $m/z = 11.763,71 [M-H]^+$  um ca. 1 g/mol von der berechneten ( $m/z 11.762,7084 [M+H]^+$ ) abweicht. Die beiden Spektren befinden sich im Anhang (Anhang Abb. 17 und 18).

## E 1.4 SupC, die Phosphopantetheinyl-Transferase

Der *sup*-Cluster enthält ein Gen für eine eigene PPTase. Der ORF *supC* befindet sich direkt im Anschluss an *supB*, stromaufwärts von *supA* (Abb. 27). In den folgenden Abschnitten werden die Phylogenie und heterologe Expression von SupC aus dem Metagenom von *T. swinhoei* näher erörtert. Die Frage, ob SupC für die Phosphopantetheinylierung von SupB oder SupA<sub>ACP</sub>, oder von beiden verantwortlich ist, sollte im PPTase Assay (siehe E 1.5.1) beantwortet werden.

### E 1.4.1 *In silico*-Analyse der SupC - Phylogenie

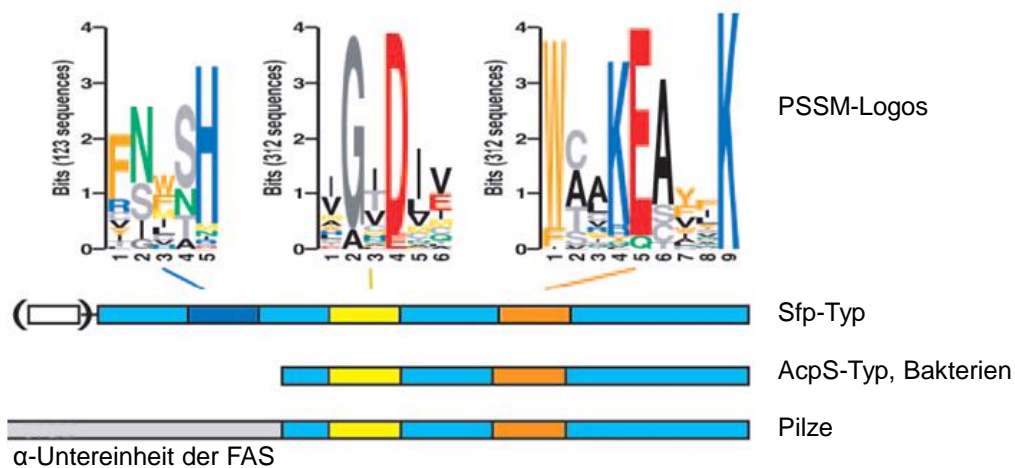
SupC hat eine Länge von 253 AS bzw. 276 AS als His8-Fusionsprotein mit einer Masse von 30,7 kDa. Der berechnete isoelektrische Punkt des Proteins liegt bei pH 6,68. Die drei nächstliegenden Treffer der BLAST-Analyse ("blastp") sind in **Tab. 3** aufgeführt.

**Tab. 3:** "blastp"-Treffer für SupC (gb|ABE03932.1).

Genbanknummer/ Kurzbezeichnung	Organismus	Position/AS	ident./posit. <sup>[a]</sup>	E-Wert <sup>[b]</sup>
gb ABE03913.1  SupC	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18	17-248/250	47/63	4e-55
gb AAAY00023.1  PT_SA1	<i>D. dissoluta</i> uncultured bacterial symbiont	2-121/122	60/76	3e-37
gb ABX05767.1  PPTase	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> ATCC 23779	23-180/237	37/54	1e-21
<sup>[a]</sup> identische/positive Aminosäuren [%]; <sup>[b]</sup> Expect-Wert				

Von den "blastp"-Treffern sind die zwei anderen bekannten Sequenzen aus Schwammsymbionten die nächsten Homologen. Im Fall von PT\_SA1 fehlt fast die halbe Sequenz der C-terminalen Seite, daher ist bei sogar 60% Identität der E-Wert mit  $3e-37$  nicht sehr hoch. Nach den zwei einzigen Verwandten aus *sup*-Clustern kommt mit etwas Abstand eine große Gruppe mit E-Werten zwischen  $1e-21$  bis  $1e-12$ , unter denen PPTasen von vielen Cyanobakterien, Burkholderien und Gram-positiven Bakterien zu finden sind. Keine dieser PPTasen ist bisher biochemisch charakterisiert worden.

Eine Alinierung der gesamten PPTase Sequenzen war aufgrund ihrer Sequenz- und Struktur-Heterogenität nicht möglich. Für die Erstellung eines Stammbaumes der AS Sequenzen sämtlicher bekannter PPTase-Typen, bot sich der (kleine) Bereich aus ~60 AS zwischen den stark konservierten Motiven IGID und AKEA an (Abb. 47, Anhang Abb. 16).<sup>[109]</sup>



**Abb. 47:** Konservierte AS-Motive der PPTasen und Architektur verschiedener PPTase-Typen. Abbildung nach Cai *et al.* 2005.<sup>[109]</sup> PSSM, Position Specific Scoring Matrix.

Den aus der Alinierung berechneten Baum zeigt **Abb. 48**. Dies ist (nach bestem Wissen) der erste veröffentlichte Stammbaum, der alle bekannten PPTase-Typen beinhaltet. Auch die neu entdeckte PPTase aus dem Poribakterien-Genom (siehe E 2.1, Anhang Tab. 5) ist in diesen Baum integriert worden.

Die beiden SupC-Enzyme clustern grundsätzlich zusammen (Bootstrapwert 812); in manchen Bäumen bildeten sie, wie im abgebildeten Baum, eine eigene Klade, manchmal eine gemeinsame Klade mit gi|159899648 (*Herpetosiphon aurantiacus* ATCC 23779, Chloroflexi) oder gi|16152427 (*Burkholderia multivorans* ATCC 17616,  $\beta$ -Proteo). Die PT\_SA1 wurde im Stammbaum nicht integriert, weil von



der Sequenz C-terminal fast die Hälfte fehlt. Wenn sie integriert wurde, fiel sie immer in die SupC-Klade und war näher mit der SupC aus *A. aerophoba* verwandt als mit der aus *T. swinhoei* (Daten nicht gezeigt).

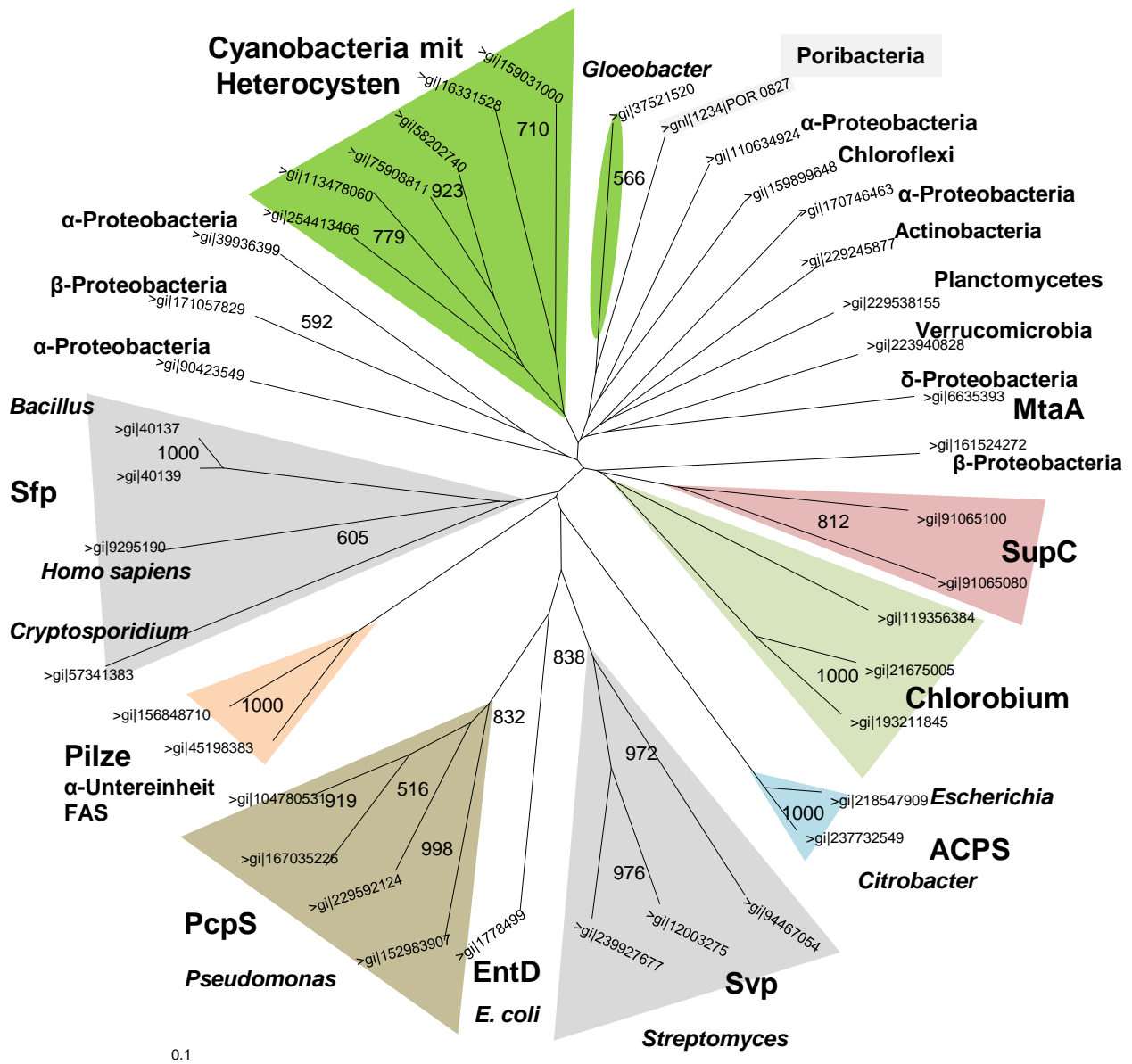


Abb. 48: Stammbaum der PPTasen. "Neighbour joining"-Algorithmus. Bootstrap-Werte >500 von 1000 sind eingetragen.

Die Klade, die die SupC Sequenzen zusammen mit ihrer Schwestergruppe, den PPTasen aus Grünen Schwefelbakterien (*Chlorobium*), und der Sequenz des oben erwähnten  $\beta$ -Proteobakteriums bilden, zweigt näher vom Zentrum des Baumes ab, als die PPTasen vom Sfp- und AcpS-Typ. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die SupC-PPTase und die aus Grünen Schwefelbakterien phylogenetisch ursprünglicher als die letztgenannten sind, was allerdings nicht durch hohe

Bootstrapwerte unterstützt wird. Bisher ist noch kein Vertreter der SupC/Chlorobium-Gruppe biochemisch charakterisiert worden, weshalb sich keine Aussage über die Zugehörigkeit der SupC zur Fettsäure- oder Polyketid-Biosynthese treffen lässt.

Die neu entdeckten PPTasen aus dem Poribakterien-Genom (E 2.1, Anhang Tab. 5) sind nicht näher mit dem SupC-Typ verwandt. Der phylogenetische Baum bestätigt hier die "blastp"-Analyse. Für den Baum ist nur die vollständige POR Sequenz (gnl|1234|POR\_0827) verwendet worden. Die zweite (unvollständige) POR-PPTase ist der ersten in ihrem homologen Teil aber sehr ähnlich, weshalb es bei der gleichen Aussage bleibt. Die Sequenz der Poribakterien-PPTase befindet sich (zusammen mit gi|37521520, einer PPTase aus *Gloeobacter*, einem Cyanobakterium ohne Heterocysten) in einer losen Gruppe von Planctomyceten, Verrucomicrobia,  $\alpha$ -Proteobacteria und MtaA (gi|6635393 aus *Stigmatella aurantiaca*,  $\delta$ -Proteobacteria (**Abb. 48** oben rechts).

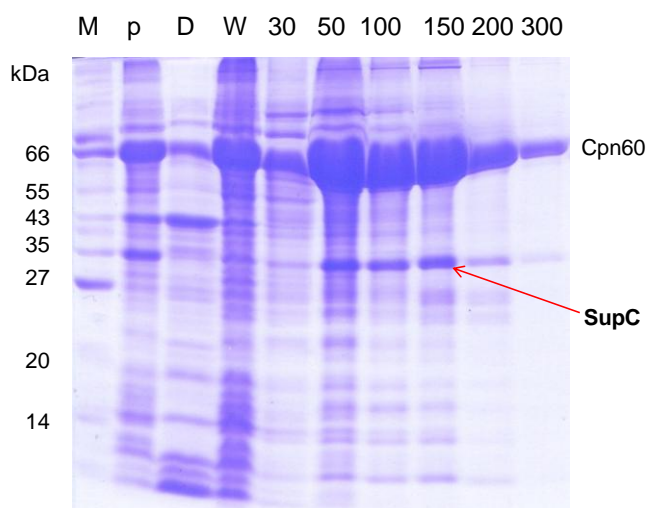
Im Stammbaum gehen viele PPTase Sequenzen konform mit ihrer jeweiligen Wirtstaxonomie: z. B. sind die Taxa Pilze, *Bacillus*, Chlorobium, *Streptomyces* (Svp-Typ), *Pseudomonas* (PcpS-Typ) und Cyanobacteria konserviert. *Gloeobacter* ist ein einzelliges, nicht-N<sub>2</sub> fixierendes, Cyanobakterium und fällt folglich auch nicht in die Cyanobakterien/Heterocysten Gruppe.

Mit hohen Bootstrapwerten belegt ist die nähere Verwandtschaft des Svp-Typs mit dem PcpS und dem EntD-Typ (Bootstrap 838), wobei die beiden letzteren Schwestergruppen sind (Bootstrap 832).

Der Stammbaum zeigt desweiteren eine nahe Verwandtschaft zwischen den PPTasen vom Sfp-Typ aus *Bacillus*, *Homo sapiens* (HAH-P) und dem Protisten *Cryptosporidium parvum*. Die nähere Verwandtschaft der beiden letzteren Sequenzen ist durch einen Bootstrapwert von 605 gestützt (**Abb. 48** links).

#### E 1.4.2 Expression der PPTase SupC

Die PPTase SupC sollte als His8-Fusionsprotein für In-vitro-Studien überexprimiert werden. Dazu wurde der ORF in den Expressionsvektor pHIS8 kloniert, mit dem Resultat von Plasmid pTH90 (siehe F 2.13.4). Die beste Überexpression war mit *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL zu erreichen (**Abb. 49**).



**Abb. 49:** Proteinexpression von SupC. pTH90; 20% SDS-PAGE. M, Broad Range Marker NEB; p, Pellet; D, Durchfluss; W, Waschfraktion; 50, e50; 100, e100; 200, e200; 300, e300; Kultivierung/Aufbereitung: *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL, 500 mL LB ohne Antibiotika; 25 h bei 11°C, 250 rpm, 0,5 mM IPTG, 6 mL Lysepuffer (50/500/10). e30, e50, e100, e150, usw., Elutionsfraktionen mit steigender Imidazol-Konzentration in mM; Cpn60, Chaperon

In den Elutionsfraktionen mit 100 und 150 mM Imidazol wurde die höchste Konzentration an Protein gefunden, jedoch war die Ausbeute im Vergleich zum exprimierten Chaperon Cpn60 gering (**Abb. 49**).

## E 1.5 *In-vitro*-Protein-Assays

Die heterolog exprimierten Enzyme bzw. enzymatischen Funktionen des *sup*-Clusters sollten erstmals auf ihre Funktionsfähigkeit hin untersucht werden. Hier bot sich die Methode der SDS-PAGE mit radioaktiv markierten Substraten an. Es sollte mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Acetyl-CoA (**33**) bzw. Malonyl-CoA (**34**) sowohl (indirekt) die Phosphopantetheinylierung der *apo*-ACP durch die PPTase, als auch der Acyl-Transfer von der SupA<sub>AT</sub> zum *holo*-ACP untersucht werden.

### E 1.5.1 Phosphopantetheinylierung *in vitro* durch SupC und Sfp

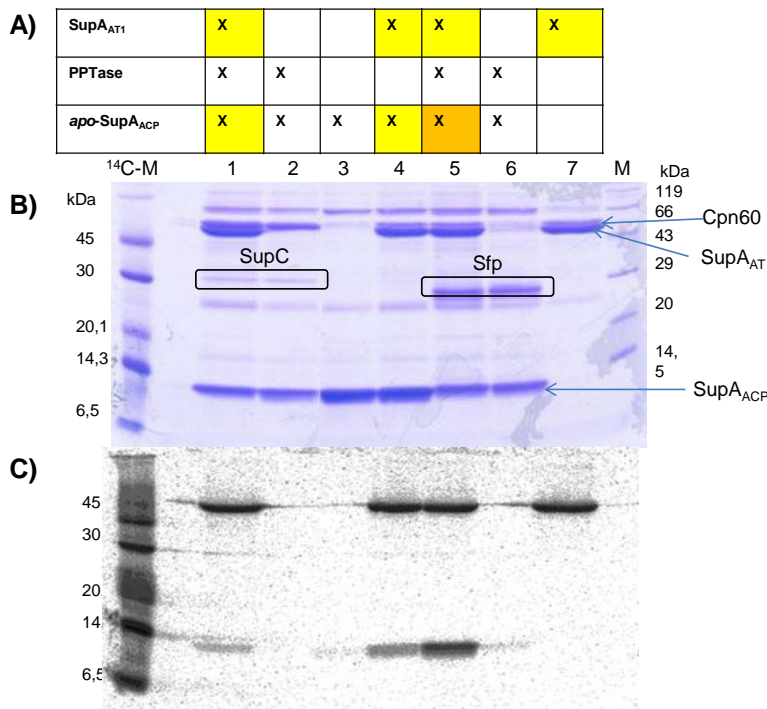
*In vitro* wurde das *apo*-SupB, das SupA<sub>ACP</sub>, sowie zwei weitere *apo*-ACP (PedN und PsyA) aus anderen PKS mit der PPTase SupC in Gegenwart von CoA und  $\text{Mg}^{2+}$  inkubiert. Die gleichen Experimente wurden auch mit der PPTase Sfp<sup>[236]</sup> durchgeführt. Die ACP wurden dann zum Nachweis einer etwaigen Phosphopantetheinylierung im Acyl-Transfer Assay mit  $^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA (**34**) eingesetzt. Bei erfolgreichem Assay sollte nun ein radioaktives Signal in dem zur *holo*-Form aktivierten ACP detektierbar sein.

*In vitro* war es nicht möglich, das Typ-II-ACP SupB von der *apo*- in die *holo*-Form umzuwandeln. Es gelang weder mit der SupC noch mit Sfp (**Tab. 4**, siehe Abb. 53 Spuren 7-10).

**Tab. 4:** *In-vitro*-PPTase Assays und Ergebnisse der <sup>14</sup>C-Malonyl-CoA-Beladung

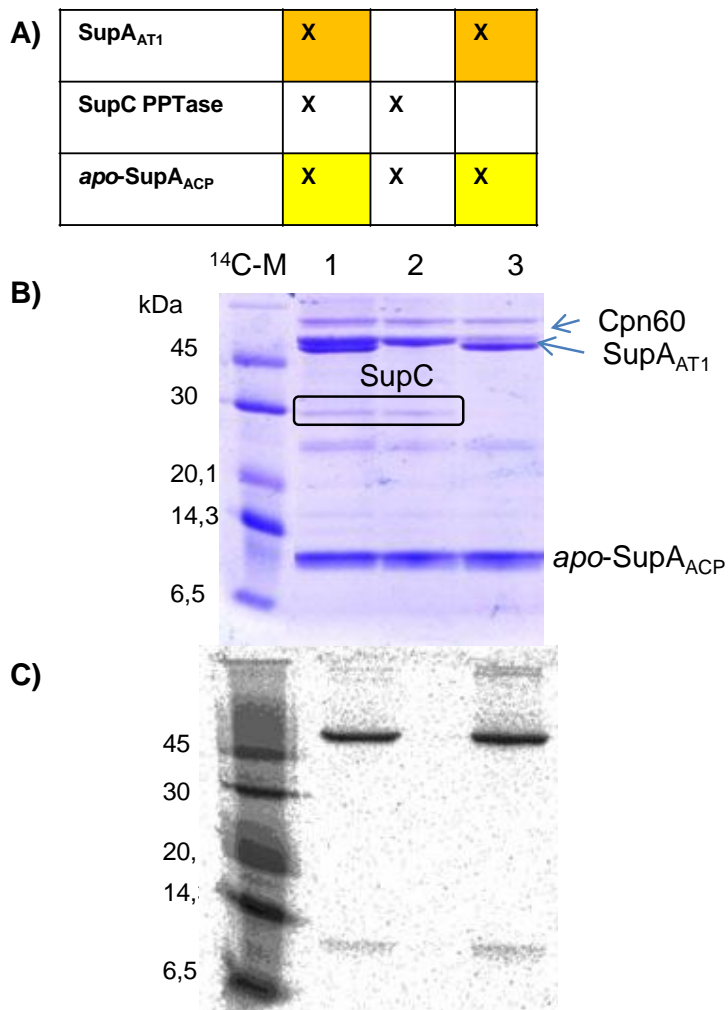
	<i>apo</i> -SupB (Typ II)	<i>apo</i> -SupA <sub>ACP</sub> (Typ I)	<i>apo</i> -PedN (TypII)	<i>apo</i> -PsyA <sub>ACP3</sub> (Typ I)
<b>SupC Assay</b> <sup>[a]</sup>	negativ	<b>positiv +</b>	negativ	negativ
ohne AT	negativ	negativ	negativ	negativ
ohne PPTase	negativ		negativ	negativ
ohne CoA	negativ			
<b>Sfp Assay</b>	negativ	<b>positiv +++</b>	<b>positiv**</b>	<b>positiv**</b>
ohne AT	negativ	negativ		<b>positiv</b>
ohne PPTase	negativ		negativ	negativ
ohne CoA	negativ			
Kontrollen (AT-ACP Assay)				
ACP +AT (kein CoA)	negativ	<b>positiv +</b>		negativ
<i>apo</i> -ACP	negativ	negativ	negativ	negativ
<i>holo</i> -ACP	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>		
<i>holo</i> -ACP + AT	<b>positiv +</b>	<b>positiv</b>		
Die Messungen mit <i>apo</i> -SupA <sub>ACP</sub> wurden von H. Niederkrüger durchgeführt.				
<sup>[a]</sup> AT war SupA <sub>AT</sub> ; ** auch verifiziert mit MALDI (Anhang Abb. 24, Anhang Abb. 25).				

Anders waren die Ergebnisse mit dem *apo*-SupA<sub>ACP</sub>. Hier ließ sich zumindest mit der Sfp eine deutliche Verstärkung des radioaktiven Signals im Vergleich zur Kontrolle (ohne Assay) verzeichnen (**Abb. 50, Tab. 4**). Mit der PPTase SupC konnte eine schwache Markierung des SupA<sub>ACP</sub> erreicht werden, aber für die Funktionalität konnte keine Aussage getroffen werden, da die Negativkontrolle (ohne Assay) trotz mehrerer Wiederholungen aus noch nicht bekannten Gründen immer auch positiv war (**Abb. 51, Tab. 4**).



**Abb. 50:** *In vitro*-Phosphopantetheinylierungs-Assays mit dem *apo*-SupA<sub>ACP</sub>. **A)** Tabelle der im Assay eingesetzten Proteine. Gelb/orange Unterlegung der Kästchen kennzeichnet eine schwache/starke detektierte Radioaktivität. **B)** SDS-PAGE der Assay-Reaktionen: 1, SupC-Assay komplett (AT, PPTase, ACP); 2, SupC-Assay ohne AT; 3, nur *apo*-SupA<sub>ACP</sub>; 4, *apo*-SupA<sub>ACP</sub> + SupA<sub>AT1</sub>; 5, Sfp-Assay komplett; 6, Sfp-Assay ohne AT; 7, nur SupA<sub>AT1</sub>. **C)** Radio-SDS-PAGE von B). Cpn60...Chaperon des Expressionsstamms *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL (~57 kDa).

Aus den Ergebnissen zeigt sich auch die gute Eignung der Sfp für *In-vitro*-Assays aufgrund ihrer geringen Substratspezifität. Allein in der Kombination mit SupB gab es keine Phosphopantetheinylierung des ACP. Hierfür könnte in Zukunft, neben der verwendeten Svp, noch die humane PPTase<sup>[83]</sup> oder die PcpS<sup>[237]</sup> von *Pseudomonas aeruginosa* getestet werden, die nachgewiesenermaßen gut in *In-vitro*-Studien funktioniert haben.

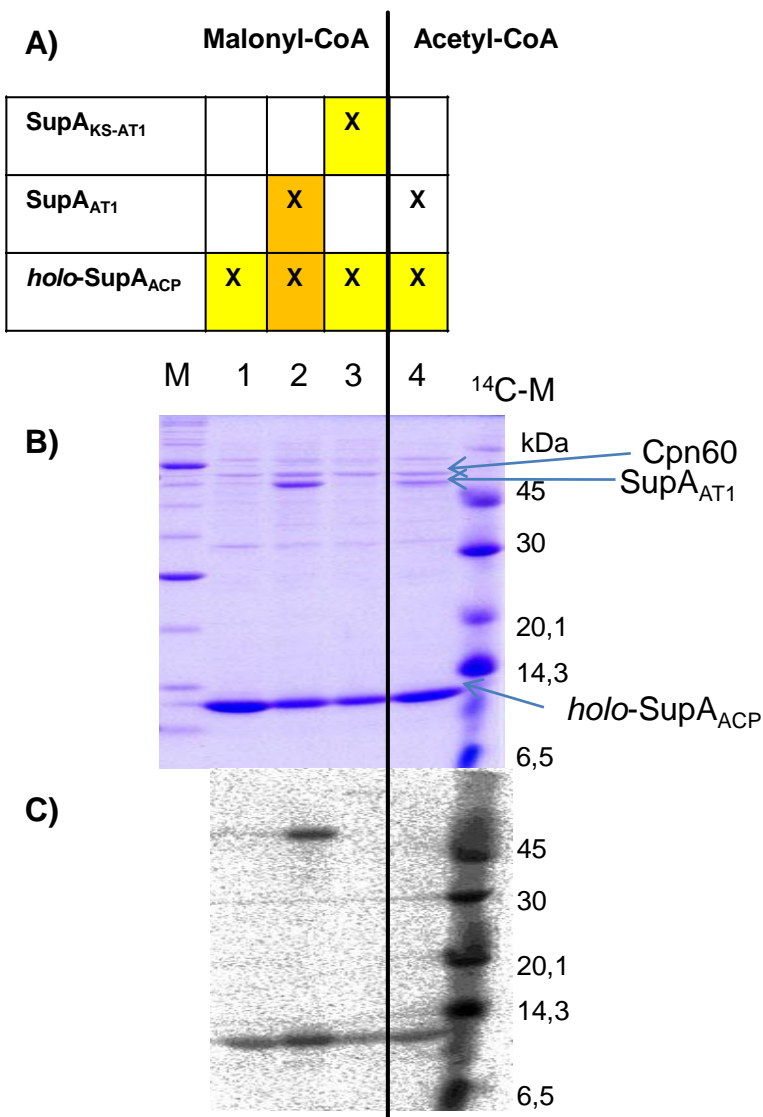


**Abb. 51:** <sup>14</sup>C-Malonyl-CoA-Beladung des apo-SupA<sub>ACP</sub>. **A)** Tabelle der im Assay eingesetzten Proteine. Gelb/orange Unterlegung der Kästchen kennzeichnet eine schwache/starke detektierte Radioaktivität. **B)** SDS-PAGE: **1**, SupC-Assay komplett (AT, PPTase, ACP); **2**, SupC-Assay ohne AT; **3**, apo-SupA<sub>ACP</sub> + SupA<sub>AT1</sub>. **C)** Radio-SDS-PAGE von B). Cpn60...Chaperon des Expressionsstamms *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL (~57 kDa).

### E 1.5.2 Acyl-Transfer durch SupA<sub>AT1</sub>

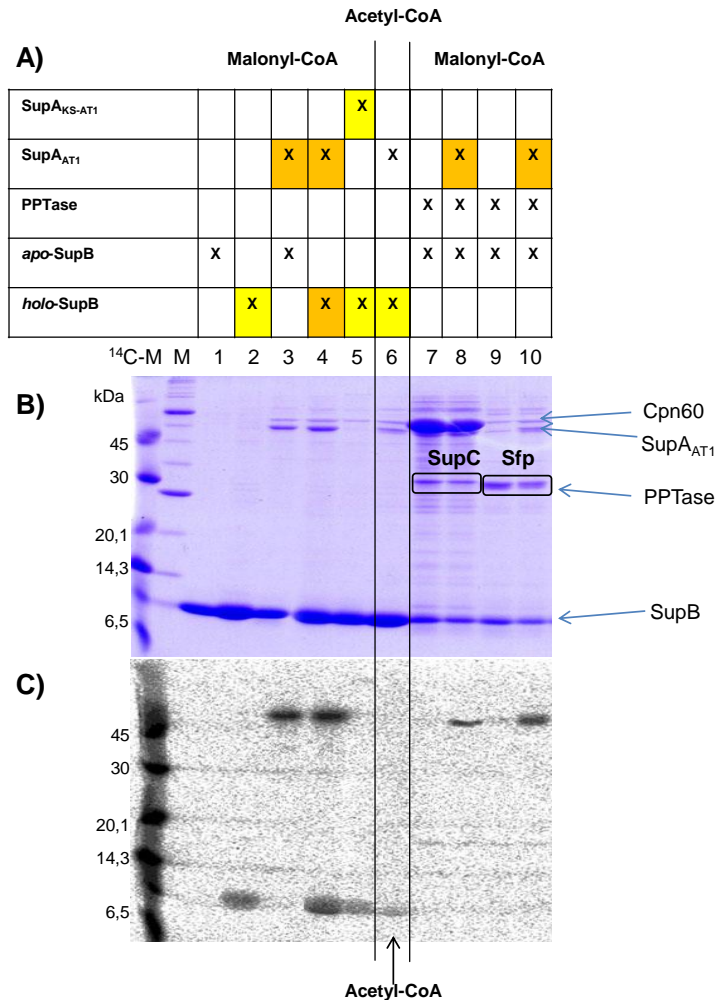
Die SupA<sub>AT1</sub> übertrug <sup>14</sup>C-Malonyl-CoA (**34**) auf das *holo*-SupA<sub>ACP</sub>. In Abwesenheit der SupA<sub>AT1</sub> erfolgte keine Beladung der apo-SupA<sub>ACP</sub> und nur eine geringe Selbstbeladung der *holo*-SupA<sub>ACP</sub> (**Abb. 52**). Derartige Selbstmalonylierungen wurden auch schon bei anderen *holo*-ACP beobachtet.<sup>[88, 238-240]</sup> Die Experimente zeigten sowohl mit der einzelnen SupA<sub>AT1</sub>-Domäne, als auch mit der SupA<sub>KS-AT1</sub>-Didomäne dieselben Ergebnisse (**Abb. 52**).

Interessanterweise wurde von der  $\text{SupA}_{\text{AT1}}$  aber auch die (vermeintliche) *apo*- $\text{SupA}_{\text{ACP}}$  markiert. Die Vermutung, dass ein teilweises Vorhandensein der *holo*-Form in der *apo*- $\text{SupA}_{\text{ACP}}$ -Elutionsfraktion die Ursache dafür sei, konnte jedoch nicht bewiesen werden, da mit MALDI/MS in der *apo*- $\text{SupA}_{\text{ACP}}$ -Fraktion keine *holo*-Form nachgewiesen wurde (Anhang Abb. 21). Daher kann die Frage nach der Ursache der *apo*- $\text{SupA}_{\text{ACP}}$ -Markierung noch nicht beantwortet werden. Möglicherweise sind kleinste Mengen an *holo*-Form durch die *E. coli*-eigene PPTase *in vivo* gebildet worden, die durch die äußerst sensitive Methode der Radio-SDS-PAGE sichtbar gemacht wurden. Andererseits fand aber, in einem separaten Experiment, bei der *holo*- $\text{SupA}_{\text{ACP}}$  eine Selbstbeladung mit  $^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA (34) statt (Abb. 52 Spur 1), d. h. größere Mengen an *holo*-Kontamination hätten sich wahrscheinlich in einer Markierung der *apo*- $\text{SupA}_{\text{ACP}}$  auch ohne  $\text{SupA}_{\text{AT1}}$  niedergeschlagen.



**Abb. 52:** Radioassay der  $\text{SupA}_{\text{AT1}}$  mit  $^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA und  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA. **A)** Tabelle der im Assay eingesetzten Proteine und radioaktiven Substrate. Die später schwach, bzw. stark radioaktiv markierten Proteine sind gelb, bzw. orange unterlegt. **B)** SDS-PAGE: **M**, Broad Range Marker NEB; **1**,  $^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA + *holo*- $\text{SupA}_{\text{ACP}}$ ; **2**,  $^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA +  $\text{SupA}_{\text{AT1}}$  + *holo*- $\text{SupA}_{\text{ACP}}$ ; **3**,  $^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA +  $\text{SupA}_{\text{KS-AT1}}$  + *holo*- $\text{SupA}_{\text{ACP}}$ ; **4**,  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA +  $\text{SupA}_{\text{AT1}}$  + *holo*- $\text{SupA}_{\text{ACP}}$ ;  $^{14}\text{C}$ -**M**, Rainbow Marker, radioaktiv **C)** Radio-SDS-PAGE von B). Cpn60...Chaperon des Expressionsstamms *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL (~57 kDa).

Die SupA<sub>ATI</sub> ließ sich nicht mit <sup>14</sup>C-Acetyl-CoA (**33**) markieren, hingegen konnte eine (Selbst)beladung der *holo*-SupA<sub>ACP</sub> (**Abb. 52** Spur 4) und von *holo*-SupB (**Abb. 53** Spur 6) mit <sup>14</sup>C-Acetyl-CoA (**33**) festgestellt werden, die allerdings deutlich schwächer war als jene mit <sup>14</sup>C-Malonyl-CoA (**34**) (**Abb. 53**, Spur 2).



**Abb. 53:** <sup>14</sup>C-Markierung von *holo*-SupB und *in vitro* Phosphopantetheinylierungs-Assays mit apo-SupB. **A)** Tabelle der im Assay eingesetzten Proteine und radioaktiven Substrate. Die später schwach, bzw. stark radioaktiv markierten Proteine sind gelb, bzw. orange unterlegt. **B)** SDS-PAGE. <sup>14</sup>C-M, Rainbow Marker, radioaktiv; M, Broad Range Marker NEB; 1-10, Assay-Proben wie aus A) ersichtlich. **C)** Radio-SDS-PAGE von B). Cpn60...Chaperon des Expressionsstamms *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL (~57 kDa).

Die **Abb. 53** zeigt auch, dass die SupA<sub>ATI</sub> Malonyl-CoA (**34**) nicht nur auf das *holo*-SupA<sub>ACP</sub>, sondern auch auf das *holo*-SupB übertrug (Spur 4). Die apo-Form wurde nicht markiert und die Selbstbeladung der *holo*-ACP war etwas geringer (**Abb. 53** Spur 2).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die SupA<sub>ATI</sub> funktionell ist und *in vitro* Malonyl-CoA (**34**) als PKS-Baustein auf beide ACP des *sup*-Clusters (SupA<sub>ACP</sub> und SupB, siehe **Abb. 52** und **53**) übertragen kann. Im Unterschied zur AT der FAS I der Tiere fand jedoch keine Beladung der SupA<sub>ATI</sub> mit Acetyl-CoA (**33**) statt.

## E 1.6 Funktion des *sup*-Clusters - Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden funktionelle Studien am *sup*-Cluster durchgeführt. Der Cluster war zuvor aus dem Metagenom von *T. swinhoei* isoliert worden.<sup>[1]</sup> Zur Überprüfung der *in vivo* Expression wurde der *sup*-Cluster sowie der ORF von *supA* in verschiedene heterologe Wirte überführt und die Fettsäureprofile der Transformanten analysiert. Es konnte weder in *E. coli*, noch in *P. putida*, *S. albus* oder *C. glutamicum* eine Veränderung in der Fettsäure-Zusammensetzung festgestellt werden. In den Massenspektren wurde vor allem nach MBFA gesucht, jedoch konnten solche Fettsäuren nicht gefunden werden. Ein möglicher Grund für die fehlgeschlagene *in vivo* Expression des *sup*-Clusters könnte darin liegen, dass den heterologen Wirten eine geeignete Transferase und/oder ein geeignetes Akzeptormolekül für die möglicherweise gebildete Fettsäure fehlte, da in der SupA-PKS keine terminale TE-Domäne für die Ablösung der fertigen Fettsäure vom Enzym vorhanden ist. Weitere mögliche Ursachen sind im Text diskutiert worden (siehe E 1.1.5).

Bei den nachfolgenden Versuchen, das gesamte SupA-Protein (3.460 AS) in *E. coli* sowie *S. albus* zu überexprimieren, konnten nur sehr geringe Enzymkonzentrationen erzielt werden. Die exprimierten Mengen waren zu gering für Proteinassays, zudem konnte nicht zweifelsfrei die Vollständigkeit des Enzyms bewiesen werden, da die His8-Tag-Aufreinigung nicht funktionierte. Vielfache Anstrengungen, das SupA-Protein im nativen Zustand aufzukonzentrieren waren nicht erfolgreich, jedoch im denaturierten Zustand konnte Protein von einer Größe von >250 kDa durch Fällung aufkonzentriert werden. Die Fettsäure-Analyse des Proteinlysats nach Abhydrolyse mittels KOH ergab jedoch keine methylverzweigten Fettsäuren.

Nach diesen Versuchen wurden einzelne Domänen von SupA und die kleineren Proteine SupB und SupC separat für *In-vitro*-Studien exprimiert.

Durch die Klonierung des ORFs für das freistehende ACP SupB in den Expressionsvektor pHis8 und Überexpression in *E. coli* konnte lösliches, mit His8-Tag aufgereinigtes, Protein produziert werden. ESI-micro TOF-Q-MS Analysen konnten beweisen, dass das SupB-ACP ausschließlich in der apo-Form ( $m/z = 11.422,5$  für  $[M+H]^+$ , 11.422,93 berechnet) vorlag. Demnach war die *E. coli* eigene PPTase AcpS nicht in der Lage, dieses Typ-II-ACP zu



phosphopantetheinylieren, obwohl sie in *E. coli* auch für Typ-II-Enzyme spezifisch ist, wenn auch aus FAS. Wurde dagegen die SupB-ACP mit der Svp, einer PPTase aus dem Bleomycin-Cluster (PKS/NRPS)<sup>[111]</sup> koexprimiert, konnte eine Mischung aus *apo*- und *holo*-ACP ( $m/z = 11.762,5$  für  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  11.762,13 berechnet für die *holo*-Form) gemessen werden. Bei gleicher Vorgehensweise wurde auch die ACP-Domäne von SupA nur im Falle der Koexpression mit Svp als *holo*-Form exprimiert.

Für *In-vitro*-Assays zum Acyltransfer von der AT zur ACP wurden die ACP, die erste AT-Domäne (AT1) von SupA und die PPTase SupC einzeln als His8-Tag-Fusionsproteine exprimiert, ebenso wie die alternative PPTase Sfp aus *Bacillus subtilis*.<sup>[108]</sup>

Die *In-vitro*-Phosphopantetheinylierung gelang nur mit der SupA<sub>ACP</sub> (durch Sfp und SupC) und nicht mit der *apo*-SupB. Im Falle der PPTase SupC muss aber einschränkend konstatiert werden, dass (wegen einer positiven Negativkontrolle) nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, ob die PPTase auch definitiv aktiv war.

Inkubation der AT mit <sup>14</sup>C-Malonyl-CoA (**34**) und <sup>14</sup>C-Acetyl-CoA (**33**) und anschließender Analyse der Reaktion mittels Radio-SDS-PAGE zeigte eine radioaktive Markierung der AT mit <sup>14</sup>C-Malonyl-CoA (**34**) und nicht mit <sup>14</sup>C-Acetyl-CoA (**33**). Die <sup>14</sup>C-Markierung konnte auf beide ACP (SupA<sub>ACP</sub> und das ACP SupB) übertragen werden, wobei sich bei Abwesenheit der AT, wenn überhaupt, nur eine schwache Markierung der ACP durch Selbstacylierung ergab. Daher ist die SupA<sub>AT1</sub> voll funktionsfähig und kann Malonyl-CoA (**34**) auf beide ACP des *sup*-Clusters übertragen.

## E 2 Herkunft des *sup*-Clusters

In diesem Kapitel wird zunächst über die Ergebnisse der Genomanalyse einer einzelnen Poribakterienzelle berichtet. Im Folgenden werden dann die Ergebnisse einer vergleichenden genetischen und chemischen Analyse von Schwämmen mit vielen bakteriellen Symbionten ("high microbial abundance", HMA) und Schwämmen mit wenigen Bakterien ("low microbial abundance", LMA) vorgestellt. Es wurden nur Schwämme ausgewählt, die durch mikroskopische Untersuchung zweifelsfrei als HMA- oder LMA-Schwämme bestimmt wurden.<sup>[189]</sup> Als HMA-Schwämme fanden dabei *Cacospongia mycofijiensis*, *Aplysina aerophoba*, *Theonella swinhoei*, *Agelas dilatata*, *Ircinia felix* und *Xestospongia muta* Verwendung, und als LMA-Schwämme *Dysidea etheria*, *Dysidea avara*, *Callyspongia vaginalis*, *Niphates digitalis*, *Ptilocaulis* sp. und *Amphimedon compressa*.

### E 2.1 Genomanalyse eines Poribakteriums

Einen ersten stichhaltigen Hinweis auf die Herkunft des *sup*-Clusters lieferte die Gruppe von Ute Hentschel (Uni Würzburg) im Jahre 2009. Es gelang mittels Durchflusszytometrie eine Vereinzelung der bakteriellen Symbionten des Mittelmeerschwammes *A. aerophoba* bis auf zwei Bakterienzellen. Eine Zelle war ein Poribakterium und die andere ein Vertreter der Chloroflexi. Die Genome der beiden Zellen wurden mittels Gesamtgenomamplifizierung (WGA) amplifiziert und eine Cosmid-Bibliothek erstellt (siehe F 5.1). Auf dem sequenzierten Cosmid 1k6 befand sich ein komplettes *supA*-Gen. Weiterführende PCR-Analysen von einzelnen Poribakterien- bzw. Chloroflexi-Zellen, zeigten, dass erstere PCR-positiv und letztere PCR-negativ für *supA* waren.<sup>[14]</sup>

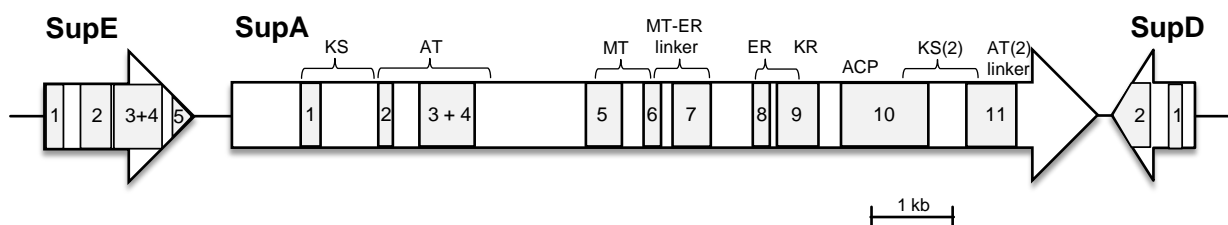
Jedoch sollte erst die aktuelle Genomanalyse nach einer 454-Sequenzierung der WGA einer einzelnen Poribakterienzelle den Beweis der Zugehörigkeit des *sup*-Clusters zu den Poribakterien liefern.<sup>[11]</sup>

Die Genomanalyse im Hinblick auf vorhandene PKS und FAS I wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit geleistet, wobei auf eine Eingrenzung der Sequenzvielfalt auf putative Gene des Sekundärmetabolismus durch den AK U. Hentschel zurückgegriffen werden konnte. Es wurden Genfragmente sowohl von *supA* als auch von *supD* und *supE* gefunden sowie Gene einer *wcbR*-ähnlichen

PKS I und zweier verschiedener PPTasen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Poribakterien-Genomanalyse präsentiert, soweit sie den *sup*-Cluster und die PPTasen betreffen.

### **Sup-Cluster**

Es konnten 11 Fragmente (10 kurze Sequenzen von ~200-450 bp und ein Fragment eines Contigs von ~660 bp) dem *supA*-Gen zugeordnet werden (**Abb. 54**, Anhang Tab. 2). Davon haben zwei (Fragmente 3+4) Ähnlichkeit zu demselben *supA*-Abschnitt. Das spricht dafür, dass sich in dem Poribakteriengenom einer Bakterienzelle mindestens zwei verschiedene *supA*-Sequenzen befinden. Eine andere Möglichkeit wäre das Vorhandensein einer PKS mit zwei Modulen, ähnlich der SA1\_PKSA aus *D. dissoluta* (**Abb. 18**).<sup>[15]</sup>



**Abb. 54:** Zuordnung der im Poribakterien-Genom gefundenen Sequenzen zum *sup*-Cluster. Die Genabfolge des Schemas entspricht dem *sup*-Cluster pAPKS18 (**Abb. 18 B**). Aus Siegl et al.<sup>[11]</sup>

Desweiteren fanden sich im Poribakterien-Genom zwei kurze Sequenzen von ~150 bp bzw. ~450 bp mit Homologien zu der putativen Hydrolase SupD (**Abb. 54**, Anhang Tab. 3). Für die putative Permease SupE wurden fünf Sequenzen von ~200-450 bp gefunden, wobei zwei Fragmente zu finden waren, die zum selben Abschnitt gehören (3+4) (**Abb. 54**, Anhang Tab. 4).

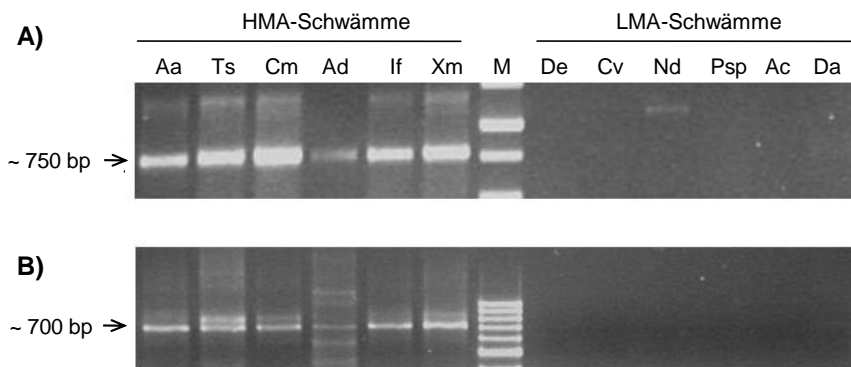
### **PPTasen**

Die zwei gefundenen PPTasen haben keine besonders große Ähnlichkeit zur PPTase des *sup*-Clusters (SupC) (Anhang Tab. 5). Die größten Homologien bestehen zu PPTasen aus Cyanobakterien. Das zeigt auch die Stammbaumanalyse (siehe E 1.4.1).

## E 2.2 Positive Korrelation von *sup*-Cluster und Poribakterien

Um die aus den Genomdaten eines Poribakteriums gewonnene Erkenntnis der Herkunft des *sup*-Clusters aus diesen Bakterien weiter zu untermauern, sollte die Korrelation von *sup*-Genen und Poribakterien in marinen Schwämmen näher untersucht werden.

Zunächst wurden die metagenomische DNA von 12 marinen Schwämmen mittels PCR auf das Vorhandensein von Poribakterien und *sup*-Genen untersucht. Dies erfolgte im Labor von U. Hentschel (Uni Würzburg). Damit sollte untersucht werden, ob (wie vermutet) eine positive Korrelation zwischen der Anwesenheit von Poribakterien und *sup*-Genen besteht. Die Ergebnisse der PCR mit spezifischen Primern für die 16S-rRNA von Poribakterien zeigten, dass alle HMA Schwämme PCR positiv und alle LMA Schwämme PCR-negativ für Poribakterien waren (**Abb. 55 A**). Dieses Ergebnis deutet auch darauf hin, dass es nur einer einzigen PCR mit Primern für Poribakterien bedarf, um HMA-Schwämme von LMA-Schwämmen zu unterscheiden.



**Abb. 55:** PCR-Analyse von 12 marinen Schwämmen. **A)** Primer für 16S-rRNA von Poribakterien. **B)** Primer für KS-Domäne (DPQQ/HGTGT). Aa, *A. aerophoba*; Ts, *T. swinhoei*; Cm, *C. mycofijiensis*; Ad, *A. dilatata*; If, *I. felix*; Xm, *X. muta*; M, DNA Größenstandard; De, *D. etheria*; Cv, *C. vaginalis*; Nd, *N. digitalis*; Psp, *Ptilocaulis* sp.; Ac, *A. compressa*; Da, *D. avara*.

Eine zweite PCR mit den degenerierten DPQQ/HGTGT<sup>[155]</sup>-Primern für die KS Domäne von PKS I (Abb. 13), mit anschließender Analyse der Amplifikate, zeigte, dass die *sup*-Gene in allen HMA-Schwämmen und ausschließlich in diesen zu finden waren (**Abb. 55 B, Tab. 8**). Das bedeutet, dass eine positive Korrelation zwischen der Abundanz bakterieller Symbionten und dem Vorhandensein sowohl von Poribakterien, als auch von *sup*-Genen besteht.<sup>[241]</sup>

Da die angewandten Primer für die KS-Region neben monomodularen auch multimodulare PKS I detektieren können, zeigt das Ergebnis, dass PKS-produzierte neue Arzneimittelkandidaten nicht in LMA-Schwämmen, sondern vielmehr in HMA-Schwämmen zu suchen sind. Dieses Ergebnis unterstützend, wurden laut umfangreicher Literaturrecherche bisher in keinem der sechs LMA-Schwämme der vorliegenden Arbeit Polyketide gefunden. Eine mögliche Ausnahme bilden die Amphitoxine<sup>[242]</sup> aus *A. compressa*, von denen noch nicht bekannt ist, ob sie evtl. von einer sehr ungewöhnlichen PKS oder FAS gebildet werden.<sup>[243]</sup>

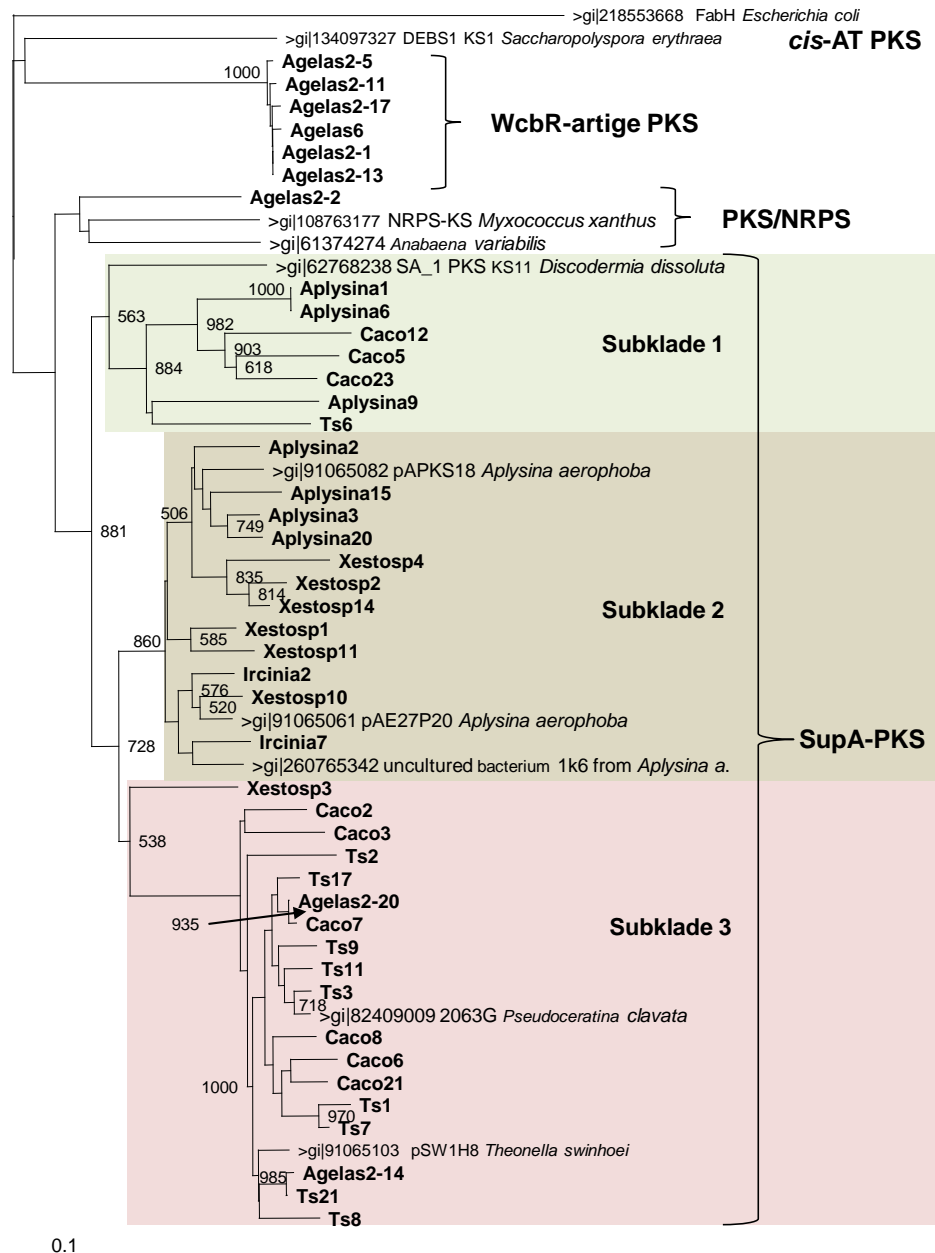
### E 2.3 PKS-Diversität in den untersuchten Schwämmen

Von den sechs untersuchten HMA-Schwamm Spezies wurden im Labor von Ute Hentschel (Uni Würzburg) die KS-Amplifikate (**Abb. 55 B**) isoliert und sequenziert, um das Vorhandensein von sup-Genen zu verifizieren und um zu prüfen, wie groß die Anzahl verschiedener *supA*-Spezies ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese Sequenzen analysiert und ein Stammbaum angefertigt (**Abb. 56**). Die Ergebnisse der Analyse zeigten, dass von jeweils ~45 PCR Produkten alle zur Gruppe der *supA*-Gene gehörten. Lediglich der Schwamm *A. dilatata* bildete eine Ausnahme: von diesem Schwamm waren von neun PCR Produkten nur zwei vom *supA*-Typ. Der Rest waren sechs WcbR-artige Sequenzen und eine PKS/NRPS-Sequenz. Ungewöhnlich bei der PCR-Analyse dieses Schwammes war auch, dass von 55 PCR Produkten 46 überhaupt keine KS-Gene, sondern andere Sequenzen waren. War die Anzahl der *supA*-KS-Sequenzen unter den HMA-Schwämmen in etwa gleich, so war doch deren Diversität auffallend unterschiedlich (siehe auch Tab. 8).

Nachdem alle KS-Sequenzen in den Stammbaum eingefügt wurden, waren drei Subkladen der großen *supA*-Klade zu unterscheiden: Subklade 1 mit dem prominenten Vertreter SA\_1 PKS KS11 aus *D. dissoluta*, Subklade 2 mit den drei bekannten *supA*-Sequenzen aus *A. aerophoba* und Subklade 3 mit den bekannten Sequenzen von 2063G aus *P. clavata* und pSW1H8 aus *T. swinhoei*.

Die geringste Diversität hatte *A. dilatata* mit zwei verschiedenen Sequenzen, wobei beide der gleichen SupA-Subklade 3 angehörten. *I. felix* hatte drei verschiedene Sequenzen aus der Subklade 2 (n = 45), *X. muta* sieben verschiedene

Sequenzen aus der Subklade 2 (n = 44), *A. aerophoba* sieben verschiedene Sequenzen aus den Subkladen 1 (n = 16) und 2 (n = 29).



**Abb. 56:** Diversität der KS-Amplifikate (DPQQ/HGTGT) aus den Schwämmen der vorliegenden Untersuchung (fett gedruckt). "Neighbour joining"-Stammbaum, Bootstrapwerte >500 von 1000 sind angegeben. Als Außengruppe diente FabH von *E. coli*.

Die Mehrheit der Sequenzen war also in der gleichen SupA-Subklade 2 zu finden, wie die bisher bekannten SupA-Prototypen aus *A. aerophoba*. *C. mycofijiensis* hatte neun verschiedene Sequenzen aus den Subkladen 1 (n = 4) und 2 (n = 38), *T. swinhoei* 10 verschiedene Sequenzen aus den Subkladen 1 (n = 4) und 3 (n = 42). Die überwiegende Mehrheit war also in der gleichen *supA*-Subklade 3 zu finden wie der Prototyp pSW1H8 aus *T. swinhoei*. Ein Vergleich der SupA-Subkladen

mit den Fundorten der Schwämme zeigte allerdings keine mögliche geographische Zuordnung. Interessant ist trotzdem, dass der Schwamm *X. muta* ausschließlich Sequenzen aus einer einzigen SupA-Subklade enthielt, ebenso wie *A. dilatata* und *I. felix*. Das bedeutet, dass die *supA*-Gene offensichtlich nicht gleichmäßig über alle Schwämme verteilt sind und dass unter den Schwammspezies auch große Unterschiede bezüglich der Diversität bestehen. Die Untersuchung einer größeren Stichprobe von Schwammindividuen könnte diese Aussage noch untermauern.

Aus den Ergebnissen lässt sich auch schlussfolgern, dass sich in den sechs LMA Schwämmen nicht nur keine *supA*-Gene, sondern generell keine Gene für PKS I befinden. Dieses Erkenntnis deckt sich mit der Feststellung, dass von den sechs untersuchten LMA Schwämmen trotz intensiver Literaturrecherche keine Berichte über Vorkommen von Polyketiden zu finden waren. Sollte sich diese Aussage in breiter angelegten Studien bestätigen, könnte die Suche nach bioaktiven, komplexen Polyketiden auf HMA-Schwämme eingeschränkt werden.<sup>[241]</sup>

## E 2.4 Fettsäureanalytik von sechs marinen Schwämmen

Aus der Korrelationsstudie von *sup*-Cluster und Poribakterien (siehe E 2.2) ging hervor, dass sowohl der Cluster, als auch die Poribakterien ausschließlich in HMA-Schwämmen ("high microbial abundance", siehe C 3.2) und nicht in LMA-Schwämmen ("low microbial abundance") vorkamen. Um Näheres über die Produkte der SupA-PKS zu erfahren, sollten daher die Fettsäureprofile von HMA- und LMA-Schwämmen miteinander verglichen werden. Außerdem sollte die Diversität der als Produkte vermuteten mittkettig verzweigten Fettsäuren (MBFA) ermittelt und mit der Diversität der *supA*-Sequenzen der Schwämme verglichen werden.

Da umfangreiche Fettsäure-Analysen von Schwammmaterial sehr zeitaufwendig sind, wurden von den 12 genetisch untersuchten Schwämmen sechs für die chemische Analyse ausgewählt: die HMA-Schwämme *C. mycofijiensis*, *T. swinhoei*, *A. dilatata* und *I. felix* und die LMA Schwämme *D. etheria* und *D. avara*.

## E 2.4.1 Lipidextraktion und Lipidfraktionierung

### Extraktion der Lipide

Die Extraktion der Schwammlipide erfolgte nach Bligh & Dyer<sup>[244]</sup> (siehe F 4.1.4). Das tiefgefrorene Schwammmaterial hatte einen Wassergehalt von ~83%, was durch Wägung eines Stückes vor und nach Gefriertrocknung ermittelt wurde. Dieses Wasser wurde in das Lösungsmittel-Verhältnis nach Bligh & Dyer mit einbezogen. Die Ausbeuten an Gesamtlipiden waren meist zwischen 6% und 11%. Die Färbung der Schwämme und auch der Lipidextrakte war recht unterschiedlich. Interessant war der deutliche Farbunterschied zwischen *I. felix* 2004 und *I. felix* 2008, die an unterschiedlichen Orten der Bahamas gesammelt wurden (Anhang Tab. 10).

### Fraktionierung der Lipide

Die Schwammlipide wurden zur besseren Auftrennung im GC/MS-Chromatogramm und zur Lokalisierung der Fettsäuren in den jeweiligen Lipidmolekülen in die Fraktionen NL (Neutrallipide), GL (Glycolipide) und PL (Polarlipide) aufgetrennt (siehe F 4.2). Eine Wägung der Lipidfraktionen ergab, dass die Gesamtlipide im Mittel ungefähr aus 30% NL, 30% GL und 7% PL bestanden. Der Vorteil der Fraktionierung bestand einerseits im Informationsgewinn über die Bindung der Fettsäuren, denn es gab bisher keine Information, in welchen Lipiden die MBFA gebunden sein könnten. Zudem ergaben sich durch die Fraktionierung „sauberere“ Spektren, da sich weniger Peaks überlagerten, als bei Messungen der Fettsäure aus Gesamtlipiden.

## E 2.4.2 Alkalische vs. saure Methylierung der Fettsäuren

Die Wasserstoffbrückenbildung in einer Fettsäurelösung erweist sich als ungünstig für GC/MS-Messungen. Daher werden die Fettsäuren vor der Messung derivatisiert, wobei im einfachsten Fall die Hydroxylgruppe der Carboxylgruppe zu einem Methylester (= FAME) methyliert wird.

Nach dem Vergleich von alkalischer- mit saurer Methanolyse der Schwammlipide, bzw. Lipidfraktionen wurde für die alkalische Methanolyse entschieden. Der Hauptgrund war, dass die Spektren „sauberer“ aussahen, d. h. weniger störende Peaks enthielten. Die Ausbeute war jedoch etwas geringer als bei der sauren Methode, aber die Verhältnisse der Fettsäuren zueinander und



deren Vorkommen waren davon nicht beeinflusst (Anhang Tab. 14). Zur Erfassung der freien Fettsäuren und nicht als *O*-Ester gebundenen Fettsäuren wurde zusätzlich eine saure Methylierung der nach der FAME-Extraktion übriggebliebenen MeOH/Wasser (M/H)-Phasen der alkalischen Methanolyse durchgeführt (siehe F 4.3.2) und separat gemessen.

### **E 2.4.3 Fettsäurekomposition der Schwämme**

Die Fettsäurekompositionen der vier HMA-Schwämme *C. mycofijiensis*, *T. swinhoei*, *A. dilatata*, und *I. felix* sowie der zwei LMA-Schwämme *D. etheria* und *D. avara* wurden mit Schwerpunkt auf methylverzweigten Fettsäuren erstellt. Es sollte die Hypothese überprüft werden, ob LMA Schwämme wegen ihres geringeren Anteils symbiotischer Bakterien weniger MBFA als HMA Schwämme haben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden von den Schwämmen insgesamt 50 Fettsäureproben mit GC/MS gemessen, die insgesamt ~450 verschiedene Peaks enthielten. Es konnten 186 verschiedene Fettsäuren identifiziert werden (Anhang Tab. 11). Die 44 am häufigsten vorkommenden Fettsäuren (>3% Anteil) sind in **Tab. 5** aufgelistet. Informationen zur Kurzschreibweise der Fettsäuren befinden sich im Abschnitt E 1.1.

#### **Gesättigte Fettsäuren [„saturated fatty acids“ (SAFA)], unverzweigt**

Die komplette Serie gesättigter, unverzweigter Fettsäuren von 11 bis 26 Kohlenstoffatomen konnte gemessen werden. Die SAFA wurden zur Berechnung der äquivalenten Kettenlängenwerte (ECL-Werte) herangezogen. Dabei wurden die Retentionszeiten der Fettsäuren im GC/MS derart in ECL-Werte umgerechnet, dass der ECL-Wert einer unverzweigten SAFA der Anzahl seiner C-Atome entspricht. Beispielsweise erhält die 15:0-Fettsäure einen ECL-Wert von 15,00. Zwischen den SAFA liegende ECL-Werte folgten dem linearen Gradienten der Retentionszeiten. Die Umrechnung der Retentionszeiten in ECL-Werte dient der besseren Vergleichbarkeit der Messungen unterschiedlicher Studien.<sup>[245]</sup> Heptadecansäure (19:0) wurde wegen ihres sehr seltenen natürlichen Vorkommens als interner Standard (IS) zur Berechnung der „mol %“-Werte verwendet. Daher konnte diese Fettsäure nicht als Schwammfettsäure gemessen werden.

Tab. 5: Diversität und Anteile (&gt; 3%) der Fettsäuren aus sechs marinen Schwämmen.

ECL	FS	<i>T. swinhoei</i>			<i>C. mycofijiensis</i>			<i>A. dilatata</i>			<i>I. felix</i>			<i>D. etheria</i>			<i>D. avara</i>		
		NL	GL	PL	NL	GL	PL	NL	GL	PL	NL	GL	PL	NL	GL	PL	NL	GL	PL
14.00	14:0	2.9	4.1	0.1	2.1	1.8	1.0	7.3	2.9	0.3	3.9	4.9	--	1.8	1.6	0.1	2.1	0.5	1.0
14.50	9Me14:0 <sup>[a]</sup>	0.3	5.7	0.1	0.2	5.2	--	0.1	4.0	--	--	0.4	--	--	--	--	--	--	--
14.65	i15:0	4.0	13.1	1.8	12.2	18.5	8.6	13.1	4.7	2.4	10.8	10.9	5.0	4.8	4.7	1.9	0.9	0.2	1.8
14.72	ai15:0	1.5	8.3	1.0	5.9	7.8	2.7	7.3	1.5	1.6	7.1	6.3	5.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.3	0.3
15.03	3Me-i15:0	0.1	0.2	0.1	1.1	0.4	0.8	--	--	--	--	4.1	1.4	--	--	--	--	--	--
15.57	16:2 Δ5,9	4.0	1.2	0.9	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
15.65	i16:0	1.9	3.4	0.9	1.6	3.7	0.7	1.8	1.1	0.4	2.5	1.9	0.8	2.3	1.9	1.4	2.1	1.1	4.8
15.73	ai16:0	1.1	0.6	0.8	1.2	0.2	1.9	0.7	0.4	--	1.1	0.1	1.2	1.9	3.2	1.1	0.9	0.4	1.5
15.77	16:1ω7	4.8	2.9	3.3	1.6	0.5	1.1	4.4	0.4	1.7	1.3	--	--	2.6	4.0	0.5	2.9	1.1	1.2
16.00	16:0	7.0	7.7	2.9	6.5	5.9	3.1	11.1	6.7	4.6	15.7	11.6	4.0	6.5	7.1	3.7	6.8	5.0	13.3
16.38	i17:1Δ9	5.4	5.7	8.2	5.7	3.6	5.0	8.6	2.5	12.4	3.5	--	3.1	--	--	--	0.7	0.3	0.9
16.45	10Me16:0	7.9	8.2	6.4	4.7	10.1	2.4	8.8	5.9	10.3	5.1	2.0	4.0	--	--	--	--	--	--
16.65	i17:0	4.3	3.0	1.8	2.1	3.1	1.1	2.9	2.8	5.5	1.5	1.5	1.3	4.1	6.1	3.8	2.3	2.6	3.6
16.73	ai17:0	2.3	2.1	1.9	1.9	4.4	1.6	2.6	3.5	1.1	1.4	1.3	1.2	1.1	1.4	1.1	1.4	1.8	2.7
17.50	18:4	1.1	0.3	--	--	--	--	0.7	0.3	--	--	--	--	0.2	--	--	7.6	1.6	0.1
17.53	18:2	0.5	--	--	0.9	--	0.5	--	--	--	--	--	--	1.9	3.3	0.6	--	--	--
17.65	18:2ω6	--	--	0.5	0.1	--	--	0.5	0.5	--	--	--	--	0.8	1.1	--	3.3	--	0.6
17.68	18:3	0.1	0.0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.3	0.3	--	3.4	0.2	--
17.75	3,7,11,15tetra Me16:0	--	--	--	--	--	--	2.8	5.0	0.5	--	--	--	--	--	0.3	0.1	7.0	--
17.78	18:1ω7	2.3	2.1	2.5	2.4	--	2.3	3.3	2.9	3.9	--	0.7	1.5	17.6	2--	18.1	4.9	10.1	3.8
18.00	18:0	1.7	1.9	2.1	3.9	2.5	0.5	2.0	2.4	1.4	8.4	3.6	2.8	1.8	2.7	2.4	2.3	5.6	1.9
18.13	11Me18:1Δ6**	--	--	--	2.1	--	3.2	--	--	--	--	--	1.8	--	--	--	--	--	--
18.42	10+11Me18:0	6.1	4.8	3.8	12.2	3.8	6.6	7.2	10.9	4.0	8.5	4.1	10.5	--	--	--	--	--	--
18.86	11,12cy19:0	0.6	2.8	1.3	1.2	4.8	0.7	1.5	3.2	2.0	1.2	0.2	0.7	0.6	--	0.3	--	--	0.1
19.26	20:4ω6?	1.4	0.4	1.3	0.5	--	0.3	1.4	0.7	1.8	--	--	--	12.5	15.9	7.1	3.2	1.8	9.0
19.31	20:5ω3?	1.3	0.4	1.3	0.3	--	--	1.3	0.8	1.7	--	--	--	7.0	11.1	1.7	5.3	1.7	8.2

19.49	N20:2 + 20:2Δ5,9	--	--	0.1	--	--	0.0	--	--	0.4	--	--	--	0.2	--	0.1	2.1	--	4.5
20.13	8Me20:1Δ7	--	--	0.1	1.8	--	7.4	--	--	--	0.1	--	3.9	--	--	--	--	--	--
20.42	14Me20:0 <sup>[a]</sup>	--	--	0.0	--	--	0.2	--	3.8	0.1	1.3	0.9	--	--	--	--	--	--	--
21.12	22:6	5.1	--	2.4	1.2	--	1.4	--	1.2	6.3	--	--	--	1.6	2.1	0.4	12.7	2.6	18.1
21.27	22:5	--	--	0.3	0.4	--	0.3	--	0.5	4.2	--	--	--	0.9	0.8	0.3	2.9	--	5.7
22.41	15Me22:0	0.5	0.4	0.4	--	--	--	0.0	3.2	0.3	--	--	3.3	--	--	--	--	--	--
23.27	2-OH22:0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.7	28.8	--	--	--	--	--	--	--
23.54	24:2Δ5,9	0.1	--	0.5	1.7	2.6	4.1	0.2	1.3	1.9	1.4	--	4.3	1.5	0.6	2.7	0.7	2.7	0.3
23.81	24:1	--	--	0.2	--	--	0.0	--	0.1	--	--	--	--	1.4	0.4	1.1	2.1	5.3	0.3
23.93	?Me24:2Δ5,9	--	--	--	0.6	3.8	0.8	--	--	--	--	--	2.8	--	--	--	--	--	--
24.18	i5,9 25:2	1.9	0.2	1.3	6.3	12.8	19.5	--	--	--	4.2	1.8	19.5	--	--	--	--	--	--
24.39	17Me24:0 <sup>[h]</sup>	1.8	0.6	2.4	1.3	--	0.7	--	1.7	--	1.8	--	6.3	--	--	--	--	--	--
24.54	25:2Δ5,9	0.2	0.4	2.0	0.6	--	1.6	1.0	4.5	11.2	--	--	5.6	5.0	1.8	12.7	2.8	4.0	1.0
25.19	i26:2Δ5,9	2.5	1.4	10.5	0.8	--	1.9	--	--	--	--	--	6.8	--	--	0.3	--	--	--
25.37	26:3Δ5,9,x	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2.3	0.8	8.5	8.2	17.2	1.0
25.55	26:2Δ5,9	0.7	0.3	2.6	0.1	--	0.4	0.7	3.3	13.1	--	--	--	10.4	3.0	23.2	6.3	11.5	0.9
26.28	i27:2Δ5,9	1.6	0.7	4.9	0.1	--	0.4	--	--	--	--	--	--	--	--	0.0	--	--	--
26.42	ai27:2Δ5,9	1.4	0.8	5.8	0.1	--	0.5	--	--	--	--	--	--	--	--	0.1	--	--	--

<sup>[a]</sup> teilweise aufgetrennt; <sup>[h]</sup> in *A. dilatata* 16Me; \*\*erstmalig in der Natur nachgewiesen

Die Fettsäuren mit gerader Anzahl an Kohlenstoffatomen dominierten die SAFA [Hexadecansäure (16:0, max. ~16%), Octadecansäure (18:0, max. ~8%), Tetradecansäure (14:0, max. ~7%)]. Die am stärksten auftretenden geradkettigen, ungesättigten Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffanzahl waren Pentadecansäure (15:0, max. ~2%) und Heptadecansäure (17:0, max. ~1%) (**Tab. 5**).

In den HMA-Schwämmen war die Summe der SAFA in den NL- und GL-Fractionen am höchsten (~15-35% und ~11-23%) und deutlich geringer in der PL-Fraktion (~6%). Die zwei LMA-Schwämme zeigten eine gleichmäßigere Verteilung der SAFA auf die drei Fraktionen, mit etwas geringeren Spitzenwerten in den NL-Fractionen (~8-18%) (**Abb. 57 A**).

### **Einfach ungesättigte Fettsäuren [“monounsaturated fatty acids” (MUFA)], unverzweigt**

In den GC/MS-Chromatogrammen gingen den SAFA in einem Abstand von max. 0,28 ECL die entsprechenden einfach ungesättigten Varianten voran. Es konnte eine komplette Serie von MUFA mit 15 bis 24 Kohlenstoffatomen gemessen werden. Es traten jeweils zwei ungesättigte Isomere derselben Kettenlänge auf, außer im Falle von N18 und N20, bei denen es sich um drei, bzw. vier Isomere handelte (**Tab. 5**, Anhang Abb. 35, Anhang Tab. 11).

Die Fettsäuren Octadec-11-ensäure (18:1 $\omega$ 7) und Hexadec-9-ensäure (16:1 $\omega$ 7) wiesen unter den MUFA die höchste Abundanz in allen Schwämmen auf. Die Fettsäure 18:1 $\omega$ 7 wird oft als Biomarker für Bakterien verwendet,<sup>[246, 247]</sup> wohingegen die 16:1 $\omega$ 7-Fettsäure auch von Eukaryoten biosynthetisiert wird. Interessanterweise hatte die 18:1 $\omega$ 7-Fettsäure ihre höchsten Anteile in den LMA Schwämmen *D. etheria* (~18-20%) und *D. avara* (~4-11%) und nicht in den Schwämmen mit höherem bakteriellen Anteil (<4%). Die Ursache dafür bleibt unklar. Die verhältnismäßig hohen Anteile der Fettsäure 18:1 $\omega$ 9 in den zwei LMA Schwämmen könnten sich mit einem hohen Aufkommen an cyanobakteriellen Symbionten erklären lassen.<sup>[246, 248]</sup>

Die höchsten Werte unverzweigter MUFA (bis zu ~26%, *D. etheria*, GL-Fraktion) wurden in den LMA Schwämmen gefunden. Hier übertraf sogar der MUFA-Gehalt den SAFA-Gehalt. Der geringste MUFA-Gehalt wurde in *I. felix* (GL-Fraktion) mit 3,4% gefunden. In den HMA Schwämmen, im Gegensatz zu den

LMA-Schwämmen, enthielten die GL-Fraktionen stets geringere Mengen an MUFA als die NL- und PL-Fraktionen (**Abb. 57 B**).

### **Mehrfach ungesättigte Fettsäuren [“polyunsaturated fatty acids” (PUFA)], unverzweigt**

Ein großer Unterschied zwischen HMA- und LMA-Schwämmen bestand in ihrem Anteil an (Methylen-unterbrochenen) PUFA. Normalerweise enthalten Schwämme keine größeren Mengen dieser Fettsäuren,<sup>[249, 250]</sup> sondern eher nicht-Methylen-unterbrochene, sogenannte Demospongien-Säuren („demospongiac acids“<sup>[251]</sup>). Im Gegensatz dazu enthielten die LMA-Schwämme in der vorliegenden Untersuchung eine große Menge PUFA (bis zu 53% in *D. avara* PL), die HMA-Schwämme wiesen dagegen nur geringere Anteile dieser Substanzen auf (bis zu 18% in *A. dilatata* PL), oder besaßen sogar gar keine Vertreter dieser Fettsäure-Gruppe (*I. felix*) (**Abb. 57 C**).

Die höchste Isomerendiversität hatten die PUFA mit 22 und 20 C-Atomen [6 Isomere (N22), 7 Isomere (N20)], gefolgt von den PUFA mit N18 (5 Isomere), N21 (4), N24 (2), N23 (2), N19 und N16 (1 Isomer).

Die PUFA mit der höchsten Abundanz waren die Arachidonsäure (20:4 $\omega$ 6, max. ~11% in *D. etheria* GL) und Eicosapentaensäure [EPA (**49**), 20:5 $\omega$ 3, max. ~16% in *D. etheria* GL] sowie Docosahexaensäure [DHA (**47**), 22:6 $\omega$ 3, mit ~18% in PL die hervorstechendste Fettsäure in *D. avara*] und Docosapentaensäure [DPA (**48**) 22:5, max. ~6% in *D. avara* PL].

Bei näherer Betrachtung der einzelnen Unterfraktionen der PL (PL1, PL2, PL3, PL4, siehe F 4.2) fiel auf, dass die PUFA in den polarsten Unterfraktionen PL3 und PL4 deutlich präsenter waren, als in den PL1 und PL2 Fraktionen (Anhang Tab. 12). Die Unterfraktionen PL3 und PL4 enthalten hauptsächlich die Lipide Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylcholin (PC), lysoPC und Sphingomyelin (SM), wohingegen die PL1- und PL2-Unterfraktionen hauptsächlich die Lipide Diphosphatidylglycerol (DPG), Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) enthalten.

Laut Literaturangaben befinden sich bakterielle Fettsäuren der polaren Lipide meist in PE, PS, PG/DPG, PI und selten (~10% der Spezies) in PC.<sup>[252, 253]</sup> Als polare Lipide aus Eukaryoten werden am häufigsten PC, PI und SM genannt,<sup>[253]</sup> geringe Anteile an PE, PS und PG kommen jedoch auch in Eukaryoten vor.<sup>[254]</sup>

Daher geben die Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass die PUFA nicht aus bakteriellen Zellmembranen, sondern aus eukaryotischen Zellen stammen könnten. Das unterstreicht auch die Tatsache, dass diese Fettsäuren vor allem in den bakterienarmen Schwämmen vorhanden waren. Als mögliche Quelle der PUFA in den HMA-Schwämmen sind vor allem schwammassoziierten Protisten zu nennen, z. B. aus Vertretern der Phyla Dinoflagellata<sup>[247]</sup> und Heterokonta. Desweiteren können auch symbiotische Cyanobakterien PUFA mit 18 C-Atomen biosynthetisieren,<sup>[255]</sup> die dann vom Schwamm-Wirt aufgenommen und zu LC-PUFA verlängert werden können.

Gegen eine Produktion der PUFA in Schwammzellen selber (und für einen cyanobakteriellen Ursprung) spricht die Tatsache, dass der prozentuale Anteil der Fettsäuren 18:2 $\omega$ 6, 18:3 und 18:4 in der NL-Fraktion von *D. avara* deutlich höher als in den GL und PL Fraktionen. Die NL-Fraktion spiegelt von allen Fraktionen den Ernährungsstatus der Schwamm/Symbionten-Gemeinschaft wider, da sie hauptsächlich aus Speicherlipiden besteht, und praktisch keine Membranlipide enthält. Cyanobakterien besitzen eine von anderen Bakterien sehr verschieden abweichende PL-Zusammensetzung,<sup>[256]</sup> sodass sie aufgrund der Analyse der PL-Unterfraktionen nicht als Ursprung der PUFA ausgeschlossen werden können.

Als prokaryotische Quellen von PUFA der  $\omega$ 3- und  $\omega$ 6-Gruppe sind (neben den erwähnten Cyanobakterien) lediglich einige wenige Vertreter der  $\gamma$ -Proteobacteria und Bakterien des CFB-Phylums (*Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Bacteroides*) aus kalten marinen Habitaten<sup>[145]</sup> bekannt, wohingegen die untersuchten Schwämme alle aus Warmwasser-Habitaten stammen.

### **Demospongien-Säuren ("demospongiac acids")**

Diese Fettsäuren haben eine typische Sequenz von zwei oder mehreren Doppelbindungen, beginnend mit den Positionen  $\Delta$ 5 und  $\Delta$ 9. Sie können im Massenspektrum sehr einfach an typischen Fragmenten detektiert werden. Im Falle der FAME sind das die prominenten Ionen  $m/z$  81 und 109 sowie ein vorhandenes Molekülion ( $M^+$ ). Ungeachtet des Namens gibt es auch Vorkommen dieser Fettsäuren außerhalb von Schwämmen, z. B. in Seeanemonen.<sup>[257]</sup> Alle sechs in der vorliegenden Arbeit auf FS hin untersuchten Schwämme (LMA wie HMA-Schwämme) gehörten dem Taxon „Demospongiae“ an und enthielten Demospongien-Säuren in großer Anzahl und Abundanz.

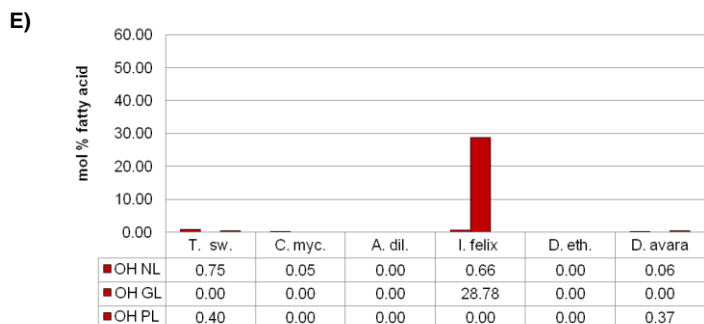
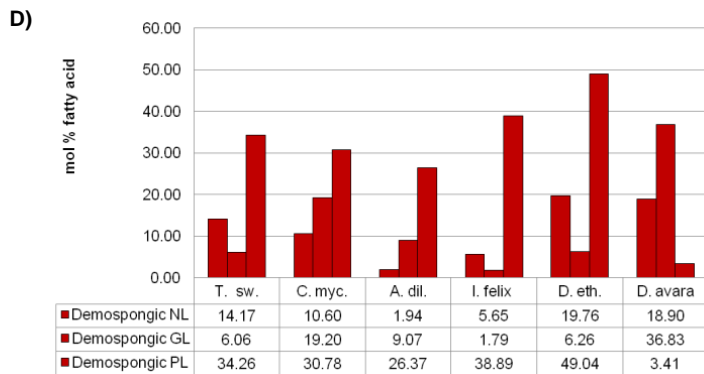
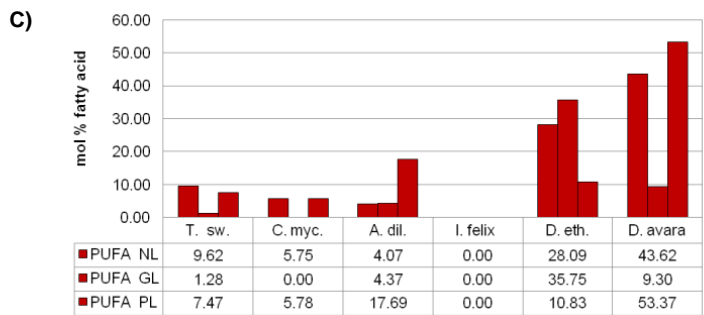
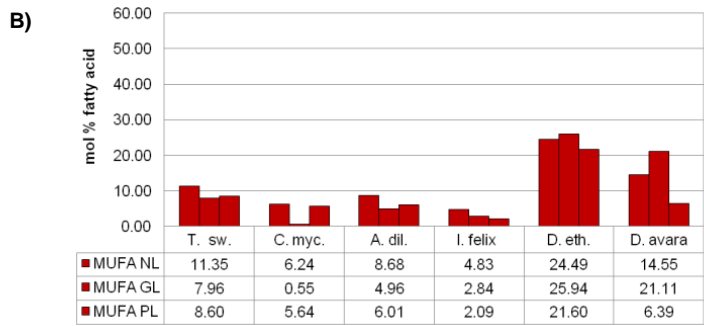
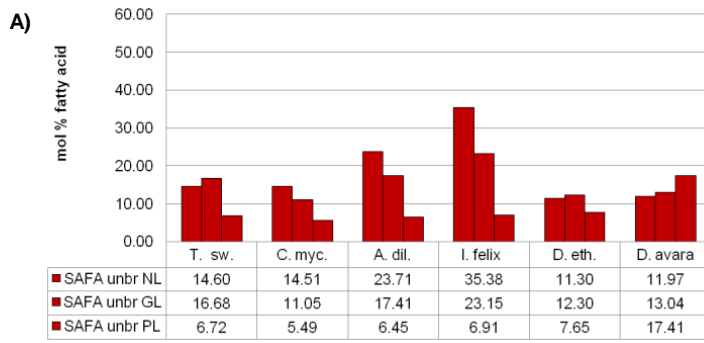
Der größte Anteil an Demospongien-Säuren wurde in den PL-Fraktionen von *D. etheria* (~49%) und *I. felix* (~36%) gefunden. Besonders geringe prozentuale Anteile dieser Fettsäuren fanden sich in *D. avara* (PL, ~3.4%), *I. felix* (GL, ~1.8%) und *A. dilatata* (NL, ~1.9%) (**Abb. 57 D**).

Die unverzweigten Demospongien-Säuren 16:2 $\Delta$ 5,9, N18, N20, N22; N23, N24, N25, N26 und N27 konnten gemessen werden, wobei die 26:2 $\Delta$ 5,9-Fettsäure die abundanteste Fettsäure unter ihnen war (*D. etheria* PL, ~23%). Es wurden auch zwei dreifach ungesättigte Demospongien-Säuren gefunden: 24:3 $\Delta$ 5,9,x und 26:3 $\Delta$ 5,9,x. Letztere war in *D. avara* GL mit ~17% am häufigsten. Das „x“ in der Fettsäure-Bezeichnung steht für eine noch unbekannt Position der dritten Doppelbindung.

Bei der Analyse der vier PL-Subfraktionen fiel die gegensätzliche Verteilung der Demospongien-Fettsäuren im Vergleich zu den PUFA auf (siehe vorheriger Abschnitt, Anhang Tab. 12). Den höchsten Anteil besaßen die zwei unpolaren Fraktionen PL1 und PL2. Diese Beobachtung stimmt auch mit der Literatur überein, wonach sich Demospongien-Säuren zumeist in den PS- und PE/DPG-Fraktionen der polaren Lipide befanden.<sup>[258]</sup> Da diese Lipide als typische bakterielle Lipide gelten, spricht dies für einen bakteriellen Ursprung der Demospongien-Säuren. Jedoch gibt es Biosynthesestudien, denen zufolge diese Fettsäuren durch den Schwamm selbst produziert werden, wenn auch aus bakteriellen Vorstufen.<sup>[259, 260]</sup>

Viele *i/ai*-verzweigte Demospongien-Säuren wurden in allen untersuchten Schwämmen gefunden und zusätzlich auch eine mittkettig verzweigte Variante dieser Fettsäuren. Die *i/ai*-verzweigten Fettsäuren erschienen in den Chromatogrammen stets ~0,4 ECL (*i*) und ~0,25 ECL (*ai*) vor ihren unverzweigten Isomeren mit derselben Masse.

In den Diagrammen wurden alle Demospongien-Fettsäuren zusammen in einer Gruppe erfasst, da sie aufgrund ihrer Biosynthese eine Einheit bilden.



**Abb. 57:** Diagramme der prozentualen Anteile unverzweigter Fettsäuren aus sechs marinen Schwämmen, getrennt nach den drei Lipidfraktionen (NL, GL, PL). **A)** unverzweigte, gesättigte FS. **B)** einfach ungesättigte FS. **C)** polyungesättigte FS. **D)** Demospongin-FS. **E)** Hydroxy-FS. T. sw., *T. swinhoei*; C. myc., *C. mycofijiensis*; A. dil., *A. dilatata*; D. eth., *D. etheria*.



### Hydroxy-Fettsäuren

Drei gesättigte Hydroxy-Fettsäuren konnten zweifelsfrei als 2-OH16:0, 2-OH17:0 und 2-OH22:0 bestimmt werden. Die 2-OH17:0-Fettsäure kam nur in *T. swinhoei* (max. 0,6% in NL), die 2-OH16:0-Fettsäure in *T. swinhoei*, *C. mycofijiensis* und *D. avara* mit max. 0,4% (*D. avara* PL) vor. Außergewöhnlich hoch war der Anteil der 2-OH22:0-Säure an den Fettsäuren von *Ircinia felix*. Diese Hydroxy-Fettsäure kam nur in *I. felix* vor und erreichte in der GL Fraktion ~29%. In der PL Fraktion war sie nach starker saurer Hydrolyse und Methylierung ebenfalls mit ~29% vertreten. Letzteres gibt einen Hinweis darauf, dass diese Fettsäure (zumindest in der PL-Fraktion) möglicherweise nicht in einem Ester-Lipid gebunden war (**Abb. 57 E**).

### Cyclopropyl-Fettsäuren

Zwei Cyclopropyl-verzweigte Fettsäuren (cy17:0 und cy19:0) wurden detektiert. Sie zeichneten sich zwar durch mit den entsprechenden MUFA derselben Massen identische FAME-Massenspektren aus, konnten aber als Picolinylester bzw. Pyrrolidide bestimmt werden. Die Cyclopropyl-Fettsäuren werden häufig als Biomarker für Bakterien verwendet, kommen dessen ungeachtet aber auch vereinzelt in Pflanzenölen vor.<sup>[261, 262]</sup>

Genau wie andere Fettsäuren auch, können sie mit der Nahrung in nichtproduzierende Organismen gelangen, oder von bakteriellen Symbionten produziert werden. Das würde ihr Vorkommen in marinen Tieren, wie Fischen und Schwämmen erklären.

Die Biosynthese der Cyclopropyl-Fettsäuren geht von 16:1 $\omega$ 7- und 18:1 $\omega$ 7-Vorläufern aus, an die eine von SAM abstammende Methylgruppe über die Doppelbindung addiert wird. Das Resultat sind dann die Fettsäuren cy17:0 bzw. cy19:0. Die Addition der Methylgruppe erfolgt stets zeitlich nach der Biosynthese des Phospholipids und meistens in der stationären Wachstumsphase der Bakterien.<sup>[261, 262]</sup>

Interessanterweise kam die cy17:0-Fettsäure in den zwei LMA Schwämmen überhaupt nicht vor, und die cy19:0-Säure war nur in ganz geringen Anteilen vorhanden (max. 0,6% in *D. etheria* NL). Das könnte die relative geringe Menge an bakteriellen Symbionten in den LMA-Schwämmen widerspiegeln. Bei den

HMA Schwämmen hatte die Fettsäure cy19:0 max. Werte von ~3-5%, mit Ausnahme von *I. felix* (0,2-1,2%). Die cy17:0-Fettsäure war generell weniger abundant als die cy19:0-Säure. In *T. swinhoei* kam sie mit 0,4-0,8% in allen drei Fraktionen vor, in *C. mycofijiensis* mit ~0.3% NL und PL und in *I. felix* mit 0,4% in der GL-Fraktion.

### Terminal verzweigte Fettsäuren

In der Literatur werden die terminal verzweigten Fettsäuren oft als Biomarker für Bakterien verwendet, da sie hauptsächlich in Bakterien vorkommen, bzw. die vereinzelt Berichte dieser Fettsäure aus Eukaryoten leicht abgrenzbar sind. Besonders Gram-positive Bakterien gelten als reiche Quelle dieser Gruppe von Fettsäuren.

Die Biosynthese von terminal verzweigten Fettsäuren erfolgt durch die Verwendung der methylverzweigten Startereinheiten Isobutyryl-CoA (für *i*-Fettsäuren) und Isovaleryl-CoA (für *ai*-Fettsäuren).

In der vorliegenden Untersuchung der Schwammfettsäuren befanden sich Methyl-Verzweigungen am vorletzten Kohlenstoffatom (= *iso*,  $\omega$ 2) oder am drittletzten C-Atom (= *anteiso*,  $\omega$ 3) hauptsächlich an gesättigten Fettsäuren. Sie kamen aber in einigen wenigen Fällen auch an einfach ungesättigten Fettsäuren vor. Auch die oben erwähnten Demospongien-Säuren wiesen oft eine terminale Verzweigung auf. Dies ist auf die Verlängerung von bereits verzweigten, von Bakterien produzierten Fettsäuren durch die Schwammzellen zurückzuführen.<sup>[259, 260]</sup> In dieser Arbeit wurden die Demospongien-Säuren wegen ihrer Biosynthese als eine Einheit betrachtet und daher deren verzweigte Vertreter nicht der Gruppe der terminal-verzweigten Fettsäuren zugerechnet (**Abb. 57** und **Abb. 58**). Die in der Literatur beschriebenen *i/ai*-verzweigten Methoxy-Fettsäuren<sup>[263]</sup>, sowie Neo-Fettsäuren<sup>[264]</sup> konnten in keinem der sechs untersuchten Schwämme gefunden werden.

Generell wiesen die HMA-Schwämme gegenüber den LMA-Schwämmen einen höheren Anteil an *i/ai*-Fettsäuren auf (**Abb. 58 A,B**). Auch wurden die höchsten prozentualen Anteile terminal verzweigter Fettsäuren in HMA Schwämmen gefunden.

*Iso-Fettsäuren (i)*

Die *i*-Fettsäuren waren in den untersuchten Schwämmen im Allgemeinen immer abundanter als ihre *ai*-Isomere. In den GL Fraktionen von *T. swinhoei* und *C. mycofijiensis* wurden ~27% bzw. ~29% dieser Fettsäuren gefunden. *A. dilatata* hatte ~28% *i*-Fettsäuren in der NL-Fraktion. Im Vergleich dazu waren in den LMA Schwämmen die Anteile der *i*-Fettsäuren nie höher als ~13%. Die geringsten *i*-Fettsäurewerte wurden in den PL von *D. etheria* (~7,4%) und den NL von *D. avara* (~6,2%) gefunden. Letzteres könnte, ähnlich wie bei den Cyclopropyl-Fettsäuren, die geringere Anzahl schwammassoziiertes Bakterien in den LMA-Schwämmen widerspiegeln.

Die komplette Serie *i*-verzweigter gesättigter Fettsäure von *i*13:0 bis *i*25:0 konnte gemessen werden. Alle diese Fettsäuren hatten ECL-Werte von ~0,35 ECL weniger als die korrespondierenden unverzweigten SAFA mit gleicher Masse. Den höchsten prozentualen Anteil hatte die *i*15:0-Fettsäure mit max. ~18% in *C. mycofijiensis* GL, womit diese Fettsäuren sogar zu den abundantesten Fettsäuren der HMA-Schwämme zählt. In den LMA-Schwämmen erreichte die *i*15:0 nur max. Werte von 4,8% (*D. etheria* NL). Die *i*17:0-Fettsäure war gleichmäßiger über die zwei Schwammtypen verteilt: Sie erreichte Werte von max. ~6% in *D. etheria* GL und ~5,5% in *A. dilatata* NL.

Sehr selten waren einfach ungesättigte *i*-verzweigte Fettsäure zu verzeichnen: Die *i*25:1-Fettsäure wurde in sehr geringen Anteilen gefunden (0,14% in *C. mycofijiensis* PL-Fraktion). Lediglich die *i*17:1-Fettsäure kam in einer Menge in allen HMA-Schwämmen vor, die über Spuren hinausging. Ihr max. Anteil war ~12% in der PL-Fraktion von *A. dilatata*. In den LMA-Schwämmen war die *i*17:1-Säure entweder gar nicht vorhanden (*D. etheria*), oder besaß nur einen Anteil von weniger als 1% (*D. avara*). Die Doppelbindung der *i*17:1 befindet sich laut Massenspektrum wahrscheinlich in  $\Delta$ 9-Position (Anhang Abb. 48).

*Anteiso-Fettsäuren (ai)*

Ebenso wie die *i*-Fettsäuren waren die *ai*-Fettsäuren fast ausnahmslos gesättigte Fettsäure mit einer Anzahl von Kohlenstoffatomen die von N11 bis N25 reichte. Zu einer kompletten Serie fehlten lediglich die Fettsäuren *ai*12:0 und *ai*14:0. Die vorherrschenden *ai*-Fettsäuren waren die *ai*15:0 und *ai*17:0 (max. ~8%, bzw. 4% in *C. mycofijiensis* GL) In den LMA Schwämmen erreichten die einzelnen *ai*-

Fettsäuren nicht mehr als ~0,5% Anteile an den Fettsäuren der jeweiligen Fraktionen, was wiederum als Ausdruck der geringeren Anzahl bakterieller Symbionten gewertet werden kann.

Ähnlich wie bei den *i*-Fettsäuren gab es auch bei den *ai*-Fettsäuren lediglich zwei einfach ungesättigte Vertreter: die *ai*17:1 und die *ai*25:1. Beide besaßen nur sehr geringe prozentuale Anteile (<1%) und waren schwer zu bestimmen. Die *ai*17:1 hatte dieselbe ECL wie die 10Me16:0 (**59**) und konnte daher nur in *D. avara* detektiert werden. Die *ai*25:1 erschien als kleiner Peak in *I. felix* und *C. mycofijiensis* sehr knapp nach der 17Me24:0.

Alle *ai*-Fettsäuren zusammengenommen (exklusive der Demospongien-Säuren) betrug ihr Anteil max. ~12% in *T. swinhoei* GL und *C. mycofijiensis* in den GL-Fraktionen. Die geringsten Vorkommen an *ai*-Fettsäuren waren im Bereich von ~3% in den Fraktionen *D. etheria* PL, *D. avara* NL und *A. dilatata* (PL) zu finden (**Abb. 58 B**).

#### *Ante-anteiso-Fettsäuren (aai)*

Fettsäuren mit einer Methylverzweigung an viertletzter Position (= ω<sub>4</sub>) kommen in der Natur wesentlich seltener vor als solche mit einer *i*- oder *ai*-Verzweigung. Sie werden als *aai*-Fettsäuren bezeichnet. In den Chromatogrammen erscheinen deren Peaks etwas vor den Peaks der *i*-Isomere gleicher Masse, ~0,40 ECL vor dem unverzweigten Isomer gleicher Masse. Schreiber *et. al.* berichteten geringe Mengen (~0,3%) von *aai*19:0 in Kalkschwämmen (Calcarea), wohingegen *i/ai*-Fettsäuren Anteile von ~40% ausmachten. Weil generell keine MBFA gefunden wurden, wurde auf das Fehlen von MBFA-produzierenden Symbionten in Kalkschwämmen geschlossen.<sup>[265]</sup>

Das Ergebnis jener Studie<sup>[265]</sup> sowie die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit (siehe Abschnitt MBFA), lassen stark auf verschiedene Biosynthesewege von *aai*-Fettsäuren und MBFA aus verschiedenen Organismen schließen. Daher wurden die *aai*-Fettsäuren in die Gruppe der terminal verzweigten Fettsäure mit einbezogen.

Bis dato gibt es in der Literatur nur eine überschaubare Anzahl von Berichten über Vorkommen von *aai*-Fettsäure in der Natur: die Fettsäuren *aai*15:0,17:0,18:0, und *aai*N19:0 wurden ausschließlich in marinen Schwämmen gefunden.<sup>[249, 266, 267]</sup> Die *aai*14:0 war nur im Fischöl,<sup>[268]</sup> und die am häufigsten

vorkommende *aai*-Fettsäure ist die *aai16:0*-Säure mit Vorkommen in marinen Schwämmen,<sup>[250, 269, 270]</sup> einer Weichkoralle (Gorgoniidae)<sup>[271]</sup> und in Fischöl.<sup>[268]</sup> In der vorliegenden Untersuchung waren die dominanten Vertreter der *aai*-Fettsäure die *aai18:0* und *aai17:0*. Erstere kam nur in den zwei LMA-Schwämmen vor und erreichte dort Werte von max. ~1,3% in *D. avara* GL. Die *aai17:0* hingegen war zwar ebenfalls hauptsächlich in den *Dysidea* Schwämmen (max. 0,71%) vorhanden, konnte aber auch in Spuren in *A. dilatata* (GL) und *C. mycofijiensis* (PL) gefunden werden. Ähnlich war es mit der *aai19:0*, die ihre höchsten Anteile in *D. avara* (max. 0,54% in GL) hatte, aber in Spuren (>0,05%) auch in *C. mycofijiensis* vorkam. Die *aai15:0* wurde in *T. swinhoei* (PL, 0,6%) und *C. mycofijiensis* (0,02%) gemessen, die *aai16:0* hingegen, kam nur in *D. avara* (max. ~0,2%) vor. Die *aai14:0* konnte in *T. swinhoei* (GL, 0,04%) erstmalig in einem Schwamm detektiert werden.

Alle *aai*-Fettsäuren zusammengenommen, ergab sich ganz deutlich, dass diese Fettsäuren hauptsächlich in den LMA Schwämmen vorkamen (z. B. *D. avara*, max. ~2,2% in GL). In den HMA Schwämmen waren sie nur in Spuren vertreten. Ihr Anteil in HMA-Schwämmen war stets <0,1%, mit Ausnahme von *T. Swinhoei* PL (~0,6%) (**Abb. 58 C**).

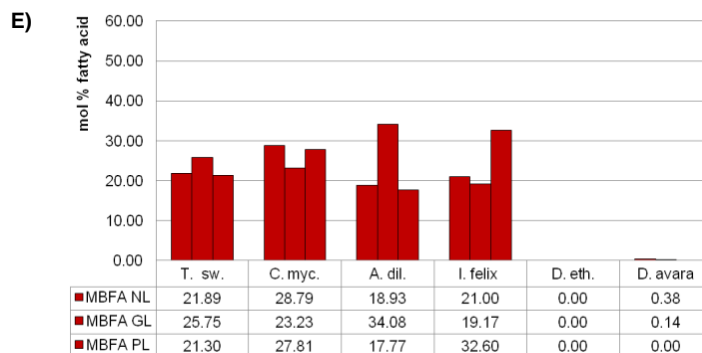
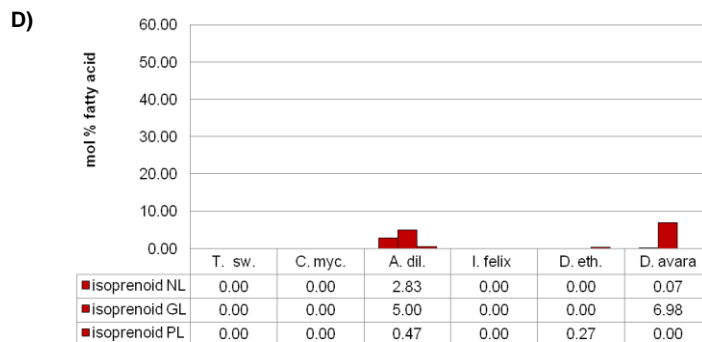
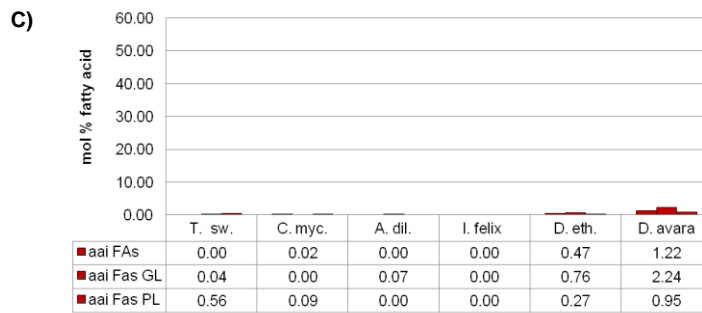
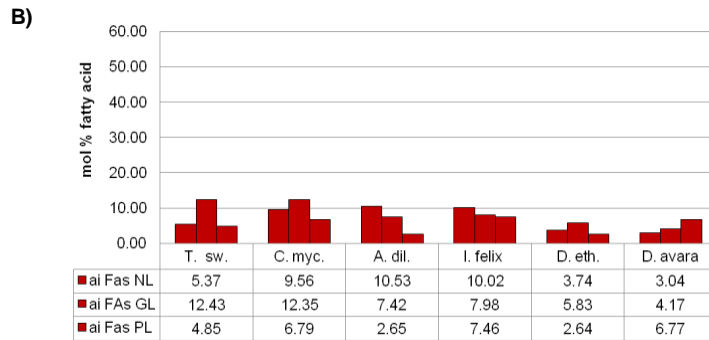
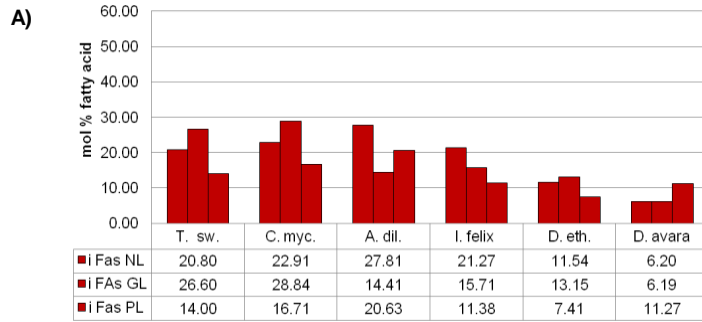
Bezüglich der Verteilung auf die 4 Unterfraktionen der PL ließ sich feststellen, dass die *aai*-FS vorzugsweise in den PL3- und PL4-Fraktionen zu finden waren, in denen sich für Eukaryoten typische PL befinden (siehe Abschnitt PUFA, Anhang Tab. 12). Zusammen mit der analogen Verteilung der PUFA in den LMA-Schwämmen bestätigt das Ergebnis den offensichtlich geringen Anteil von Fettsäuren bakterieller Herkunft in diesen Schwämmen.

### Isopren-Fettsäuren

Nur eine von Isopren abgeleitete Fettsäure konnte in den sechs Schwämmen gefunden werden: die 3,7,11,15-tetraMe16:0, auch Phytansäure genannt. Diese Fettsäure wird unter Verwendung von Abbauprodukten des Chlorophylls biosynthetisiert.<sup>[253, 272]</sup>

Phytansäure kam hauptsächlich in den GL-Fraktionen von *D. avara* (~7%) und *A. dilatata* (~5%) vor. In *D. etheria* (nur PL) erreichte diese Fettsäure lediglich einen prozentualen Anteil von 0,27% und fehlte gänzlich in *T. swinhoei*, *C. mycofijiensis* und *I. felix* (**Abb. 58 D**).

## E Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 58:** Diagramme der prozentualen Anteile methylverzweigter Fettsäuren aus sechs marinen Schwämmen, getrennt nach den drei Lipidfraktionen (NL, GL, PL). **A)** *i*-FS. **B)** *ai*-FS. **C)** *aai*-FS. **D)** Isopren-FS. **E)** MBFA. T. sw., *T. swinhoei*; C. myc., *C. mycofijiensis*; A. dil., *A. dilatata*; D. eth., *D. etheria*.

### **Mittkettig verzweigte Fettsäuren [“mid chain branched fatty acids” (MBFA)]**

Für viele marine Schwämme ist das Vorkommen von methylverzweigten Fettsäuren in diversen Variationen der Kettenlänge, Position und Anzahl der Methylgruppe(n), usw., sehr charakteristisch. MBFA sind Fettsäuren beliebiger Länge, die Methylverzweigungen besitzen, jedoch nicht zu den in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Gruppen (terminal verzweigte Fettsäuren, Isopren-Fettsäuren) gehören.

MBFA sind in rezenten Organismen sehr seltene Lipidbestandteile. Ihr Vorkommen ist außerhalb von marinen Schwämmen auf wenige Bakterientaxa beschränkt. Hier sind vor allem Bakterien der CMN-Gruppe zu nennen, die meist MBFA mit Kettenlängen von C16-20 mit nur einer Methylgruppe an C10, C11 oder C12 besitzen.<sup>[273-276]</sup> Beispielsweise in Mykobakterien sind MBFA Bestandteile von Lipiden einer sehr festen, der Plasmamembran vorgelagerten, Zellumhüllung, die diese Bakterien wie eine „Festung“ schützen.<sup>[136]</sup> Auch in Eukaryoten gibt es Vorkommen von MBFA: Neben Fischöl,<sup>[268]</sup> dessen sehr geringer MBFA-Anteil möglicherweise bakterieller Herkunft ist, gibt es Vorkommen von MBFA in der Vernix caseosa („Käseschmiere“) von neugeborenen Menschen,<sup>[277]</sup> in den Harderian’schen Drüsen (z. B. von Meerschweinchen),<sup>[278]</sup> in den Bürzeldrüsen einiger Vogelarten (z. B. Flamingos)<sup>[279]</sup> sowie im Unterhaut-Fettgewebe von Wiederkäuern (Ruminantia), z. B. Schafen.<sup>[280]</sup> Die tierischen MBFA stellen allerdings eine seltene Sondergruppe dar, da sie fast ausschließlich multimethyliert sind und meist von „normalen“ FAS unter Einbau von methylierten Bausteinen, die in speziellen Geweben hochkonzentriert vorhanden sind, biosynthetisiert werden.

Interessanterweise sind in fossilen Sedimenten und Brennstoffen große Mengen von Alkanen mit ähnlich gearteten Verzweigungen zu finden. Das lässt den Schluss zu, dass solche Lipide vor langer Zeit von Organismen produziert wurden, die es heute kaum oder nicht mehr gibt. Daher gelangten Thiel *et al.* zu der Hypothese, dass die - phylogenetisch sehr alten - Schwämme eine letzte ökologische Nische dieser Bakterien sein könnten.<sup>[281]</sup>

Die MBFA in marinen Schwämmen werden als Produkt bakterieller Symbionten vermutet.<sup>[281-283]</sup> Näheres über ihre Funktion ist jedoch nicht bekannt.

Möglicherweise haben sie analog zu strukturähnlichen Fettsäuren aus pathogenen Mykobakterien Aufgaben bei der Besiedelung des Wirtes und dem Überleben im Wirt als Symbiont. Lediglich MBFA mit mehr als 20 Kohlenstoffatomen werden als schwammproduziert angesehen, wenn auch aus bakteriellen Vorstufen.<sup>[259, 260, 284]</sup> MBFA werden auch als mögliche Produkte der SupA-PKS vermutet. Daher war es besonders interessant, HMA- mit LMA-Schwämmen bezüglich dieser Fettsäuren zu vergleichen.

In der vorliegenden Untersuchung von sechs Schwämmen konnten 47 verschiedene MBFA gemessen werden. Die höchste Diversität an MBFA (n=43) war im Schwamm *C. mycofijiensis* zu verzeichnen.<sup>[241]</sup> Dieser hohe Wert wird in der Literatur nur von dem HMA Schwamm *Agelas oroides* übertroffen.<sup>[281]</sup>

Die große Mehrheit der in den Schwämmen gefundenen MBFA waren gesättigte Fettsäuren mit einer einzelnen Methylverzweigung. Manchmal besaßen die MBFA zusätzlich noch eine terminale *i-/ai*-Verzweigung, was Dimethylverzweigte MBFA ergab. Noch seltener kamen einfach ungesättigte MBFA vor. Aus dieser Untergruppe gab es fünf Vertreter. Nur eine mehrfach ungesättigte MBFA konnte gemessen, aber nicht genau bestimmt werden. Da sie mit Sicherheit eine Demospongiensäure war, wurde sie zu jener Gruppe gezählt.

Interessanterweise war der Kontrast zwischen LMA und HMA Schwämmen in Bezug auf Vorhandensein von MBFA extrem groß. Während in den vier „Bakterienschwämmen“ zwischen ~18% (*A. dilatata* PL) und ~34% (*I. felix* GL) der Fettsäuren MBFA waren, enthielten die zwei bakterienarmen *Dysidea* Schwämme gar keine (*D. etheria*), bzw. nur 0,38% (*D. avara* NL) dieser Fettsäuren (**Abb. 58 E**). Der sehr geringe Anteil in *D. avara* kam zudem durch nur eine einzige MBFA (7Me16:1Δ9?) zustande.

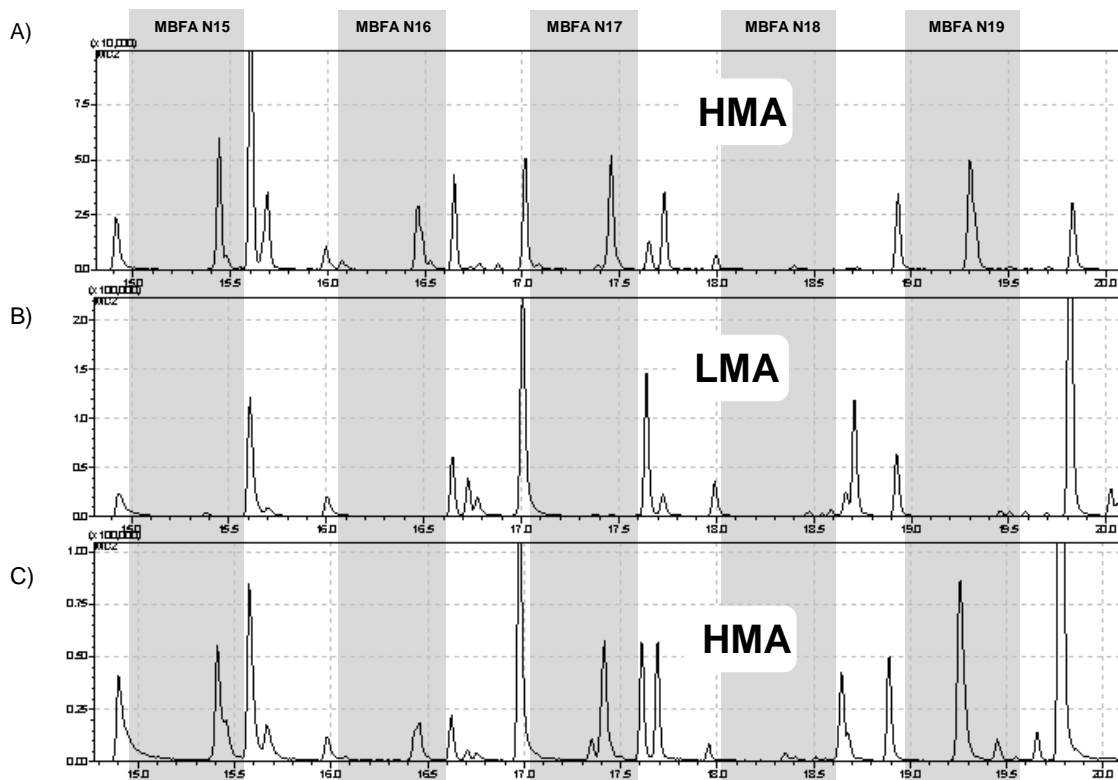
Die Verteilung der MBFA auf die NL-, GL- und PL-Fraktionen war gleichmäßig, ebenso wie die Verteilung auf die vier Unterfraktionen der PL. Eine Ausnahme bildete die GL-Fraktion von *A. dilatata*, die einen fast doppelt so hohen Anteil an MBFA als die entsprechenden NL- und PL-Fraktionen besaß.

Die zweite Ausnahme war, dass in *C. mycofijiensis* die PL3- und PL4-Unterfraktionen prozentual etwas mehr MBFA enthielten als die PL1- und PL2-Unterfraktionen der PL. Diese Verteilung entspricht in etwa der der MUFA und



PUFA und ist gegensätzlich zur Verteilung der *i*-Fettsäuren und Demospongien-Säuren ( Anhang Tab. 12).

Aus den Chromatogrammen der FAME ließ sich bereits auf den ersten Blick zwischen HMA- und LMA-Schwämmen unterscheiden. Der Grund ist, dass die in den HMA-Schwämmen prominenten MBFA als deutlich große Peaks ungefähr mittig zwischen zwei aufeinanderfolgenden SAFA-Peaks auszumachen waren. Besonders zwischen der 16:0 und 17:0 und der 18:0 und 19:0 befanden sich die größten Peaks der Monomethyl-MBFA (**Abb. 59**, Anhang Abb. 35).



**Abb. 59:** Vergleich von HMA und LMA Schwämmen. MIC  $m/z$  74. **A)** *Theonella swinhoei* (GL, Probe 0802); **B)** *Dysidea etheria* (GL, Probe 1808); **C)** *Agelas dilatata* (GL, Probe 1707). Grau unterlegt sind die Bereiche des Chromatogramms, in denen MBFA auftreten können. Abbildung aus Hochmuth *et al.* 2010.<sup>[12]</sup>

### Gesättigte Monomethyl-MBFA

Die meisten MBFA aus den sechs Schwämmen waren gesättigte Fettsäuren mit einer Methylgruppe. Bezüglich ihrer Anzahl an C-Atomen reichten sie mit Ausnahme von N22 lückenlos von N15 (2Me14:0) bis N25 (17Me24:0). Generell waren die Fettsäuren mit Methylgruppen an geradzahligen C-Atomen der Kette stärker vertreten, als solche mit Methylgruppen an ungeradzahligen C-Atomen.

Die Peaks der Fettsäuren 11-Methyloctadecansäure (**58**) (11Me18:0) und 10-Methylhexadecansäure (**59**) (10Me16:0) gehörten zu den prominentesten in den Chromatogrammen der HMA-Schwämme. Die 11Me18:0-Fettsäure (**58**) erschien allerdings nicht als ein einzelner isolierter Peak. Jedoch mit Hilfe von diagnostischen Fragmenten in den Massenspektren der FAME (Anhang Tab. 13) und Pyrrolidide konnte eindeutig festgestellt werden, dass der 11Me18:0-Peak (ECL 18.42) fast nur 11Me18:0 (**58**) enthielt. Ein geringer Anteil im linken Teil des Peaks war die 10Me18:0-Fettsäure. Manchmal erschien auch die 12Me18:0-Säure als kleine rechte Schulter (Anhang Abb. 43). Die 11Me18:0 (**58**)-Fettsäure hatte mit ~12,2% den höchsten prozentualen Anteil (*C. mycofijiensis* NL). In der PL Fraktion dieses Schwammes war die 11Me18:0 (**58**)-Fettsäure mit ~6,6% sogar die viert-abundanteste Fettsäure aller Schwämme. Die Fettsäure 10Me16:0 (**59**) hatte als ebenfalls teilweise aufgelöster Peak ihr 11Me-Isomer als kleinere rechte Schulter. In *C. mycofijiensis* erzeugte sie mit ~10% den dritt-abundantesten Peak der GL-Fraktionen ( **Tab. 7** ).

Die Reihenfolge des Auftretens der Monomethyl-Isomeren-Peaks einer MBFA in den Chromatogrammen war korrespondierend zur Verzweigungsposition von links nach rechts. Die Zählung der Verzweigungsposition erfolgt stets von der Carboxylgruppe (=C1) aus aufsteigend. Monomethyl-MBFA-Verzweigungen am C2-Atom wurden nur in N15 und N16 Fettsäure gefunden, solche mit einer Verzweigung am C3-Atom zusätzlich auch an N17-MBFA.

Die Methylverzweigungen befanden sich generell sowohl an geradzahligen C-Atomen (sogenannte  $\alpha$ -Verzweigungen, englisch: " $\alpha$ -branches"), als auch an ungeradzahligen C-Atomen (sogenannte  $\beta$ -Verzweigungen, englisch: " $\beta$ -branches") (Abb. 7, **Tab. 6**). Bis dato ist noch unklar, wie die Biosynthese der  $\beta$ -Verzweigungen in den MBFA abläuft, denn normalerweise entstehen bei der Fettsäure-Biosynthese grundsätzlich nur  $\alpha$ -Verzweigungen; entweder durch MT-katalysierte Methylierungen am aciden  $\alpha$ -Zentrum der wachsenden Kohlenstoffkette, oder durch Einbau von Methylmalonyl-CoA (**35**), anstelle von Malonyl-CoA (**34**) als Verlängerungsbaustein, und es gibt in der Literatur nur sehr wenige Beispiele für  $\beta$ -Verzweigungen in von *cis*-AT-PKS (zu denen auch SupA gehört) gebildeten Polyketiden. Als Ursache für die Methylierung in  $\beta$ -Position können andere Mechanismen vermutet werden, wie beispielsweise die nachträgliche Methylierung an einer Doppelbindung,<sup>[262]</sup> die oxidative Entfernung

der Carboxylgruppe,<sup>[243, 285]</sup> oder die Umformung von  $\beta$ -Ketogruppen in Methylverzweigungen wie sie häufig in *trans*-AT-PKS vorkommt und kürzlich im Detail aufgeklärt werden konnte.<sup>[238, 286, 287]</sup>

In **Tab. 6** sind die Positionen der Methylgruppen der MBFA in dem Schwamm *C. mycofijiensis* aufgeführt, dem Schwamm, in dem die höchste Diversität dieses Fettsäure-Typs zu verzeichnen war. Die Werte sind beispielhaft für alle untersuchten Schwämme.

**Tab. 6:** Positionen der Methylverzweigungen der MBFA aus *C. mycofijiensis*.

Position	Länge der Kohlenstoffkette Cx											
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
C2	■□	□										
C3	■□	□□										
C4												
C5												
C6	□?	□										
C7												
C8	□□	■					■					
C9	■											
C10	■□	■	■□□	□□	■	□						
C11		■□	□		■	■	□					
C12					□□		■					
C13												
C14						□	□					
C15							□		□			
C16									■□	□		
C17											■	
$\omega$	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
$\omega$ 5	■□	■□										
$\omega$ 6	■	■	□			□	□					
$\omega$ 7	□□		■□□		□□		□		■□			
$\omega$ 8		■		□□	■	■			□	□	■	
$\omega$ 9	□?				■	□	■					
$\omega$ 10		□				□						
$\omega$ 11												
$\omega$ 12	■□											
$\omega$ 13	■□	□□					■					
$\omega$ 14		□										

■=>10%; ■= 5-9%; ■= 1-4%; □=<1%

Bei Kettenlängen von C14 bis C24 befanden sich Methylgruppen an allen Positionen zwischen C2 und C17, mit Ausnahme von 4, 5, 7 und 13. Es bestand eine deutliche Präferenz für Methylgruppen an den Positionen C10 und C11, bzw.  $\omega$ 7,  $\omega$ 8 und  $\omega$ 9.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zwei Monomethyl-verzweigte MBFA [15Me20:0 (**61**) und 17Me22:0 (**62**) (Anhang Abb. 41)] zum ersten Mal in der Natur nachgewiesen werden. Für mehrere weitere Fettsäuren wurde erstmalig das Vorkommen in Schwämmen gezeigt ( **Tab. 7**, **Abb. 60**).

Tab. 7: MBFA aus vier HMA-Schwämmen.<sup>[a]</sup> [241]

ECL	MBFA	<i>T. swinhoei</i>			<i>C. mycofijiensis</i>			<i>A. dilatata</i>			<i>I. felix</i>		
		NL	GL	PL	NL	GL	PL	NL	GL	PL	NL	GL	PL
14.36	2Me14:0	0.05	-	-	0.04	-	0.14	-	-	-	-	-	-
14.40	3Me14:0	0.09	0.07	0.02	0.16	-	0.07	-	-	-	-	0.78	-
14.46	8Me14:0 <sup>[b]*</sup>	0.72	-	0.28	0.05	-	0.07	-	-	-	-	-	-
14.50	9Me14:0 <sup>[b]</sup>	0.27	5.74	0.09	0.22	5.22	0.03	0.11	3.97	-	-	0.41	-
14.53	10Me14:0 <sup>[b]</sup>	0.11	0.32	0.05	0.04	-	0.01	0.15	0.90	-	-	-	-
14.99	2Me- <i>i</i> 15:0 <sup>[b]*</sup>	-	-	-	-	-	0.32	-	-	-	-	-	0.35
15.03	3Me- <i>i</i> 15:0	0.12	0.17	0.14	1.06	0.44	0.85	-	-	-	-	4.14	1.38
15.09	8Me- <i>i</i> 15:0*	-	0.26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.11	10Me- <i>i</i> 15:0	1.01	0.66	2.34	0.66	-	0.84	0.58	-	0.85	0.50	0.81	0.54
15.15	6?Me- <i>ai</i> 15:0	-	-	0.09	-	-	0.03	-	-	-	-	-	-
15.36	2Me15:0*	0.08	-	0.03	0.24	-	0.58	-	-	-	0.13	-	0.12
15.40	3Me15:0	0.04	-	0.02	0.48	-	0.29	-	-	-	0.16	2.01	0.16
15.44	6Me15:0 <sup>[b]*</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.45	8Me15:0 <sup>[b]*</sup>	0.14	2.26	0.12	-	2.36	0.02	-	-	-	-	-	-
15.49	10Me15:0	1.13	0.07	0.23	0.70	1.09	0.24	0.56	1.00	0.06	-	0.56	-
15.53	11Me15:0	-	-	-	-	-	0.03	0.13	1.01	0.13	-	-	-
16.03	3Me- <i>i</i> 16*	-	-	-	0.50	-	0.04	-	-	-	-	-	-
16.07	11Me- <i>i</i> 16**	0.18	0.12	1.29	-	-	0.88	-	-	-	2.23	-	0.21
16.10	?Me16:1 <sup>[c]</sup>	-	0.79	0.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.15	10Me- <i>ai</i> 16:0*	-	-	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.38	3Me16:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.94	-
16.45	10Me16:0	7.85	8.19	6.44	4.74	10.08	2.40	8.79	5.87	10.29	5.12	1.99	3.97
16.48	11Me16:0 <sup>[b]*</sup>	-	0.64	0.46	0.27	-	0.28	-	-	0.90	-	-	-
16.54	7Me16:1 $\Delta$ 9?	-	0.12 <sup>[b]</sup>	0.33 <sup>[b]</sup>	-	-	-	0.74	0.52	1.18	-	-	-
17.07	10Me- <i>i</i> 17:0*	0.15	0.12	0.63	0.06	-	0.16	-	-	-	-	0.25	-
17.12	12Me- <i>i</i> 17:0**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.06	-
17.13	10Me- <i>ai</i> 17:0*	0.01	0.01	0.33	0.08	-	0.30	-	-	-	-	0.25	-
17.43	10Me17:0	0.22	0.16	0.23	0.35	-	0.11	0.22	0.41	-	-	-	-
18.06	10Me- <i>i</i> 18:0**	-	-	-	-	-	0.06	-	-	-	-	-	-
18.13	11Me18:1 $\Delta$ 6**	-	-	-	2.10	-	3.21	-	-	-	-	-	1.83
18.16	?Me18:1 <sup>[c]</sup>	0.79	-	0.75	0.71	-	-	0.18	-	-	-	-	-
18.42	10+11Me18:0	6.13	4.80	3.81	12.23	3.85	6.61	7.22	10.87	3.97	8.54	4.12	10.51
18.44	12Me18:0	-	-	-	-	0.19	-	-	-	-	-	-	-
19.05	12Me- <i>i</i> 19:0**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.41	10Me19:0*	-	-	-	0.16	-	0.14	0.21	0.47	-	-	-	-
19.50	14Me19:0*	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-
20.06	11Me- <i>i</i> 20:0**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20.13	8Me20:1 $\Delta$ 7**	-	-	0.06	1.85	-	7.37	-	-	-	0.11	-	3.90
20.41	12Me20:0 <sup>[b]</sup>	0.17	0.20	-	0.20	-	0.48	-	-	-	-	-	-
20.42	14Me20:0 <sup>[b]</sup>	-	-	0.01	-	-	0.22	-	3.83	0.13	1.25	0.86	-
20.43	15Me20:0 <sup>[b]*</sup> **	-	-	-	0.02	-	0.01	-	-	-	-	-	-
22.41	15Me22:0	0.53	0.44	0.40	-	-	-	0.03	3.18	0.26	-	-	3.28
22.43	16Me22:0	0.12	-	0.20	0.55	-	1.16	-	-	-	1.18	-	-
22.47	17Me22:0**	0.14	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-

23.04	16Me-i23:0**	-	-	-	-	-	0.03	-	-	-	-	-	-
23.41	16Me23:0*	-	-	0.06	-	-	0.04	-	0.31	-	-	-	-
24.39	16Me24:0	1.82	0.62	2.45	1.32	-	0.74	-	-	-	1.78	-	6.35
24.39	17Me24:0	-	-	-	-	-	-	-	1.75	-	-	-	-

<sup>[a]</sup> die 2 LMA Schwämme enthielten keine MBFA, mit Ausnahme der 7Me16:1 $\Delta$ 9? (*D. avara* NL 0.38%, GL 0.14%)

<sup>[b]</sup> teilweise getrennte Peaks

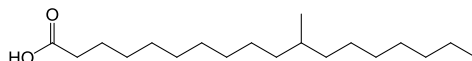
<sup>[c]</sup> Position der Methylgruppe nicht bestimmbar

\* erstmalig in Schwämmen („Porifera“) nachgewiesen

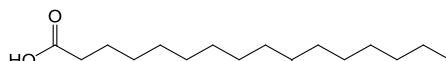
\*\* erstmalig in der Natur nachgewiesen

**A)**

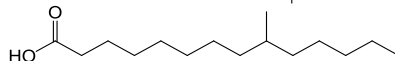
11Me18:0 (58)



10Me16:0 (59)



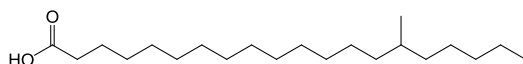
9Me14:0 (60)



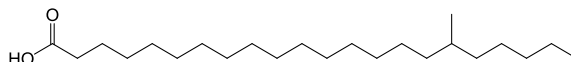
**Abb. 60:** Strukturen der MBFA aus marinen Schwämmen. **A)** am häufigsten vorkommende MBFA. **B)** erstmals in der Natur nachgewiesene Fettsäuren aus marinen Schwämmen.<sup>[12]</sup>

**B)**

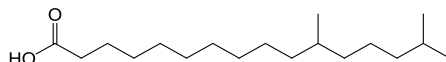
15Me20:0 (61)



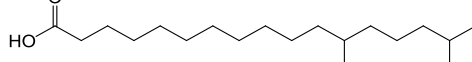
17Me22:0 (62)



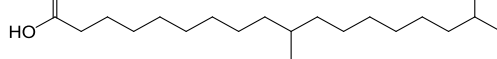
11Me-i16:0 (63)



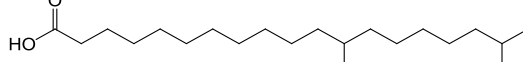
12Me-i17:0 (64)



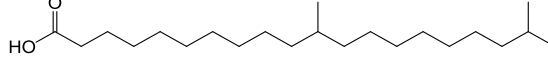
10Me-i18:0 (65)



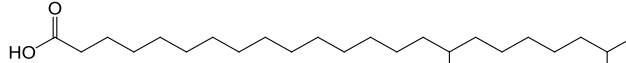
12Me-i19:0 (66)



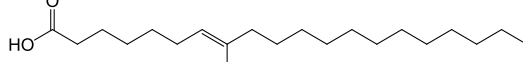
11Me-i20:0 (67)



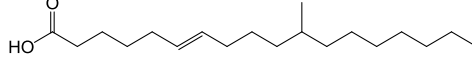
16Me-i23:0 (68)



8Me20:1 $\Delta$ 7 (69)



11Me18:1 $\Delta$ 6 (70)



### Einfach ungesättigte Monomethyl-MBFA

Einige wenige einfach ungesättigte MBFA wurden in den Schwämmen gefunden: Die 8Me20:1 $\Delta$ 7 (69) (ECL 20,13) wurde sogar erstmalig in der Natur nachgewiesen. Sie kam in *C. mycofijiensis* (max. 7,4% in PL), *I. felix* (max. 3,9% in PL) und in *T. swinhoei* (nur PL, 0,06%) vor. In den GL Fraktionen fehlte diese

Fettsäure stets und in den NL Fraktionen wurden nur Spuren dieser Fettsäure gefunden. Die Struktur der 8Me20:1 $\Delta$ 7 (**69**) wurde durch die Massenspektren der FAME, Pyrrolidide und Picolinylester nachgewiesen (Anhang Abb. 49).

Eine zweite einfach ungesättigte Monomethyl-MBFA, die 11Me18:1 $\Delta$ 6 (ECL 18,13) (**70**), wurde mit bemerkenswert hohen Anteilen in *C. mycofijiensis* (3,2% in PL) und in *I. felix* (1,8% in PL) gefunden. Auch diese Fettsäure ist mit der vorliegenden Untersuchung zum ersten Mal in der Natur nachgewiesen worden. Die Struktur der 11Me18:1 $\Delta$ 6 (**70**) wurde durch die Massenspektren der Pyrrolidide und Picolinylester nachgewiesen (Anhang Abb. 44).

Eine dritte MBFA dieser Gruppe, eine 7Me16:1 (ECL 16,54), konnte aufgrund recht schwacher Signale nur mithilfe der FAME-Massenspektren belegt werden, dies jedoch relativ sicher, da in der Literatur<sup>[10, 253]</sup> über diagnostische Massen berichtet wurde (Anhang Abb. 47). Die Position der Doppelbindung war entweder  $\Delta$ 8 oder  $\Delta$ 9. Im Gegensatz zu den beiden vorgenannten MBFA dieser Gruppe kam die 7Me16:1 $\Delta$ 9?-Fettsäure nicht ausschließlich in HMA-Schwämmen vor, sondern auch in *D. avara*, einem von zwei Vertretern der LMA-Schwämme. In *C. mycofijiensis* und *D. etheria* wurde sie nicht gefunden. Ihr höchster prozentualer Anteil war in *A. dilatata* PL (~1,2%), gefolgt von *D. avara* NL (~0,4%) und *T. swinhoei* PL (~0,3%). 7Me16:1-Fettsäuren sind aus marinen Quellen gut bekannt<sup>[253]</sup> und nicht nur in Schwämmen,<sup>[263, 288-291]</sup> sondern z. B. auch in Fischen<sup>[292]</sup> und Korallen (Anthozoa)<sup>[247, 271]</sup> vorhanden.

Zwei weitere einfach ungesättigte Monomethyl-MBFA, eine MeN17:1-Fettsäure (ECL 16,10) und eine MeN19:1-Fettsäure (ECL 18,16) wurden in so geringen Mengen gefunden, dass eine Bestimmung der Position der Methylgruppe nicht möglich war.

Bezüglich der Unterfraktionen der Phospholipide ließ sich generell feststellen, dass sich alle Fettsäuren dieser Gruppe (außer der marginalen MeN17:1) in den PL3 und PL4 Fraktionen befanden, was für eine Herkunft dieser Fettsäuren aus eukaryotischen PL (PI, PC, SM) spricht (siehe Abschnitt PUFA, Anhang Tab. 12). Da jedoch über die Lipide der bakteriellen Schwammsymbionten (insbesondere der Poribakterien) noch nichts bekannt ist, kann auch dieser Ursprung nicht ausgeschlossen werden.

### Gesättigte Dimethyl-MBFA

Charakteristisch für diese Fettsäuren war, dass sie in den Chromatogrammen knapp hinter den geradkettigen SAFA (mit einem Kohlenstoffatom weniger) erschienen, in einem Abstand von max. 0,15 ECL. Das bedeutet, dass die zwei Methylverzweigungen die Retentionszeit fast so stark verkürzen, wie die Verkürzung einer geraden Fettsäurekette um ein C-Atom.

Bei allen gefundenen Fettsäuren dieses Typs befand sich eine mittkettige Methylverzweigung an einer *i*- oder *ai*-verzweigten Fettsäure.

Die herausragende MBFA dieser Gruppe war die 3Me-*i*15:0, mit einem Höchstwert von 4,14% in *I. felix* GL ( **Tab. 7**). Meist waren jedoch die Abundanzen dieser Fettsäuren (<1% Anteile) zu gering, um aussagekräftige Pyrrolidid- oder Picolinylester-Massenspektren zu erhalten. Es gibt jedoch eine informative Publikation der Gruppe um D. C. White, in der viele ECL-Werte von MBFA stehen, u. a. auch von vielen Multimethyl-verzweigten Formen.<sup>[245]</sup> Da die ECL-Werte der mit den Methoden der vorliegenden Arbeit bestimmten Fettsäuren gut mit den Werten der genannten Literatur übereinstimmten, wurden in wenigen Zweifelsfällen die Methylgruppenpositionen anhand der veröffentlichten ECL-Werte bestimmt.

Eine Besonderheit bei der Auswertung der Massenspektren von Multimethyl-MBFA war, dass, wenn beispielsweise die diagnostischen Fragmente für eine C15-Verzweigung an einer N17-Fettsäure vorhanden waren, die aber zusätzlich eine frühere Verzweigung besaß (z. B. an C10), es sich nicht um eine 10,15-, sondern um eine 10,14-Dimethyl 15:0-Fettsäure handelte, da bei der Nummerierung der zweiten Abzweigung das C-Atom der früheren Verzweigung nicht mitgezählt wird.<sup>[245]</sup> Eine Tabelle mit den diagnostischen Fragmenten der FAME Massenspektren befindet sich im Anhang (Anhang Tab. 13).

Erstmalig in der Natur konnten folgende gesättigte Dimethyl-MBFA nachgewiesen werden: 11Me-*i*16:0 (**63**), 12Me-*i*17:0 (**64**), 10Me-*i*18:0 (**65**), 12Me-*i*19:0 (**66**), 11Me-*i*20:0 (**67**) und 16Me-*i*23:0 (**68**) ( **Tab. 7**, **Abb. 60**)

### E 2.2.4 Zusammenfassung Fettsäureanalytik

Die Analyse der Schwammfettsäuren erfolgte durch Lipidextraktion nach Bligh & Dyer mit anschließender milder alkalischer Methanolyse zu FAME und Messung mittels GC/MS. Aus den ECL-Werten<sup>[245]</sup> und Massenspektren konnten die Fettsäuren meist eindeutig bestimmt werden. In vielen Fällen konnte die Bestimmung der Fettsäure zusätzlich durch deren Pyrrolidid- und Picolinylester-Massenspektren bestätigt werden.<sup>[253]</sup>

Die detaillierte vergleichende Untersuchung der Fettsäuren aus sechs marinen Schwämmen ergab einen gravierenden Unterschied zwischen HMA- und LMA-Schwämmen bezüglich des Vorkommens von MBFA. Während in den HMA mit 47 verschiedenen Strukturen außergewöhnlich große Mengen detektiert wurden, war dieser Typ von Fettsäure in LMA Schwämmen überhaupt nicht vorhanden. Eine marginale Ausnahme bildete das spurenhafte Vorkommen der 7Me16:1 $\Delta$ 9? in einem Vertreter der LMA-Schwämme (*D. avara*). Wegen dieses Unterschiedes ist es sehr einfach, anhand der GC/MS Messungen der FAME HMA von LMA Schwämmen zu unterscheiden.

Da es bis jetzt noch unbekannt ist, in welchen Lipiden sich die MBFA befinden, wurden die Gesamtlipide vor der Derivatisierung und Messung in drei Fraktionen (NL, GL und PL) aufgetrennt. Bei vier Schwämmen wurde zusätzlich noch die PL-Fraktion in vier Unterfraktionen (PL1-4) nach Polarität aufgetrennt. Es zeigte sich allerdings, dass in allen Fraktionen MBFA vorhanden waren, diese Fettsäuren folglich in verschiedenen Lipiden gebunden sein müssen. Andere Fettsäuregruppen zeigten dagegen eine deutlich unterschiedliche Verteilung auf die einzelnen Lipidfraktionen. So befanden sich beispielsweise die PUFA hauptsächlich in den zwei polarsten Unterfraktionen PL3 und PL4, in denen sich besonders für Eukaryoten typische PL (SM, PI, PC) befinden, dagegen waren die Demospongien-Säuren und die Isoprenoid-FS hauptsächlich in den beiden unpolaren PL-Unterfraktionen PL1 und PL2 zu finden, in denen sich für Bakterien typische Lipide (PE, PS, DPG) befinden.

Die MBFA hatten prozentuale Anteile an den Schwammfettsäuren zwischen 18% (*A. dilatata* PL-Fraktion) und 34% (*I. felix* GL-Fraktion). 11-Methyloctadecansäure (**58**) (11Me18:0), 10-Methylhexadecansäure (**59**) (10Me16:0) und 9-Methyltetradecansäure (**60**) (9Me14:0) waren die



herausragenden Fettsäuren dieses Typs. In *C. mycofijiensis* (NL-Fraktion), stellte die 11Me18:0 (**58**) sogar 12% der Gesamtfettsäuren. Diese Fettsäure wurde häufig als abundanteste MBFA in marinen Schwämmen erwähnt<sup>[252, 258, 293-297]</sup> und könnte daher als chemischer Marker für HMA-Schwämme dienen. Einige der weniger abundanten gesättigten MBFA konnten als neuartige Fettsäuren erstmalig in der Natur nachgewiesen werden: 15Me20:0 (**61**), 17Me22:0 (**62**) und die *i*-FAs 11,15-Dimethylhexansäure (**63**) (11Me-*i*16:0), 12Me-*i*17:0 (**64**), 10Me-*i*18:0 (**65**), 12Me-*i*19:0 (**66**), 11Me-*i*20:0 (**67**) und 16Me-*i*23:0 (**68**). Fünf einfach ungesättigte MBFA wurden ebenfalls gefunden. Unter ihnen waren die neuartigen Fettsäuren 8-Methyleicosa-7-ensäure (**69**) (8Me20:1 $\Delta$ 7), die in einigen HMA-Schwämmen in erheblichen Mengenanteilen vorkam (in *C. mycofijiensis* ~7% der PL-Fraktion), und 11Me18:1 $\Delta$ 6 (**70**), die in nicht geringen Mengen in *C. mycofijiensis* und *I. felix* nachzuweisen war.

Die Positionen der mittkettigen Verzweigungen waren am häufigsten an C10 und C11, bzw.  $\omega$ 7,  $\omega$ 8,  $\omega$ 9. Die Tatsache, dass sich Verzweigungen nicht nur an geradzahligen C-Atomen, sondern auch an ungeradzahligen (= $\beta$ -Verzweigungen) befanden, lässt sich nicht mit dem gängigen Biosynthesemodell erklären. Von der integrierten MT-Domäne in SupA werden eigentlich nur Methylverzweigungen an geradzahligen ( $\alpha$ -Positionen) C-Atomen erwartet. Das Ergebnis des Einbaus von Methylmalonyl (**35**)- anstelle von Malonyl-CoA (**34**) wären ebenfalls  $\alpha$ -Verzweigungen, es sei denn, es würde eine Startereinheit mit ungerader Anzahl von C-Atomen [z. B. Propionyl-CoA (**38**)] verwendet. Denkbare Möglichkeiten für die Entstehung der Verzweigungen an ungeraden C-Atomen wären die nachträgliche Methylierung an einer mittelständigen Doppelbindung, oder die Methylierung der  $\beta$ -Ketogruppe nach dem Prinzip des „ $\beta$ -branching“ der *trans*-AT-PKS.

Bezüglich der *i/ai*-verzweigten Fettsäuren ergab sich ein weniger klarer Unterschied zwischen HMA- und LMA-Schwämmen, obgleich die höheren Anteile dieser Fettsäuren ebenfalls in HMA-Schwämmen zu verzeichnen waren. Dies betraf vor allem die *i*-Fettsäuren. Die *aai*-Fettsäuren kamen fast ausschließlich in den LMA-Schwämmen vor. Die wenige Literatur über diese Art Fettsäuren<sup>[249, 250, 266, 267, 269, 270]</sup> weist auf ein schwerpunktmäßiges Vorkommen dieser Fettsäuren im marinen Bereich, und dort vor allem in Schwämmen mit wenigen bakteriellen Symbionten hin.

## E 2.5 Herkunft des *sup*-Clusters - Zusammenfassung

Durch Vereinzelung bakterieller Schwammsymbionten und anschließende Untersuchung der mittels WGA amplifizierten Genome konnte von der Gruppe um Ute Hentschel (Uni Würzburg) kürzlich das Vorhandensein von *supA*-Genen im Genom von Poribakterien bewiesen werden.<sup>[11, 14]</sup> Bei detaillierten Analysen der 454-Genomdaten im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass es sich höchstwahrscheinlich um zwei verschiedene *sup*-Cluster handelt. Es wurden Genfragmente nicht nur von *supA*, sondern auch von *supD* und *supE* gefunden.

Die Zugehörigkeit der *sup*-Gene zu Poribakterien schließt allerdings nicht aus, dass die Gene auch in anderen Schwammsymbionten vorhanden sein können. Sogenannte Haushaltsgene ("housekeeping genes") der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase die in unmittelbarer Nähe des *sup*-Clusters pSW1H8 aus *T. swinhoei* gefunden wurden, legen ein Vorhandensein des Clusters auch in Bakterien der Deinococcus/Thermus-Gruppe nahe.<sup>[1]</sup>

Durch einen genetischen Vergleich von sechs HMA-Schwämmen und sechs LMA-Schwämmen sollten nähere Einsichten zum Vorkommen des *sup*-Clusters gewonnen werden. Die PCR-Analysen zeigten eindeutig, dass alle HMA-Schwämme positiv für die 16S-rRNA von Poribakterien und die KS des *supA*-Gens, und alle LMA-Schwämme negativ sowohl für Poribakterien, als auch für *supA*-Gene waren (**Tab. 8**).

Da die Primer für die KS des *supA*-Gens alle PKS I-Typen (also auch *cis*-AT- oder *trans*-AT-PKS) detektieren können und sich bei keinem LMA-Schwamm eine PCR-Bande zeigte, sollten neue Arzneimittelkandidaten eher in HMA-Schwämmen denn in LMA-Schwämmen gesucht werden, zumal eine Unterscheidung der zwei Gruppen leicht mit dem Mikroskop oder einer PCR möglich ist. Das Ergebnis deckt sich auch mit dem Resultat einer umfangreichen Literaturrecherche nach der aus keinem der untersuchten sechs LMA Schwämme Polyketide bekannt sind.

Eine anschließende vergleichende Fettsäureanalyse von sechs ausgewählten Schwämmen der vorherigen Testgruppe (*C. mycofijiensis*, *A. aerophoba*, *T. swinhoei*, *A. dilatata*, *D. avara* und *D. etheria*) sollte das Vorhandensein von

MBFA als theoretisch vermutete Produkte der SupA-PKS in HMA- und LMA-Schwämmen beleuchten. Die Ergebnisse der Fettsäureanalysen unterstützen eindeutig die obengenannten genetischen Daten: Es zeigte sich eine klare Dichotomie des PKS-Gehalts und des Fettsäuremetabolismus' in den Schwamm/Bakterien-Assoziationen. In allen Schwämmen mit Poribakterien (HMA-Schwämmen) waren MBFA mit sehr hohen Kongeneren-Anzahlen von n=16 bis n=37 vorhanden. Ihre Anteile mit 18%-34% an den Gesamtfettsäuren waren bemerkenswert hoch. In den LMA-Schwämmen dagegen, die nachgewiesenermaßen keine Poribakterien enthielten, waren überhaupt keine MBFA vorhanden, wenn von einer marginalen Ausnahme in einem Schwamm einmal abgesehen wird. Zum ersten Mal konnte also die Vermutung mit chemischen Daten untermauert werden, dass Poribakterien die eigentlichen Produzenten der MBFA in marinen Schwämmen sind (**Tab. 8**).

**Tab. 8:** Genetischer und chemischer Vergleich von HMA- und LMA-Schwämmen.<sup>[12]</sup>

Schwamm	"Poribacteria" PCR-Produkt	supA PCR- Produkte (total KS <sup>[a]</sup> )[n]	verschiedene supA PCR- Produkte [n]	MBFA [n]
<i>C. mycofijiensis</i> (HMA) 454-Sequenzierung	+	30.468 (30.473)	118	37
<i>C. mycofijiensis</i> (HMA)	+	42 (42)	9	37
<i>A. aerophoba</i> (HMA)	+	45 (45)	7	k.A. <sup>[b]</sup>
<i>T. swinhoei</i> (HMA)	+	46 (46)	10	32
<i>A. dilatata</i> (HMA)	+	2 (9)	2	16
<i>X. muta</i> (HMA)	+	44 (44)	7	k.A. <sup>[c]</sup>
<i>I. felix</i> (HMA)	+	45 (45)	3	21
<i>D. avara</i> (LMA)	-	0 (0) <sup>[d]</sup>	0	1 <sup>[e]</sup>
<i>D. etheria</i> (LMA)	-	0 (0) <sup>[d]</sup>	0	0
<i>C. vaginalis</i> (LMA)	-	0 (0) <sup>[d]</sup>	0	k.A.
<i>N. digitalis</i> (LMA)	-	0 (0) <sup>[d]</sup>	0	k.A.
<i>Ptilocaulis</i> sp. (LMA)	-	0 (0) <sup>[d]</sup>	0	k.A.
<i>A. compressa</i> (LMA)	-	0 (0) <sup>[d]</sup>	0	k.A.
<sup>[a]</sup> Anzahl aller KS-Amplifikate, basierend auf RFLP-Analyse und Sequenzierung <sup>[b]</sup> sechs MBFA laut Literatur vorhanden <sup>[298]</sup> <sup>[c]</sup> eine MBFA (12Me16:0) laut Literatur vorhanden <sup>[299]</sup> <sup>[d]</sup> keine Amplifikate erhalten <sup>[e]</sup> nur in Spuren <sup>[f]</sup> keine MBFA laut Literatur <sup>[300]</sup>				

Aus **Tab. 8** geht außerdem hervor, dass es einen positiven Zusammenhang zwischen der Diversität der *sup*-Gene und der Anzahl von MBFA geben könnte. Zumindest fiel auf, dass in den zwei Schwämmen mit der höchsten *supA*-Diversität (*C. mycofijiensis* und *T. swinhoei*) auch die höchsten Kongeneren-Anzahlen von  $n = 37$  und  $n = 32$  zu finden waren. Die zwei anderen gemessenen HMA-Schwämme (*I. felix* und *A. dilatata*) hatten mit 21, bzw. 16 verschiedenen MBFA deutlich weniger Kongenere bei gleichzeitig deutlich geringerer *supA*-Diversität von drei, bzw. zwei verschiedenen Sequenzen.

Aus Gründen des hohen Arbeitsaufwandes (es wurden ~50 Fettsäureproben mit GC/MS gemessen, die insgesamt ~450 Peaks enthielten, von denen ~200 als Fettsäuren bestimmt wurden) konnten nicht noch mehr Schwämme chemisch analysiert werden. Es wurde aber eine sehr gründliche Literaturrecherche zu Vorhandensein von MBFA und bakteriellen Symbionten in marinen Schwämmen durchgeführt. Nach bestem Wissen wurden keine Daten gefunden, die der vorliegenden Untersuchung und den abgeleiteten Hypothesen widersprechen würden, im Gegenteil: das generelle Fehlen von MBFA in LMA-Schwämmen wird durch Literaturangaben von *Amphimedon compressa*<sup>[300]</sup> und *Pericharax heteroaphis*<sup>[265]</sup> unterstützt. Beide Schwämme gehören auch zweifelsfrei zur Gruppe der LMA-Schwämme.<sup>[189]</sup>

Mit insgesamt 10 erstmals in der Natur entdeckten Fettsäuren erwiesen sich die untersuchten HMA-Schwämme als reiche Quelle von MBFA, im starken Gegensatz zu den LMA-Schwämmen, die praktisch frei von MBFA waren. Zusammen mit der positiven Korrelation des Vorkommens von Poribakterien und *supA*-Genen in HMA-Schwämmen, ergibt sich erstmals die Möglichkeit der Aussage, dass Poribakterien wahrscheinlich die Produzenten der MBFA in marinen Schwämmen sind.

### E 3 Versuch der Kultivierung eines Symbionten

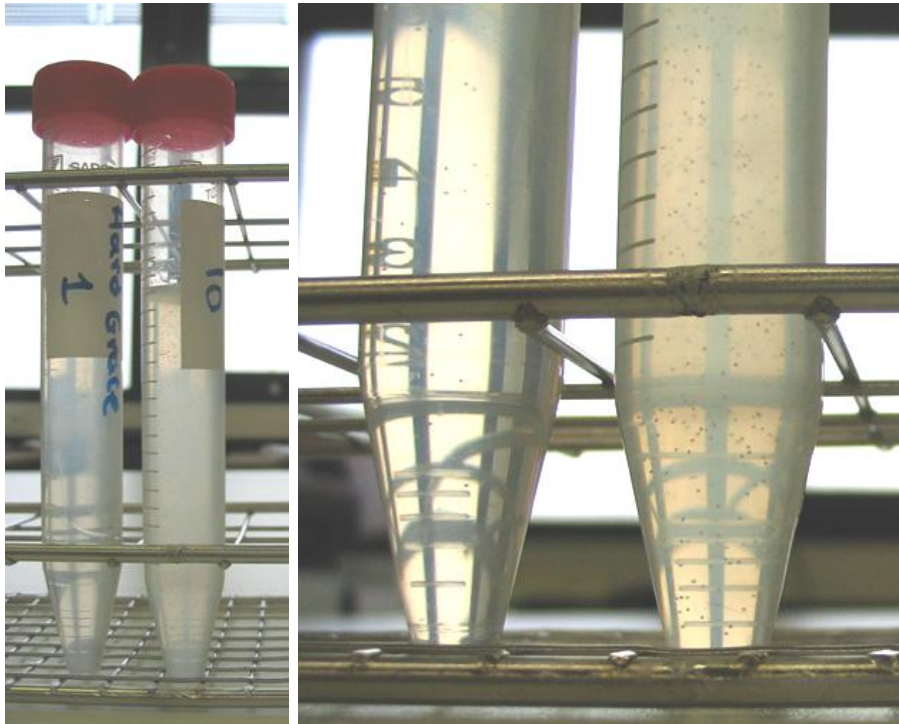
Parallel zur Strategie der heterologen Expression der PKS-Gene von Pederin (52) sollte versucht werden, den bisher nichtkultivierten *Paederus*-Symbionten (siehe C 5.1.1) zu kultivieren um auf diese Weise eine nachhaltige Produktion des pharmakologisch interessanten Stoffes zu gewährleisten. Eine der Vorarbeiten war eine vergleichende Genomanalyse des endosymbiotischen Produzenten, mit dem nah verwandten Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*, die von Ilias Lagkouvardos (AK J. Piel) im Rahmen einer Master-Arbeit im Fach Bioinformatik durchgeführt wurde.<sup>[301]</sup> Die Gendaten ergaben eine Reduzierung der Genomgröße des Symbionten im Vergleich zum frei lebenden *Pseudomonas aeruginosa* um nur ~10%, hingegen ist die Anzahl der Transporter im Symbiontengenom um ~50% reduziert. Außerdem wurde u. a. eine strikt aerobe Lebensweise des Symbionten, eine mögliche Resistenz gegen Polymyxin B, durch Vorhandensein des *arnA*-Gens<sup>[302]</sup> und der Verlust einiger Gene zur Biosynthese von Aminosäuren und Kofaktoren festgestellt. Ebenso wurde herausgefunden, dass der Symbiont möglicherweise Inosin nicht selbst herstellen kann.<sup>[301]</sup> Bereits einige Jahre zuvor entdeckte J. Piel Resistenzgene gegen Tellurit im Symbiontengenom.<sup>[303]</sup>

Ebenfalls von J. Piel wurde zur effizienten Durchmusterung von bakteriellen Klon-Bibliotheken eine spezielle Kultivierungsmethode entwickelt, die sogenannte 3D-Kultur.<sup>[203]</sup> Dabei handelt es sich um eine Kultivierung von Bakterienkolonien in halbflüssigem Medium (siehe F 2.15). Diese neue Methode kann in Mikrozentrifugenröhrchen, aber auch in Falcon-Röhrchen, Reagenzgläsern oder Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Neben dem Vorteil der Platzersparnis, da in einem Röhrchen tausende separater Kolonien wachsen können, bietet die Methode den Vorteil, dass sich im Röhrchen ein Sauerstoffgradient bilden kann.

Dies alles waren genug Anhaltspunkte dafür, dass möglicherweise eine Kultivierung des *Paederus*-Symbionten erfolgreich sein könnte. Es wurden Medien zur Zellkultur gewählt, die zahlreiche AS und IMP (Inosin-5'-Monophosphat) enthielten, und die außerdem in ihrer Zusammensetzung dem Inneren von Insekten ähneln. Zur Selektion wurde, neben den erwähnten Antibiotika Polymyxin B und Tellurit, auch Vancomycin (gegen Gram-positive

Bakterien) gewählt. Das Wachstum des Symbionten sollte hauptsächlich mittels PCR auf Vorhandensein von *ped*-Genen in den Kulturen überwacht werden.

Die meisten mit dem *Paederus*-Symbionten angeimpften 3D-Kulturen (jeweils 10 mL in 15 mL Falcon-Röhrchen) zeigten bereits nach Inkubation über Nacht bei 30 °C Wachstum. Sie wurden dann wieder in neue Röhrchen mit dem gleichen 3D-Medium überimpft, um den Einfluss der Inokulations-DNA auf das PCR-Ergebnis gering zu halten. Dazu wurden mit der Pipettenspitze eine oder mehrere Kolonien in neue Röhrchen mit 3D-Medium gegeben. Ein Beispiel einer 3D-Kultur in 15 mL Falcon-Röhrchen zeigt **Abb. 61**. Das linke der beiden Röhrchen wurde mit ~1 Bakterium pro mL angeimpft und das rechte mit der 10-fachen Menge. Schon mit bloßem Auge lassen sich deutlich die voneinander abgegrenzten Kolonien erkennen.



**Abb. 61:** 3D-Kultur von Bakterien in 15 mL Falcon-Röhrchen ("hard grace"). 24 h bei 30 °C, Medium: Grace + 7,6 mM IMP.

Von fünf Kolonien der linken Kultur "hard grace" (=scharf umrandete Kolonien im Grace-Medium, **Abb. 61**) wurden die 16S-rRNA-PCR-Produkte subkloniert und sequenziert. Die Ergebnisse zeigten, dass alle Klone Gram-positive Bakterien der Gattung *Lactococcus* waren (**Tab. 9**).

**Tab. 9:** Ergebnisse der 16S-rRNA-Analyse von "hard grace"-Klonen.

Klon	Zugriffsnummer	Organismus/Bezeichnung
3, 4, 5	AY699289.1	<i>Lactococcus garvieae</i> isolate M79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
7	AY675241	<i>Lactococcus lactis</i> strain SL1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence.
8	AM157445	<i>Lactococcus lactis</i> 16S-rRNA gene, clone 7V4. 16S ribosomal RNA;

Sämtliche Kulturen wurden nach 1-5 Tagen Inkubation bei 30 °C mittels PCR auf Vorhandensein von Genen des *ped*-Clusters getestet. Dabei wurden verschiedene Primerpaare aus verschiedenen Regionen des *ped*-Clusters ausgewählt. Bei „first8 f/r“, dem am häufigsten verwendeten Primerpaar kam es oft zu positiven Signalen. Die positive PCR-Bande war in der Kultur Schneider7\_10 (Medium Schneider, pH 7,0, 10 Bakterien/mL angeimpft) besonders ausgeprägt.

Deshalb wurden diese Kultur weiter subkultiviert und letztlich auf Agarplatten (LB + Vm<sup>10</sup> + PMX B 300 U) ausgestrichen (**Abb. 62 A,B**). Das gegen Gram-positive Bakterien wirksame Vancomycin wurde aufgrund Erfahrung aus dem vorhergehenden Versuch zusätzlich eingesetzt, bei dem sich Bakterien der Gattung *Lactococcus* durchsetzen konnten. So konnte jetzt das Vorhandensein der *Lactococcus*-Kontamination ausgeschlossen werden.

Die von den gepickten Klonen extrahierte PCR war wieder positiv (**Abb. 62 C**). Das mikroskopische Ergebnis zeigt (**Abb. 62 D**). Von drei Einzelkolonien wurde die 16S-rRNA sequenziert. Die Ergebnisse sind in **Tab. 10** zusammengefasst.

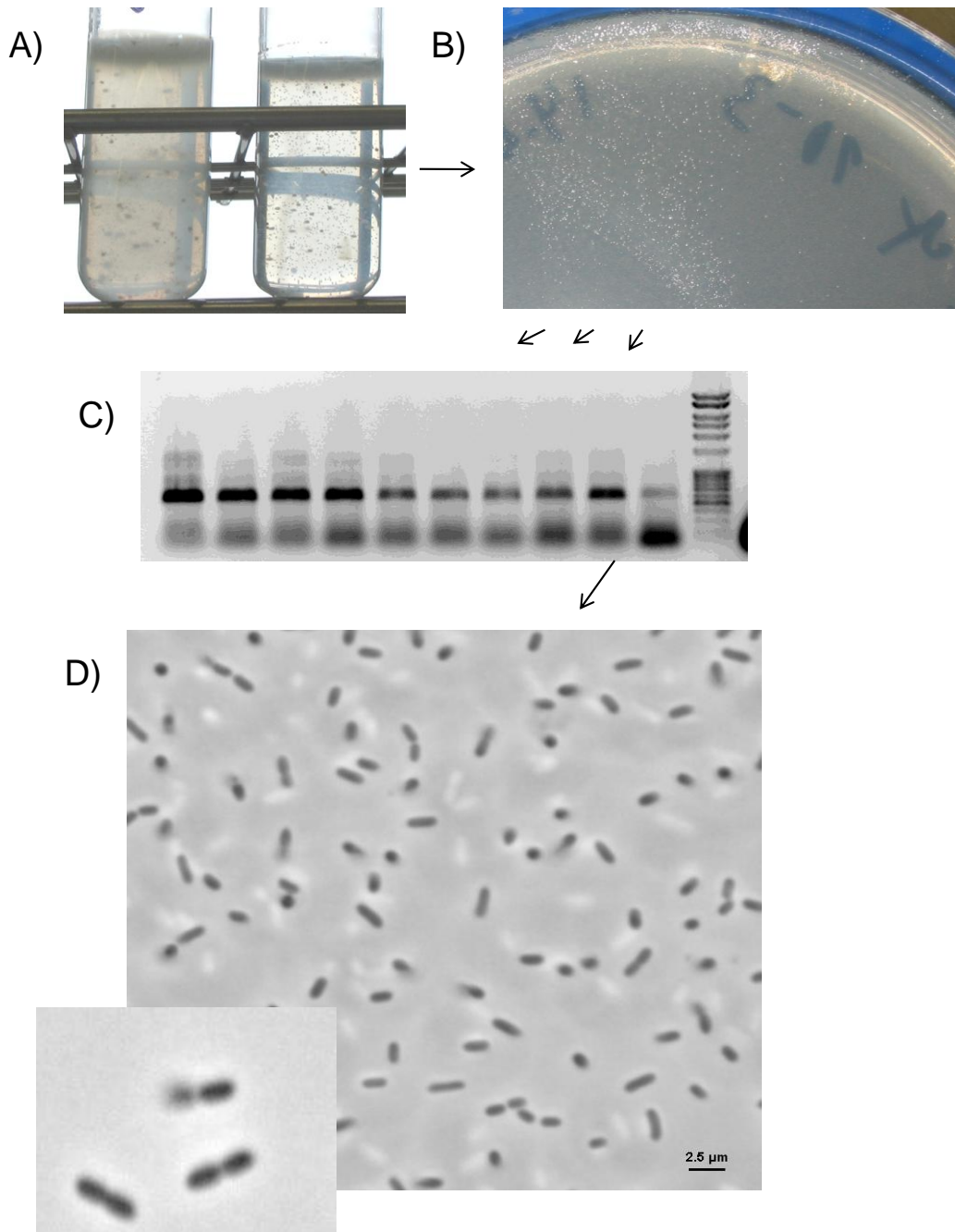
**Tab. 10:** Ergebnisse der 16S-rRNA-Analyse von "Schneider7\_10"-Klonen.

Klon	Genbanknummer	Organismus
S1	AF126103	<i>Enterobacter</i> sp. 16-31
S3	AJ233429 SFO233429	<i>Serratia fonticola</i>
S5	AY689059 AY689059.1	<i>Serratia</i> sp. 9A_12

Demnach handelte es sich um Bakterien der Familie der Enterobacteriaceae, zu denen die Gattungen *Enterobacter* und *Serratia* gehören.

Die anfänglich zahlreichen positiven PCR-Ergebnisse auf Vorhandensein des Pederin-Clusters ließen sich allerdings bei fortschreitender Inkubation, bzw. bei späterer Wiederholung der PCR nicht mehr reproduzieren. Das könnte entweder

auf ein anfängliches Wachstum des Symbionten und sein späteres Absterben oder auf eine unspezifische Bindung der Primer (mit einem zufällig gleichgroßen PCR-Produkt) sein. Für letzteres spricht, dass mit einigen anderen Primerpaaren des *ped*-Clusters keine positiven Banden erreicht werden konnten (**Abb. 63 D**).



**Abb. 62:** Kultivierungsversuch *Paederus*-Symbiont. Schneider7\_10. **A)** 3D-Kulturen „Schneider7\_10“, überimpft in Medium IPL-41 (1/2-fach), links: ohne PMX B, rechts: mit PMX B 300 U. **B)** Agarplatte der rechten Kultur aus A) (LB +Vm<sup>10</sup> + PMX B 300 U). **C)** positive PCR einiger isolierter Klone mit Primern „first8 f/r“ auf *ped*-Gene. **D)** Mikroskopische Aufnahme eines der Klone aus B) Agarplatte (Klon S1, stellte sich später als *Enterobacter* heraus). Länge: ~2,5 µm.

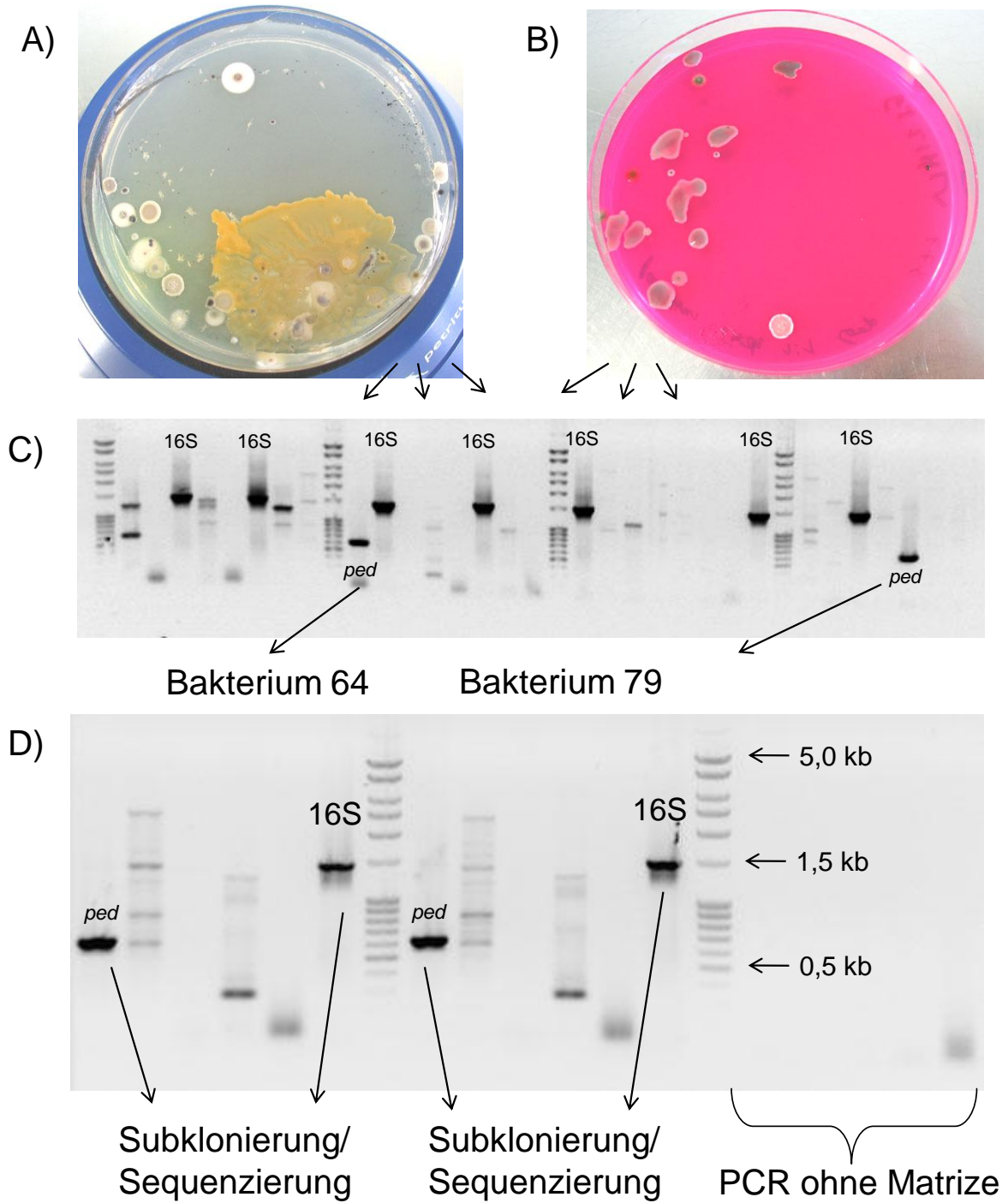


In einem weiteren Versuch wurden Symbionten aus der Glycerin-Gefrierkultur („*Paed. Symbiont*“) direkt auf zwei verschiedene Agarplatten (Medium IPL-4 1:2 verdünnt plus 3,8 mM IMP, 118  $\mu$ M  $K_2TeO_3$ , 10  $\mu$ g/mL Vancomycin, 150 U/mL PMX B, sowie Medium M199 plus 7,6 mM IMP, 118  $\mu$ M  $K_2TeO_3$ , 10  $\mu$ g/mL Vancomycin, 300 U/mL PMX B) ausgestrichen (**Abb. 63**) und zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

Vereinzelte Kolonien wurden subkultiviert, die genomische DNA extrahiert und per PCR getestet. Die Primer „first8 f/r“ ergaben erneut bei zwei Isolaten (#64 und 79) ein positives Signal der erwarteten Größe (~635 bp, **Abb. 63**). Nachdem jedoch das PCR Produkt sequenziert wurde, zeigte sich, dass das Amplifikat keine *ped*-Gene enthielt. Die gefundene „falsche“ Sequenz hatte keine Ähnlichkeit zu Sequenzen in der Genbank. Dass die „falsche“ Sequenz genau die erwartete Größe hatte, war ein ungünstiger Zufall. Die Sequenzierung der 16S-rRNA Bande dieser Kultur ergab Homologie zu einem Bakterium der Familie der Brucellaceae. Die Sequenz mit der höchsten Ähnlichkeit hat die Zugriffsnummer AY353698. Wegen der möglicherweise hohen Pathogenität des Bakteriums wurden die Kulturen sofort vernichtet.

Die letzten Kultivierungsversuche wurden im Mikrotiterplatten-Maßstab durchgeführt, um noch mehr Medienvarianten und Verdünnungsreihen testen zu können. Sie führten ebenfalls nicht zur Kultivierung des *Paederus*-Symbionten. Es war zwar - trotz der drei eingesetzten Antibiotika - nach Kultivierung über Nacht (ü/N) bei 28 °C in allen Kavitäten, die direkt mit der Symbiontenkultur angeimpft worden waren, Wachstum zu sehen, und die PCR auf *ped*-Gene war anfänglich sogar positiv. Nach längerer Inkubation waren dieselben Kulturen dann jedoch wieder negativ. Die Ursache dafür war wahrscheinlich, dass nicht der Symbiont gewachsen war, sondern andere Bakterien. Die anfänglich positive DNA war vermutlich aufgrund der DNA-Überreste der nicht mehr vermehrungsfähigen Symbionten entstanden.

Letztendlich muss die Frage nach den richtigen Kultivierungsbedingungen für den *Paederus*-Symbionten offen bleiben.



**Abb. 63:** Kultivierungsversuch *Paederus*-Symbiont. Agarplatten. **A)** Kultur 58. **B)** Kultur 59. **C)** PCR mit DNA isolierter Kolonien der Agarplatten A) und B) mit Primern für 16S-rRNA und *ped*-Gene (*ped*, „first8 f/r“). **D)** PCR der isolierter DNA der Klone 64 und 79 mit Primern für 16S-rRNA und verschiedenen Primern für *ped*-Gene (*ped*, „first8 f/r“).

## E 4 Bioassay mit Schwammextrakten

Mit dem Bioassay auf antibiotische Aktivität gegen *Bacillus megaterium* steht eine relativ schnelle und einfache Methode zur Verfügung, Schwammextrakte zu testen (siehe F 2.14).

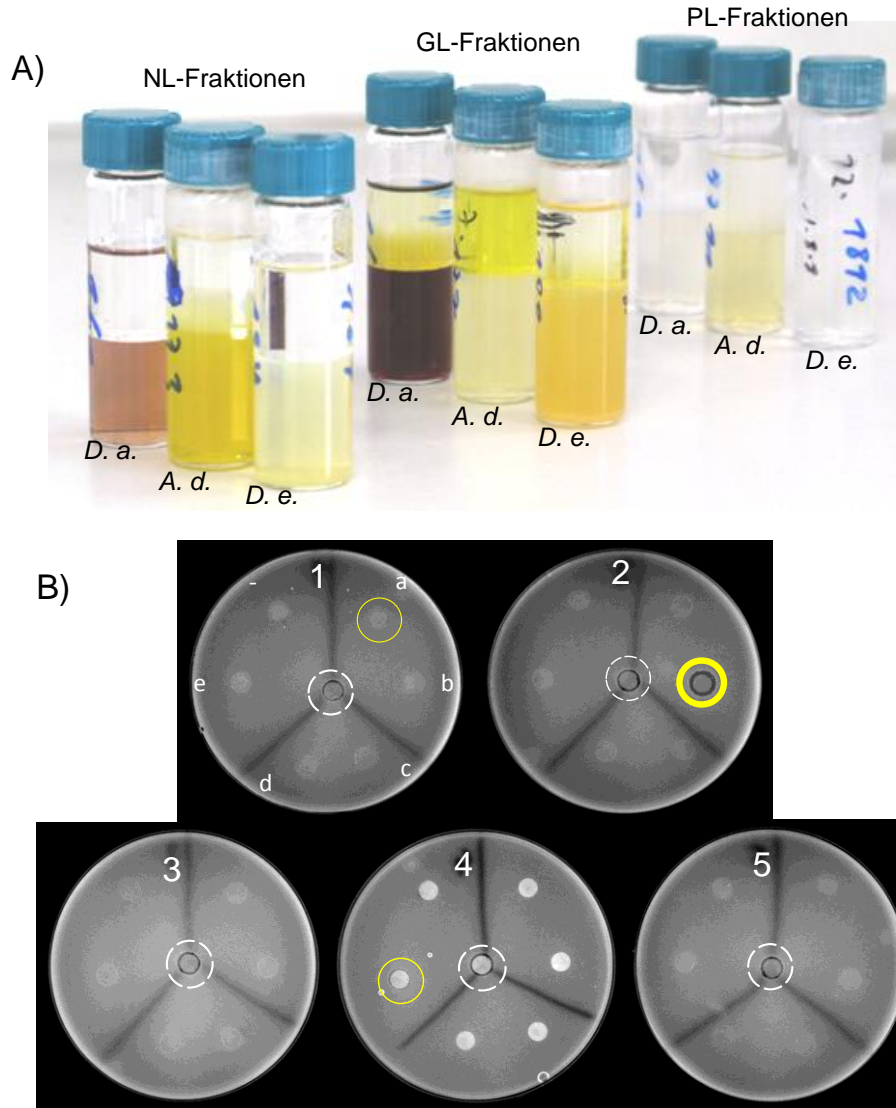
Die wässrigen Phasen der Lipidextraktionen wurden von fünf marinen Schwämmen auf antibiotische Aktivität hin untersucht. Hierbei handelte es sich um die MeOH/H<sub>2</sub>O-Phase (=M/H) nach Abzug der FAME. Diese M/H-Phasen fielen jeweils nach der Methylierung und Extraktion der FAME aus den NL-, GL- und PL-Fractionen an. Der Durchfluss dieser Phase durch eine Silikagel Säule wurde auch aufgefangen (FT). Danach wurde der auf der Säule gebliebene Teil mit MeOH eluiert (M). Die Ergebnisse des Agardiffusionstestes sind in **Tab. 11** und **Abb. 64 B** zusammengefasst.

**Tab. 11:** Bioassay mit Schwammextrakten. Zusammenfassung der Ergebnisse.

Probe	M/H	FT	M
<i>D. avara</i> NL	Platte #2, a		Platte #4, d
<i>D. avara</i> GL	<b>Platte #2, b, +++</b>		<b>Platte #4, e, ++</b>
<i>D. avara</i> PL	Platte #2, c		Platte #5, a
<i>A. dilatata</i> NL	Platte #2, d	Platte #3, e	Platte #5, b
<i>A. dilatata</i> GL	Platte #2, e	Platte #4, a	Platte #5, c
<i>A. dilatata</i> PL	Platte #3, a	Platte #4, c	
<i>D. etheria</i> NL	Platte #3, b	Platte #4, b	Platte #5, d
<i>D. etheria</i> GL	Platte #3, c		Platte #5, e
<i>D. etheria</i> PL	Platte #3, d		
<i>I. felix</i> 2004 NL			<b>Platte #1, a, +</b>
<i>I. felix</i> 2004 GL			Platte #1, b
<i>I. felix</i> 2004 PL			Platte #1, c
<i>T. swinhoei</i> NL			Platte #1, d
<i>T. swinhoei</i> PL			Platte #1, e
+...sehr schwach positiv; ++... positiv; +++...stark positiv			

Am stärksten war die antibiotische Wirkung bei der Probe *D. avara* GL M/H. Auch die Probe *D. avara* GL M war positiv. Sehr schwach positiv war die Probe *I. felix* 2004 NL M. Alle anderen untersuchten Schwammextrakte zeigten keine antibiotische Wirkung gegen *Bacillus megaterium*. In beiden positiven Fällen handelt es sich vielleicht um neue Substanzen, bzw. solche, von denen bisher keine antibiotische Wirkung bekannt ist. Bei *D. avara* können die bekannten Naturstoffe Avarol, Avaron und Isozonarol aufgrund ihrer höheren Lipophilie

ausgeschlossen werden. Massenspektren ähnlich dem von Isozonarol konnten mittels GC/MS in der Lipidphase nachgewiesen werden, was gegen ein Vorhandensein in der polaren Phase spricht. Allerdings waren sie nur in der GL-Fraktion zu finden, aus deren wässriger Phase auch die positiven Proben stammten.



**Abb. 64:** Bioassay mit Schwammextrakten. **A)** Schwammextrakte für den Bioassay. *D.a.*, *D. avara*; *A.d.*, *A. dilatata*; *D.e.*, *D. etheria*; NL, Neutrallipide; GL, Glycolipide; PL, Polarlipide. **B)** Bioassay-Agarplatten mit den Proben a, b, c, d, e; -, Negativkontrolle (MeOH); in der Mitte (gestrichelte Linie): Positivkontrolle 4,5 µL Vancomycin (10 µg/mL). Positive Proben (Hemmhöfe) sind mit Kreis markiert.

Für weitere Isolierungsschritte (z. B. mittels HPLC) der aktiven Substanzen und deren Strukturaufklärung wäre wesentlich mehr Schwammmaterial benötigt worden, als zur Verfügung stand. Daher wurde an dieser Stelle das Teilprojekt nicht weiter verfolgt. Das Ergebnis unterstreicht jedoch trotzdem die Potenz von marinen Schwämmen, Antibiotika zu liefern.

## F MATERIAL UND METHODEN

### F 1 Material

Im Folgenden sind alle Materialien aufgeführt, die für die vorliegende Arbeit benötigt wurden.

#### F 1.1 Organismen

Es wurde sowohl mit käuflich erworbenen Reinkulturen von Bakterien, als auch mit nichtkultivierten bakteriellen Symbionten gearbeitet. Letztere stammten hauptsächlich aus marinen Schwämmen und in einem Fall aus Käfern (Coleoptera) der Gattung *Paederus*.

##### F 1.1.1 Bakterien

In **Tab. 12** sind alle verwendeten Bakterien aufgeführt.

**Tab. 12:** Verwendete Bakterien und deren Herkunft.

Stamm	Genotyp oder Kommentar	Herkunft
<i>Bacillus megaterium</i>	keine Mutationen	DSMZ
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	Kultur erfolgte durch AK L. Eggeling (FZ Jülich)	ATCC
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>) gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
<i>E. coli</i> ArcticExpress®(DE3)RIL	<i>E. coli</i> B; F- <i>ompT hsdS(rB- mB-) dcm+</i> Tetr <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte [cpn10cpn60 Gentr] [argU ileY leuW Strr]</i> . <i>t-RNAs: argU</i> (AGA, AGG), <i>ileY</i> (AUA), <i>leuW</i> (CUA)	Stratagene
<i>E. coli</i> BW25113 <sup>[304]</sup>	<i>E. coli</i> K-12 Derivat; <i>lacI<sup>q</sup> rrnB<sub>T14</sub> ΔlacZ<sub>WJ16</sub> hsdR514 ΔaraBAD<sub>AH33</sub> ΔrhaBAD<sub>LD78</sub></i>	AK U. Hentschel (Uni Würzburg)
<i>E. coli</i> K12 JM101	F <sup>'</sup> <i>traD36 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup> Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV thi</i>	NEB
<i>E. coli</i> K12 JM109	F <sup>'</sup> <i>traD36 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup> Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>	NEB
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam dcm hsdM hsdS hsdR cat tet</i> , enthält pUZ8002 für Konjugation von <i>Streptomyces</i>	<sup>[305]</sup>
<i>E. coli</i> Rosetta-gami®2 (DE3)pLysS	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA Pvu II phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> (DE3) F <sup>'</sup> [ <i>lac<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup> pro] gor522::Tn 10 trxB pLysSRARE2</i> (Cam <sup>34</sup> , Str <sup>50</sup> , Tet <sup>12,5</sup> )	Novagen/Merck
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F <sup>'</sup> <i>proAB lacI<sup>f</sup> ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )]	Stratagene
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (DSM 6125)	keine Mutationen	DSMZ
<i>Streptomyces albus</i>	keine Mutationen	AK C. Hertweck (HKI Jena)
„Paed. Symbiont“	bei -80 °C gelagerter Glycerin-Gefrierkultur von Bakterien aus <i>Paederus fuscipes</i> Käfern (Coleoptera, Staphylinidae)	AK J. Piel

Oftmals erwies sich die Tetracyclin-Resistenz von *E. coli* XL1-Blue MRF' als ungünstig. In diesen Fällen wurde auf *E. coli* K12 JM101 oder JM109 zurückgegriffen.

### F 1.1.2 Schwämme

Die folgende **Tab. 13** zeigt die verwendeten Schwämme und deren Herkunft.

**Tab. 13:** Verwendete Schwämme und deren Herkunft.

Art	Ordnung	Bakterien <sup>[a]</sup>	Herkunft
<i>Agelas dilatata</i>	Ceractinomorpha	HMA	vor Little San Salvador Island, Bahamas (24° 34,39' N; 75° 58' W) <sup>[b]</sup>
<i>Agelas dilatata</i>	Ceractinomorpha	HMA	2004, Pinnacles, Bahamas <sup>[b]</sup>
<i>Amphimedon compressa</i>	Haplosclerida	LMA	vor Little San Salvador Island, Bahamas (24° 34,39' N; 75° 58' W) <sup>[b]</sup>
<i>Aplysina aerophoba</i>	Ceractinomorpha	HMA	vor Rovinj, Kroatien (45° 05' N; 13° 38' O) <sup>[b]</sup>
<i>Callyspongia vaginalis</i>	Ceractinomorpha	HMA	vor Little San Salvador Island, Bahamas (24° 34,39' N; 75° 58' W) <sup>[b]</sup>
<i>Cacospongia mycofijiensis</i> CM5	Dictyoceratida	HMA	vor Vanuatu, Südpazifik (17° 34' S; 168° 19' O) <sup>[c]</sup>
<i>Dysidea avara</i>	Dictyoceratida	LMA	vor Rovinj, Kroatien (45° 05' N; 13° 38' O) <sup>[b]</sup>
<i>Dysidea etheria</i>	Dictyoceratida	LMA	vor Little San Salvador Island, Bahamas (24° 34,39' N; 75° 58' W) <sup>[b]</sup>
<i>Ircinia felix</i>	Ceractinomorpha	HMA	2008, vor Little San Salvador Island, Bahamas (24° 34,39' N; 75° 58' W) <sup>[b]</sup>
<i>Ircinia felix</i>	Ceractinomorpha	HMA	2004, Stirrup Cays, Bahamas, (25° 50,06' N; 77° 54,97' W) <sup>[b]</sup>
<i>Niphates digitalis</i>	Haplosclerida	LMA	vor Little San Salvador Island, Bahamas (24° 34,39' N; 75° 58' W) <sup>[b]</sup>
<i>Ptilocaulis</i> sp.	Halichondrida	LMA	vor Little San Salvador Island, Bahamas (24° 34,39' N; 75° 58' W) <sup>[b]</sup>
<i>Theonella swinhoei</i>	Lithistida	HMA	vor Hachijo Island, Japan (33° 06' N; 139° 47' O) <sup>[d]</sup>
<i>Xestospongia muta</i>	Ceractinomorpha	HMA	vor Little San Salvador Island, Bahamas (24° 34,39' N; 75° 58' W) <sup>[b]</sup>
<sup>[a]</sup> HMA-Schwämme enthalten viele symbiotische Bakterien, LMA-Schwämme dagegen wenige <sup>[b]</sup> von U. Hentschel (Universität Würzburg) <sup>[c]</sup> von P. Crews (Universität California Santa Cruz) <sup>[d]</sup> von S. Matsunaga und N. Fusetani (Universität Tokio)			

Alle Schwämme wurden mittels SCUBA-Tauchens aus Tiefen von 5-15 m geerntet und noch unter Wasser separat in Plastiktüten verbracht. Danach wurden sie in Stücke geschnitten und bei -80 °C gelagert.

## F 1.2 Vektoren

In diesem Abschnitt sind alle Plasmide und Cosmide aufgeführt, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden.

### F 1.2.1 Vektoren zum Klonieren und Lagern

In Tab. 14 sind alle Vektoren aufgelistet, die zur Klonierung von Vorstufen, zur Subklonierung und Lagerung, sowie zur  $\lambda$ -Red-Klonierung benötigt wurden.

**Tab. 14:** Verwendete Vektoren zur Subklonierung.

Plasmid	Antibiotika-Resistenz	Besonderheit	Herkunft
pBluescript II SK(+)	Ampicillin (100 µg/mL)	T/A Klonierung im Eigenbau	Stratagene
pCR®2.1 TOPO	Ampicillin (100 µg/mL), Kanamycin (50 µg/ml)	T/A Klonierung	Invitrogen
pGEM®-T Easy	Ampicillin (100 µg/mL)	T/A Klonierung	Promega
pIJ778	Ampicillin (100 µg/mL), Streptomycin (50 µg/ml)	Resistenzkassette Streptomycin ( <i>aadA oriT</i> )	[306]
pIJ790	Chloramphenicol (34 µg/ml)	Red-Helfer Plasmid (Replikation bei max. 30°C) <i>gam, bet, exo, araC, rep101<sup>ts</sup></i>	[306]
pKD46	Ampicillin (100 µg/ml)	Red-Helfer Plasmid (Replikation bei max. 30 °C)	[304]
pKG32ctRNAmut	Kanamycin (50 µg/ml)	Donor für <i>rep C</i> .	[227]
pUZ8002	Kanamycin (50 µg/ml)	Plasmid für Konjugation von <i>S. albus</i> ( <i>tra</i> , RP4)	[307]

### F 1.2.2 Expressionsvektoren und Chaperon-Plasmide

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung der Expressionsvektoren sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit die in **Tab. 15** (auf der folgenden Seite) aufgeführten Vektoren verwendet worden. In dieser Tabelle stehen auch alle käuflich erworbenen Chaperon-Plasmide.

**Tab. 15:** Verwendete Ausgangsvektoren für die Expressionen, Chaperon-Plasmide.

Vektor	Antibiotika-Resistenz	Eigenschaften	Herkunft
pET15b	Ampicillin (100 µg/ml)	Expressionsvektor, N-terminaler His6-Tag	Novagen/Merck
pET52b(+)	Ampicillin (100 µg/ml)	Expressionsvektor, N-terminaler Strep- und C-terminaler 10-His-Tag	Novagen/Merck
pG-KJE8	Chloramphenicol (34 µg/ml)	Chaperon-Plasmid ( <i>dnaK</i> , <i>dnaJ</i> , <i>grpE</i> , <i>groES</i> , <i>groEL</i> ); (Tetracyclin und L-Arabinose-induziert)	Takara
pGRO7	Chloramphenicol (34 µg/ml)	Chaperon-Plasmid ( <i>groES</i> , <i>groEL</i> ) (L-Arabinose-induziert)	Takara
pG-Tf2	Chloramphenicol (34 µg/ml)	Chaperon-Plasmid ( <i>groES</i> , <i>groEL</i> , <i>tig</i> ); (Tetracyclin-induziert)	Takara
pHIS8-Svp	Kanamycin (50 µg/ml)	Expressionsvektor, N-terminaler His8-Tag, Koexpression des <i>svp</i> -Gens	AK B. Moore (Scripps) <sup>[a]</sup>
pJC1	Kanamycin (50 µg/ml)	Expressionsvektor für <i>in vivo</i> Expression in <i>C. glutamicum</i> , keine Überexpression	AK L. Eggeling (FZ Jülich) <sup>[b]</sup>
pKJE7	Chloramphenicol (34 µg/ml)	Chaperon-Plasmid ( <i>dnaK</i> , <i>dnaJ</i> , <i>grpE</i> ); (L-Arabinose-induziert)	Takara
pMSX	Kanamycin (50 µg/ml)	Expressionsvektor für Expression in <i>C. glutamicum</i> , <i>Ptac</i> -Promotor, C-terminaler His6-Tag, <i>pelB</i>	AK L. Eggeling (FZ Jülich) <sup>[c]</sup>
pTf16	Chloramphenicol (34 µg/ml)	Chaperon-Plasmid ( <i>tig</i> ) (L-Arabinose-induziert)	Takara
sfp-pET28a	Kanamycin (50 µg/ml)	Sfp, C-terminaler His6-Tag	von Jason J. Reddick and Jayme K. Williams (UNCG) <sup>[d]</sup>

<sup>[a]</sup> basierend auf pET28a(+), das *svp*-Gen (incl. RBS) wurde in die *NotI*-Stelle kloniert<sup>[308, 309]</sup>  
<sup>[b]</sup> basiert auf pZ1, welcher eine Fusion von pHM1519 und pACYC177 ist, Shuttle-Vektor coryneforme Bakterien ← → *E. coli*  
<sup>[c]</sup> basierend auf sfp-pUC8 von Prof. Peter Zuber (Dept. of Environmental and Biomolecular Systems, Oregon Health & Science University)  
<sup>[d]</sup> basierend auf pEKex2, RBS, His-Tag, T7-Terminator aus pET16b

### F 1.2.3 Cosmide metagenomischer DNA Bibliotheken

Als Grundlage für alle Untersuchungen am *sup*-Cluster diene stets das Cosmid pSW1H8 aus einer metagenomischen Bibliothek des Schwammes *T. swinhoei*. Das Cosmid pPD9F12 diene als Negativkontrolle ( **Tab. 16**).

**Tab. 16:** Verwendete Bibliothek-Cosmide

Cosmid	Vektor	Hersteller	Metagenom von	Insert
pSW1H8	pWEB (Amp <sup>100</sup> , Kan <sup>50</sup> )	Epicentre (Madison, USA)	<i>Theonella swinhoei</i>	<i>sup</i> -Cluster <sup>[1]</sup>
pPD9F12	pWEB (Amp <sup>100</sup> , Kan <sup>50</sup> )	Epicentre (Madison, USA)	<i>Paederus fuscipes</i>	<i>ped</i> -Cluster ( <i>pedA-G</i> ) <sup>[155]</sup>



## F 1.3 Chemikalien, Enzyme, Antibiotika

In den folgenden Abschnitten sind alle verwendeten Chemikalien, Enzyme und Antibiotika aufgeführt.

### F 1.3.1 Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Chemikalien sind in Tab. 17 aufgelistet.

Tab. 17: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangabe.

Chemikalie	Hersteller, Sitz
19:0 FAME (Standard für GC/MS)	Sigma-Aldrich
Aceton, p.A.	Carl Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Acrylamid-bisacrylamid 37,5:1 (Rotiphoresegel 30)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Qualität	Carl Roth, Karlsruhe
L-Arabinose, zur Induktion, Stammlösung 8 g/100 mL H <sub>2</sub> O, Arbeitskonz. 50-200 µL/mL Kultur	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Amidoschwarz 10B	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Applichem, Darmstadt
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxodisulfat), Arbeitslösung 200 mg/2 mL	Merck, Darmstadt
BAME (Bacterial Acid Methyl Ester Mix) Standard	Supelco/Sigma-Aldrich
Brilliant-Blau R250	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Calciumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	KMF, Lohmar
Casaminsäuren	Becton Dickinson, Heidelberg
Chloroform, p.A.	Merck, Darmstadt
Dichlormethan, ROTISOLV® HPLC	Carl Roth, Karlsruhe
Citronensäure Monohydrat	Merck, Darmstadt
dATP (Desoxy Adenosin-5'-triphosphat)	Invitrogen, Karlsruhe
dTTP (Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs (Desoxy-Nukleotide)	Invitrogen, Karlsruhe
Diethylether	Carl Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DMF (N,N'-Dimethylformamid)	Fisher-Scientific, Schwerte
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
DNA ladder 100 bp extended	Carl Roth, Karlsruhe
DNA ladder 1kb	Carl Roth, Karlsruhe
DTT (1,4-Dithiothreit), Stammlösung 10 mM	Carl Roth, Karlsruhe
Eisessig	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Acros Organics, Geel (B)
Ethidumbromid	Carl Roth, Karlsruhe

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	KMF, Lohmar
D(+)-Glucose Monohydrat	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Fisher-Scientific, Schwerte
Harnstoff	Qiagen, Hilden
Hexan, p.A.	Merck, Darmstadt
Hydroxylamin	Sigma-Aldrich
Imidazol, Stammlösung 1 M, pH 8,0	Carl Roth, Karlsruhe
IMP (Inosinmonophosphat) Stammlsg. 0,5 M	Sigma-Aldrich
Isohexan, ROTISOLV® HPLC	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol, p.A.	Merck, Darmstadt
Isopropylthiogalactosid (IPTG), Stammlösung 100mM	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	ABCR; Karlsruhe
Kaliumcarbonat	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Acros Organics, Geel (B)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (Plätzchen)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumsulfat	Grüssing, Filsum
Kalium- <i>tert</i> -butoxid, ~1 M in THF	Sigma-Aldrich, Seelze
Kupfer(II)chlorid-Dihydrat	Grüssing, Filsum
Kupfer(II)sulfat	AppliChem, Darmstadt
Leupeptin	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Manganchlorid-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Mannitol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol, HPLC	J. T. Baker / Mallinckrodt Baker, Deventer, (NL)
MTBE (Methyl- <i>tert</i> -butyl ether)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Acros Organics, Geel (B)
Natriumtetraborat-Decahydrat	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumcarbonat	KMF, Lohmar
Natriumchlorid	Grüssing, Filsum
Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumhydroxid	KMF, Lohmar
Natriumsulfat (trocken) 98%	KMF, Lohmar
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Seelze
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Ni-NTA Säulchen	Qiagen, Hilden
Primer (Oligonukleotide)	Invitrogen, Karlsruhe
PIC, (Protease Inhibitor Cocktail, Catalog No. P8465)	Sigma-Aldrich, Seelze
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Carl Roth, Karlsruhe
Rainbow <sup>14</sup> C-markierter Marker (CFA755)	GE Healthcare, München
Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1)	Carl Roth, Karlsruhe

Proteinmarker, Roti®-Mark Standard, T851.3	Carl Roth, Karlsruhe
Protein Marker, Broad Range (2-212 kDa), P7702S	NEB, Frankfurt/Main
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Seelze
Pyridin (trocken)	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
3-Pyridinmethanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Pyrrolidin	ZVE, Bonn
QIAquick gel extraction kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR purification kit	Qiagen, Hilden
Salzsäure, rauchend 37%	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
1,5 M Salzsäure in Methanol	Sigma-Aldrich
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	KMF, Lohmar
Stickstoffgas, N <sub>2</sub>	Linde
TCA (Trichloressigsäure)	Sigma-Aldrich
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck, Darmstadt
<i>m</i> -Toluylsäure	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth, Karlsruhe
TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphon-Hydrochlorid)	AppliChem, Darmstadt
Xylencyanol	AppliChem, Darmstadt
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid)	AppliChem, Darmstadt
Zinkchlorid	Acros Organics, Geel (B)
Zinksulfat	Merck, Darmstadt

### F 1.3.2 Enzyme, Koenzyme

Die **Tab. 18** zeigt die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme und Koenzyme.

**Tab. 18:** Verwendete Enzyme und Koenzyme mit Herstellerangabe.

Enzym, Koenzym	Hersteller
[1- <sup>14</sup> C]-Acetyl-CoA, 0,02 mSi/mL	PerkinElmer
Antarctic Phosphatase	NEB
Coenzym A-Lithiumsalz	Sigma-Aldrich
Expand High Fidelity <sup>PLUS</sup> PCR System	Roche
Klenow Enzym (DNA Polymerase I)	NEB
Lysozym	Carl Roth
[2- <sup>14</sup> C]-Malonyl-CoA, 0,01 mSi/mL	PerkinElmer
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene
Restriktionsenzyme (incl. BSA, wenn nötig)	NEB*
RNase A (Ribonuklease A)	Carl Roth
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	Fermentas
T4-DNA Ligase	NEB, bzw. auch von Jena Bioscience
<i>Taq</i> DNA Polymerase	NEB
Trypsin, Art. Nr. V5113	PROMEGA
* grundsätzlich von NEB bezogen, jedoch zusätzlich gängige Restriktionsenzyme, wie <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RV, <i>Hind</i> III, <i>Sal</i> I, <i>Not</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Rsa</i> I und <i>Xba</i> I von der Firma Jena Bioscience verwendet	

### F 1.3.3 Antibiotika

Alle verwendeten Antibiotika sind in **Tab. 19** mit Konzentrationsangaben aufgelistet.

**Tab. 19:** Verwendete Antibiotika mit Konzentrationsangaben.

Antibiotikum	Stammlsg.-Konz.	Arbeitskonz.	Hersteller
Ampicillin-Natriumsalz <sup>[a]</sup>	100 mg/mL	100 µg/mL	Carl Roth
Apramycin-Sulfat	50 mg/mL	50 µg/mL	Sigma-Aldrich
Carbenicillin-Dinatriumsalz*	50 mg/mL	50 µg/mL	Carl Roth
Chloramphenicol	34 mg/mL	34 µg/mL	Fluka / Riedel-de-Haën
Gentamycin-Sulfat (590 U/mg)	20 mg/mL	20 µg/mL	Carl Roth
Kanamycin-Sulfat	50 mg/mL	50 µg/mL	Carl Roth
Nalidixinsäure	25 mg/mL	1000 µg/mL <sup>[b]</sup>	Carl Roth
Polymyxin B Sulfat (6500 U/mg)	64 mg/mL	64 µg/mL (300 U)	Carl Roth
Streptomycin	50 mg/mL	50 µg/mL	Sigma-Aldrich
K <sub>2</sub> TeO <sub>3</sub> , Kaliumtellurit	1028 mg/mL	1028 µg/mL	Sigma-Aldrich
Tetracyclin-Hydrochlorid	1 g/10 mL <sup>[c]</sup> ; 25 mg/mL	50 µL/200 mL <sup>[c]</sup> ; 12,5 µg/mL	Fluka / Riedel-de-Haën
Vancomycin hydrochlorid	10 mg/mL	10 µg/mL	Carl Roth
<sup>[a]</sup> meist wurde Ampicillin durch das stabilere Carbenicillin ersetzt			
<sup>[b]</sup> die Agarplatten ( mit 25 mL Inhalt) wurden mit 1 mL Stammlösung überschichtet			
<sup>[c]</sup> für die Induktion von Chaperonen			

Die Antibiotika wurden in Milli-Q<sup>®</sup>-Wasser gelöst, außer Chloramphenicol (in 100% Ethanol) und Nalidixinsäure (in 8 mM wässriger NaOH). Es wurden grundsätzlich Aliquots von 1 mL Stammlösung angefertigt, steril filtriert und bei -20 °C gelagert. Agarplatten mit Antibiotika wurden für bis zu 3 Monate lang bei 4 °C gelagert.

### F 1.4 Verbrauchsmaterialien

Die sehr häufig benutzten Einwegverbrauchsmaterialien aus Plastik, wie Mikrozentrifugenröhrchen und Falcon-Röhrchen, Cryoröhrchen, serologische Pipetten, Pipettenspitzen, Mikrotiterplatten und Petrischalen wurden ausschließlich von der Fa. Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Glasware im Allgemeinen, wie Messzylinder (500 mL und 1000 mL), Pipetten (5 mL, 10 mL und 20 mL), Pasteurpipetten, Rundkolben, Spitzkolben, Erlenmeyerkolben (sowohl mit, als auch ohne Schikane) und Bechergläser wurden von der ZVE bezogen. Alle speziellen Verbrauchsmaterialien sind in der **Tab. 20** aufgelistet.

**Tab. 20:** Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Firma, Sitz
Cellophan-Folien + Gel Trocknungsrahmen	Carl Roth, Karlsruhe
Celluloseacetat-Folie OTB (25x130 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Elektroporationsküvette 2 mm	BIO-RAD, München
Glaswolle	Carl Roth, Karlsruhe
Halb-Mikroküvette (1,6 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Kieselgel „Unisil“ 100-200 mesh	Clarkson, South Williamsport (USA)
Mikroküvette UltraVette (70-850 µL)	Carl Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, großvolumig (4 mL)	Fisher Scientific, Schwerte
Poly-Prep® Chromatographiesäule (leer), 0,8 x 4 cm, für Ni-NTA	BIO-RAD, Hercules (USA)
Probenfläschchen für Autosampler (HPLC und GC)	Carl Roth, Karlsruhe
Schraubdeckelgläschen mit PTFE Dichtung für Lipidanalytik, 15 mL, #27159	Supelco/Sigma-Aldrich
Sterilfilter (0,2 µm, Celluloseacetat, FP 30/0,2)	Whatman / Schleicher & Schuell, Dassel
VivaSpin 500 Zentrifugaleinheiten <sup>[a]</sup>	Sartorius, Göttingen
VivaSpin 15R Zentrifugaleinheiten <sup>[b]</sup>	Sartorius, Göttingen
ZipTip (C4 bzw. C18)	Millipore, Billerica (USA)
<sup>[a]</sup> MWCO 5.000, 10000, 30000, 100000, 300000) im 2 mL Mikrozentrifugenröhrchen-Maßstab	
<sup>[b]</sup> MWCO 100000, im 50 mL Falcon-Röhrchen-Maßstab	

## F 1.5 Technische Geräte

In den folgenden zwei Abschnitten sind alle verwendeten technischen Geräte aufgeführt.

### F 1.5.1 Massenspektrometer und andere Großgeräte

In **Tab. 21** sind alle zur Protein und Fettsäureanalytik verwendeten Massenspektrometer und andere Großgeräte aufgelistet.

**Tab. 21:** Verwendete Massenspektrometer und andere Analytik-Großgeräte.

Gerät	Gerätename	Hersteller	Säule
ESI-FT/MS	ESI-FT-ICR-MS	Bruker Daltonik, Bremen	
FPLC		ÄKTA	Superdex 200 prep grade (GE Healthcare, München)
GC	GC-2010	Shimadzu	HP-5, 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm df, (5%-Phenyl) – methylpolysiloxan (Agilent)
GC/MS	QP-2010	Shimadzu	HP-1, 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm df, Dimethylpolysiloxan (Agilent)
HPLC		Jasco, Groß-Umstadt	100, 250 x 4 mm, 5 µm (Machery-Nagel, Düren)
LC/MS, bzw. ESI/MS	HPLC/ESI-micro TOF-Q-MS	Bruker Daltonik, Bremen	HPLC-Anlage Agilent 1200 Series mit der Säule C18 Nucleodur 100, 125 x 2 mm, 5 µm; C18 PerfectChrom (Machery-Nagel, Düren)
MALDI/MS	MALDI-TOF-TOF-MS	Bruker Daltonik, Bremen	Matrix HCCA

### F 1.5.2 Laborgeräte

Alle verwendeten Laborgeräte sind in nachfolgender **Tab. 22** aufgelistet.

**Tab. 22:** Verwendete Laborgeräte (außer Analytik-Großgeräte).

Gerät	Firma, Sitz
Agarosegelelektrophorese-Kammer Agagel Midi-wide und Agagel Mini, mit Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Agarosegelelektrophorese-Kammer mit Power Pack Basic	Bio-Rad, München
Analysenwaage CP225D	Sartorius, Göttingen
Autoklav V65	Systec, Wettengel
Drehschiebervakuumpumpe RZ6	Vacuubrand, Wertheim
Elektroporator MicroPulser	Bio-Rad, München
Gefriertrockner: Heto PowerDry LL3000	Thermo, Langenselbold
Filmkassette Fujix BAS IP Cassette 20x40 cm	Fuji, Düsseldorf
French Press, start up set -20K	Thermo Electron Corp.
Geldokumentation Gene Genius	Syngene, Cambridge (UK)
Inkubationsschüttler Certomat BS-1	Sartorius, Göttingen
Inkubator B12	Thermo, Langenselbold
Membranvakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikroskop, Nikon eclipse 50i, Fluoreszenz, Phasenkontrast, mit Digitalkamera Nikon DS-2MBWC	Nikon, Düsseldorf

Mikrowelle Lifetec	Medion, Essen
Mikrozentrifuge ungekühlt Mikro200	Hettich, Tuttlingen
Mikrozentrifuge, gekühlt 5417R	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge, gekühlt Mikro200R	Hettich, Tuttlingen
Minigel Twin (Gelelektrophoresesystem vertikal),	Biometra, Göttingen
Multigel Twin (Gelelektrophoresesystem vertikal), G44	Biometra, Göttingen
Multigel Long (Gelelektrophoresesystem vertikal) mit Standard PowerPack P25	Biometra, Göttingen
PH-meter: Tisch pH-Meter pH 213 mit pH-Elektrode HI 1131 B	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphoimager Fujix BAS1000	Raytest, Straubenhardt
Phosphoimagerplatte Imaging Plate BAS-III S 20x40 cm	Fuji, Düsseldorf
Photometer (Biophotometer)	Eppendorf, Hamburg
Photometer BioMate 3	Thermo Electron, Cambridge (UK)
Pipetten Pipetman P2 - P10 mL	Gilson, Middleton (USA)
ProteanII xi cell (SDS-Gelelektrophorese)	Bio-Rad, München
Rotationsverdampfer VV2000	Heidolph, Kelheim
Schüttler Rotamax 120	Heidolph, Kelheim
SpeedVac / Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Biowizard	Kojair, Vilppula (FIN)
Thermocycler T-Gradient	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Trocknungsrahmen für SDS-PAGE Gele	Carl Roth, Karlsruhe
Ultraschallhomogenisator SONOPULS UW2070 (20 kHz, 210 $\mu$ ms, mit SH70G und MS73, Generator GM2070 =70W	Bandelin, Berlin
UV-Crosslinker CL1000	UVP, Cambridge (UK)
Vakuum-Geltrockner Maxidry D64	Biometra, Göttingen
Vakuumkammer für SPE Säulen, Chromabond®	Macherey-Nagel, Düren
Vortex-Mixer VTX-3000L	LMS, Tokio (J)
Waage 440-47N	Kern, Balingen- Frommern
Waage BP110	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge (groß, 1 L Gefäße), Hermle Z 513 K	Hermle, Wehingen
Zentrifuge (mittel, 50 mL Röhrchen) Rotina 35R	Hettich, Tittlingen

## F 1.6 Medien und Puffer

In den folgenden zwei Abschnitten finden sich sowohl alle verwendeten käuflichen Medien und Puffer, als auch die Rezepte zur Herstellung von Medien und Puffern.

### F 1.6.1 Käuflich erworbene Medien(bestandteile) und Puffer

Die verwendeten käuflichen Medien(bestandteile) und Puffer sind in **Tab. 23** aufgeführt.

**Tab. 23:** Verwendete käufliche Medien(bestandteile) und Puffer.

Medium, Mediumbestandteil	Firma, Sitz
Agar, Qualität Kobe I	Carl Roth, Karlsruhe
Fötales Rinderserum	Sigma-Aldrich, Seelze
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Grace's insect medium	Sigma-Aldrich, Seelze
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), pH 7,0	Carl Roth, Karlsruhe
IPL_41 (liquid 1x)	Sigma-Aldrich, Seelze
Kartoffelstärke, löslich	Sigma-Aldrich, Seelze
M199 (liquid 10x)	Sigma-Aldrich, Seelze
MES Puffer, pH 6,0	Sigma Aldrich, Seelze
Overnight Express® Instant TB Medium	Novagen/Merck, Darmstadt
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
SeaPrep®-Agarose	Lonza, Basel (CH)
Schneider Insect medium	Sigma-Aldrich, Seelze
Sojamehl	Becton Dickinson, Heidelberg
TES, pH 8,0	Sigma-Aldrich, Seelze
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tryptic Soy BCarl Roth (TSB)	Becton Dickinson, Heidelberg
Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg



**F 1.6.2 Rezepte für Medien und Puffer**

Im Folgenden finden sich die Rezepte für alle hergestellten Medien und Puffer.

**2CM<sup>[310]</sup>**

1 g NaCl  
 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 10 g lösliche Kartoffelstärke  
 1 mL anorganische Salzlösung\*  
 2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
 2 g Trypton  
 2 g CaCO<sub>3</sub>  
 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 22 g Agar (für Festmedium)

---

*ad* 1000 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

\*anorganische Salzlösung:

1 g FeSO<sub>4</sub>·x 7 H<sub>2</sub>O  
 1 g MgCl<sub>2</sub>·x 6 H<sub>2</sub>O  
 1 g ZnSO<sub>4</sub>·x 7 H<sub>2</sub>O

---

*ad* 1000 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**DSGM Double Strength Germination Medium<sup>[311]</sup>**

1 g Difco Hefeextrakt  
 1 g Difco Casamino Säuren  
 200 µL CaCl<sub>2</sub> (5 M)

---

*ad* 100 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Entfärbepuffer (Coomassie-Färbung)**

300 mL MeOH  
 100 mL Eisessig

---

*ad* 1000 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Färbelösung des Proteingels (Coomassie-Färbung)**

50 mL Eisessig  
 150 mL MeOH  
 1,25 g Brilliant Blau R250

---

*ad* 500 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**LB-Medium (Luria-Bertani)**

10 g Trypton  
 5 g Hefeextrakt  
 5 g NaCl

---

*ad* 1000 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

Für Festmedien wurde dem LB-Medium 15 g/L Agar hinzugefügt.

**LB mit Glucose**

Dem LB-Medium wurde 1 g/L Glucose zugesetzt.

**Lysepuffer pH 8,0 (25/500/0)**

25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl

**Lysepuffer pH 8,0 (50/500/10)**

50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>

**Lysepuffer pH 5,0 (100 mM)**

3,845 g Citronensäure Monohydrat

9,32 g Natriumcitrat x 2 H<sub>2</sub>O

14,6 g NaCl (Endkonz. 500 mM)

50 mL Glycerin

---

*ad* 500 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Lysepuffer pH6,0 (50/300/3)**

10,66 g MES (Endkonz. 50 mM)

17,532 g NaCl (Endkonz. 300 mM)

1 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (Endkonz. 3 mM)

---

*ad* 1000 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**MS Soya Flour Mannitol Medium**

20 g Sojamehl

20 g Mannitol

20 g Agar (für Festmedium)

---

*ad* 1000 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, pH 7,2

**„Nanopure“-Wasser**

Eine 1 L Flasche wurde mit CHCl<sub>3</sub> gespült und trocken gelassen. Dann wurden 900 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> steril filtriert und in die Flasche gefüllt und autoklaviert. Zum Schluss wurden 45 mL CHCl<sub>3</sub> dazugegeben und leicht geschüttelt. Vor dem Benutzen sollte etwas abgewartet werden, damit sich das CHCl<sub>3</sub> absetzen kann.

**Milli-Q<sup>®</sup>-Wasser**

In einem Milli-Q<sup>®</sup> Element System (Firma. Millipore) gereinigtes H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**SDS-Elektrophoresepuffer (10 x)**

250 mM Tris, 2,5 M Glycin, 1% (w/v) SDS

**SDS-Ladepuffer (2 x)**

100 mM Tris-HCl (pH 6,8); 200 mM DTT; 4% (w/v) SDS; 0,2% (w/v)

Bromphenolblau; 20% (v/v) Glycerin.

4,5 mL 1M Tris-HCl, pH6,8

10 mL Glycerin

1 g SDS oder 4 mL 25% SDS (Endkonz. 2%)

0,01 g Bromphenolblau (Endkonz. 0.1 M)  
 0,771 g DTT

---

*ad* 50 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**SDS-Ladepuffer (5 x)**

0,25 M Tris-HCl (pH 8,0); 25 % Glycerin; 7,5% (w/v) SDS; 0,01 g Bromphenolblau; 12,5 % (v/v) Mercaptoethanol.

**SOB Medium**

In 990 mL Wasser wurde Folgendes gelöst und autoklaviert:

5 g Hefeextrakt  
 20 g Trypton  
 0,6 g NaCl  
 0,2 g KCl

Dann wurden 10 mL einer 2 M Magnesiumsalzlösung dazugegeben, die nicht autoklaviert wurde. Sie bestand aus:

5 mL 1 M MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (Endkonz. im SOB Medium 10 mM)  
 5 mL 1 M MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (Endkonz. im SOB Medium 10 mM)

**SOC Medium**

Dem SOB Medium wurden 20 mM Glucose hinzugefügt.

**STE Puffer**

1 mM EDTA (pH 8,0); 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl

**STE Puffer mit Lysozym**

dem STE Puffer 5 mg/mL Lysozym zufügen und steril filtrieren.

**TE Puffer**

10mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)

**TAE Puffer**

0,48% Tris; 0,12% Eisessig (= 40 mM Tris-Acetat); 1mM EDTA (pH 8,0)

Es wurde eine 50 x Stammlösung wie folgt hergestellt:

242 g Tris Base  
 57,1 mL Eisessig  
 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)

---

*ad* 1000 mL mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

## **F 2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden**

In den folgenden Abschnitten werden alle angewandten molekularbiologischen und mikrobiologischen Methoden beschrieben, zunächst im Allgemeinen und danach im Speziellen.

### **F 2.1 Lagerung der Stämme und Vektoren**

Zur langfristigen Lagerung und Sicherung der Bakterienstämme und Vektoren wurden 750  $\mu\text{L}$  der entsprechenden Übernachtskulturen in 2 mL-Cryoröhrchen überführt und mit der gleichen Menge sterilem, 30%-igem, Glycerin versetzt. Nach kurzer Einwirkzeit wurden die Röhrchen dann bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  dauerhaft eingefroren.

### **F 2.2 DNA-Extraktion**

Eine der beim Klonieren am häufigsten angewandten Methoden ist das Extrahieren von Plasmid-DNA aus Bakterien (=Miniprep). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aber auch genomische DNA isoliert, z. B. aus *S. albus* und während der Kultivierungsversuche des *Paederus*-Symbionten.

#### **F 2.2.1 Übernachtskulturen**

Übernachtskulturen sind die Voraussetzung, sowohl für Minipreps und Extraktionen genomischer DNA, als auch für den Ansatz von größeren Kulturen von 100 mL oder mehr Volumen (z. B. für die Herstellung kompetenter Zellen). Es wurde ein steriles Reagenzglas mit ca. 3 mL LB-Medium inkl. dem entsprechendem Antibiotikum vorbereitet. Dann wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine kleine Menge von der Oberfläche der gefrorenen  $-80^{\circ}\text{C}$  Gefrierkultur abgekratzt und mit samt dem Zahnstocher in das Medium geworfen. Das Röhrchen wurde schräg in einen Schüttelinkubator gestellt und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ü/N (~16 h) mit 200 rpm geschüttelt.

Zur Vorbereitung der Isolation genomischer DNA aus *S. albus* wurden 20 mL LB-Medium plus 200  $\mu\text{L}$  einer 20%-igen Glycinlösung im 100 mL Erlenmeyerkolben mittels Zahnstochers mit Sporen angeimpft und ü/N bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit 200 rpm geschüttelt.

## F 2.2.2 Plasmidpräparation (Miniprep)

Mit der folgenden Methode lässt sich eine Plasmidpräparation herstellen, die im Vergleich zum Kit der Firma Qiagen eine etwas höhere DNA-Konzentration (~250 ng/μL), aber auch eine höhere RNA-Kontamination aufweist.

### Miniprep Protokoll

Am Tag nach dem Ansatz der Übernachtskultur wurden 1,5 mL der Kultur in ein 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen dekantiert und bei 10.000 rpm für 30 s abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 200 μL Puffer 1 (Tab. 24) resuspendiert. Nach ~10 min Einwirkzeit bei Raumtemperatur (für die Tätigkeit der RNase A) wurden 200 μL Puffer 2 dazugegeben und das Gefäß 2-4-mal invertiert. Danach wurden 200 μL Puffer 3 dazugegeben und 2-4-mal invertiert. Dann wurde 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der klare Überstand in ein vorbereitetes 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen mit 500 μL Chloroform pipettiert. Nach kräftigem Invertieren wurde bei 4 °C und 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde ein 1,5 mL-Mikrozentrifugenröhrchen mit 350 μL Isopropanol vorbereitet, in das nach dem Zentrifugieren die obere der zwei entstandenen Phasen (~500 μL) gegeben wurde. Die Plasmid-DNA wurde bei 4 °C und 13.000-14.000 rpm für 20 min pelletiert und mit 500 μL eiskaltem 70%-igem EtOH durch kurzes Zentrifugieren bei 14.000 rpm gewaschen. Dann wurde der Ethanol vorsichtig abpipettiert und in die Reste in der SpeedVac abgedampft. Die getrocknete DNA wurde in 50 μL Milli-Q®-Wasser aufgenommen.

Tab. 24: Puffer für die Plasmidpräparation (Miniprep).

Puffer	Zusammensetzung (in Milli-Q®-H <sub>2</sub> O)
Puffer 1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 100 μg/ml RNase A, gelöst in TE-Puffer <sup>[a]</sup> Lagerung bei 4 °C
Puffer 2	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS Lagerung bei RT
Puffer 3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5 Lagerung bei 4 °C
<sup>[a]</sup> 10 mg der RNase A wurden in 1 ml TE-Puffer gelöst, 1 min bei 99 °C gekocht und zu 99 mL der autoklavierten Lösung aus Tris-HCl und EDTA gegeben.	

### F 2.2.3 Extraktion genomischer DNA

Es kamen zwei einander sehr ähnliche Protokolle zur Anwendung: eines zur Extraktion der genomischen DNA aus *S. albus* für nachfolgende Kontroll-PCR auf das richtige Insert, und das andere zur Extraktion möglicher *Paederus*-Symbionten-DNA, ebenfalls Voraussetzung für PCRs.

#### DNA-Extraktion aus *S. albus*

Von der Übernachtskultur wurde 1 mL bei 10.000 rpm für 2 min pelletiert und in 500 µL STE-Puffer mit Lysozym resuspendiert. Die Mikrozentrifugenröhrchen wurden mindestens 1,5 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert bevor 500 µL 10% (w/v) SDS und 100 µL 3 M Natriumacetat hinzugefügt und 30 min lang bei 37 °C weiter inkubiert wurde. Dann wurde die wässrige Phase in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen mit 250 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gegeben, gevortext und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (alles unter dem Abzug!). Der letzte Schritt wurde jeweils mit dem Überstand 2-mal wiederholt. Zum Schluss wurde der Überstand in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen mit 600 µL Isopropanol überführt, gevortext und für 2 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µL 70%-igem eiskaltem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die genomische DNA wurde in 50 µL TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

#### Isolation genomischer DNA aus *Paederus*-Symbionten

Von der Kultur, bzw. der Glycerin-Gefrierkultur, wurde 1 mL bei 10.000 rpm für 2 min pelletiert, das Pellet in 500 µL Milli-Q<sup>®</sup>-Wasser gewaschen und in 470 µL STE-Puffer mit Lysozym resuspendiert. Anschließend wurden 30 µL 10%-iges (w/v) SDS hinzugefügt und 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Dann wurde die wässrige Phase in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen mit 500 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gegeben, gevortext und für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Extraktion des Überstandes wurde 1-mal wiederholt. Zum Schluss wurde der Überstand in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen mit 264 µL Isopropanol plus 40 µL 3 M NaOAc (pH 5.2) überführt, gevortext, 1 h bei -20 °C stehen gelassen, und 2 min lang bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 1 mL 70% -igem, eiskaltem Ethanol gewaschen (nochmal 2 min, 14.000 rpm) und getrocknet. Die genomische DNA wurde in 100 µL TE Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

## F 2.3 Restriktionsverdau

Restriktionen (= Verdaue) von Plasmidpräparationen dienen sowohl der Feststellung des Vorhandenseins von Plasmiden, bzw. von Inserten in Plasmiden als auch zum Beweis des Vorhandenseins der richtigen Plasmide/Inserte durch anschließende Analyse der spezifischen Bandenmuster. Eine weitere Anwendung sind Verdau zur Herstellung von linearer DNA für eine anschließende Ligation.

### Restriktionsverdau zur Kontrolle

Zur Erstellung eines Bandenmusters von Plasmiden (z. B. nach Miniprep) wurden 10 µL-Restriktionsansätze ( **Tab. 25**) hergestellt, die ganz oder zur Hälfte auf das Agarosegel aufgetragen wurden.

**Tab. 25:** Restriktionsansatz (10 µL) für einen Kontrollverdau.

Volumen	Substanz
6.75 µL	Milli-Q®-H <sub>2</sub> O
2 µL	Miniprep (~300 ng/µL)
1 µL	Puffer (10 x)
0,25 µL	<i>EcoRI</i> (20 U/µL)

Standardmäßig wurden 2 µL des Minipreps (50 µL) eingesetzt. Der Puffer und ggf. Rinderserum Albumin (BSA) wurden nach Herstellerangaben verwendet. Vom Enzym wurden 5 Units (U) für den 10 µL Ansatz eingesetzt. Die Inkubationszeit und -temperatur war vom Enzym abhängig. Für *EcoRI*, *EcoRV* und viele andere Enzyme galt eine Inkubation von 1 h bei 37 °C.

### Restriktionsverdau zur Präparation von Ligationspartnern

Die Verdaue zur Gewinnung linearer DNA für eine Ligation wurden im 50 µL-Maßstab angesetzt, weil durch die nachfolgenden Prozesse (Gelextraktion, Fällung, etc.) viel DNA verloren ging. Einen beispielhaften Ansatz zeigt **Tab. 26**.

**Tab. 26:** Restriktionsansatz (50 µL) für einen Verdau zur Präparation.

Volumen	Substanz
32 µL	Milli-Q®-H <sub>2</sub> O
10 µL	Miniprep (~250 ng/µL)
5 µL	Puffer (10 x)
0.5 µL	BSA (100 x)
2.5 µL	<i>EcoRV</i> (20 U/µL)

Der Verdau wurde nach Enzymherstellerangaben (z. B. bei 37 °C) inkubiert. Meist wurde jedoch die Inkubationszeit von 1 h auf 2 h verlängert.

## F 2.4 Klenow-Auffüllung

Diese Methode wurde angewendet, um 5'-Überhänge, die klebrige Enden („sticky ends“) darstellen, zu glatten Enden („blunt ends“) aufzufüllen. Daran anschließend wurde eine „blunt-end“-Ligation durchgeführt. Folgender Ansatz wurde pipettiert:

30 µL gereinigtes PCR-Produkt

4,5 µL Milli-Q<sup>®</sup>-H<sub>2</sub>O

4 µL Klenow-Puffer

0,5 µL dNTP-Mix (10 mM)

1 µL Klenow-Enzym

---

30 min bei RT

Nach der anschließenden Fällung wurde die DNA in 10 µL Milli-Q<sup>®</sup>-Wasser gelöst.

## F 2.5 Dephosphorylierung

Zum 50 µL Verdau wurden 5 µL Antarctic Phosphatase Puffer und 5 µL Antarctic Phosphatase hinzugefügt, vermischt und bei 37 °C für 30 min inkubiert, wobei zur Hälfte der Zeit nochmals 5 µL Antarctic Phosphatase hinzugefügt wurden. Der Ansatz wurde anschließend entweder für 5 min bei 65 °C inaktiviert oder gefällt.

## F 2.6 DNA Fällung

Dieses Protokoll eignet sich gut für die Fällung zirkulärer oder geschnittener Plasmid-DNA, aber nicht für nicht für genomische DNA.

Zum dem Reaktionsansatz (z. B. Verdau oder Dephosphorylierung) wurde die 10-20-fache Menge an 70%-igem Isopropanol (in Milli-Q<sup>®</sup>-Wasser) gegeben und gevortext. Danach wurde bei 4 °C und 14.000 rpm für 20-30 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet (meist unsichtbar) wurde mit der gleichen Menge wie der 70% Isopropanol zuvor an eiskaltem 70%-igem Ethanol bedeckt und kurz bis 14.000 rpm zentrifugiert. Nach dem restlosen Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in der SpeedVac getrocknet (45 °C für ca. 10 min) und in 5 oder 10 µL Milli-Q<sup>®</sup>-Wasser gelöst.



## F 2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung der Agarose-Gele wurde 0.8% (w/v) Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, 0,1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  Ethidiumbromid hinzugegeben und die Lösung in einem Gelschlitten mit eingesetztem Kamm erkalten und erhärten gelassen. Dann wurde der Schlitten in die Gelkammer eingesetzt und das Gel mit TAE-Puffer bedeckt.

In die nach Entfernung des Kammes entstandenen Taschen wurde die zu trennende DNA-Probe aufgetragen. Vor dem Auftragen wurde die DNA mit ca. 1/5-1/10 ihres Volumens an Laufpuffer versetzt. Bei Fragmentgrößen kleiner als 1000 bp wurde ein Xylencyanol Puffer eingesetzt (0,25% (w/v) Xylencyanol, 30% (v/v) Glycerin) und bei Fragmenten, die größer als 1.000 bp waren, wurde ein Bromphenol-Blau Puffer eingesetzt (0,25% (w/v) Bromphenolblau, 30% (v/v) Glycerin). Bei „diagnostischen“ Gelen wurden von den PCR Produkten meist 8  $\mu\text{L}$ , vom Verdau meist 5  $\mu\text{L}$  und zur Kontrolle von geschnittener aufgereinigter DNA meist 1  $\mu\text{L}$  aufgetragen. Im Falle von Gelen zur Aufreinigung von DNA (sogen. präparativen Gelen) wurden 50  $\mu\text{L}$  in einer entsprechend breiteren und tieferen Tasche aufgetragen. Als Größenstandard dienten jeweils 3  $\mu\text{L}$  entweder des „1kb“ Markers oder des „100 bp extended“ Markers von der Firma Carl Roth (Karlsruhe).

Die Gele wurden meist bei 120 V für ca. 30 min in TAE-Puffer laufen gelassen und anschließend unter UV-Licht mittels eines Geldokumentationsgerätes ausgewertet. Wenn die Banden aus dem Gel ausgeschnitten werden sollten, wurde anders verfahren (siehe F 2.8).

## F 2.8 Isolierung von DNA Banden aus dem Gel

Es wurden zunächst präparative Agarosegele angefertigt (F 2.7). Weil das UV-Licht im Geldokumentationsgerät der aufzureinigenden DNA schaden könnte, wurde folgendes Verfahren zum Ausschneiden der DNA-Banden angewendet:

In die erste Geltasche wurde der entsprechende Marker pipettiert, in die rechts danebenliegenden beiden Taschen wurden 5  $\mu\text{L}$ , bzw. 45  $\mu\text{L}$  der DNA pipettiert. Nach dem Lauf wurde mittels eines Skalpell die Bahn mit den 45  $\mu\text{L}$  DNA von dem übrigen Gel separiert, das Gel unter UV-Licht betrachtet (mit Augenschutz!) und mit dem Skalpell die Position der Bande auf der 5  $\mu\text{L}$  Bahn markiert. Jetzt

wurde die vorher separierte Bahn dem Gel wieder hinzugefügt, wobei auf Passgenauigkeit geachtet wurde. Anhand der benachbarten Markierung auf der 5 µL Bahn konnte nun die entsprechende Bande in gleicher Position auf der 45 µL Bahn ausgeschnitten werden. Das Gelstück wurde zur Extraktion in ein 2 mL-Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die Extraktion erfolgte mit dem "QIAquick gel extraction kit" der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerprotokoll.

## F 2.9 Transformation

Die DNA wurde entweder mit der Hitzeschock- Kälteschock- Methode in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen oder mittels Elektroporation in elektrokompente Zellen von *E. coli* oder *P. putida* transformiert. Die Elektroporation von *C. glutamicum* erfolgte im AK L. Eggeling (FZ Jülich) nach einem in der Literatur beschriebenen Protokoll.<sup>[312]</sup>

Im Falle von *S. albus* wurde die Konjugation nach Flett et al.<sup>[313]</sup> durchgeführt.

### F 2.9.1 Hitzeschock-Kälteschock-Transformation

Diese Methode kam ausschließlich dann zum Einsatz, wenn nach der Ligation die 10 µL fassenden Ansätze komplett in Bakterien transformiert werden sollten.

#### Herstellung chemisch kompetenter Zellen

100 mL LB Medium wurden mit 2 mL ü/N Kultur angeimpft und bei 37 °C mit 200 rpm geschüttelt. Wenn eine OD<sub>600</sub> 0,4-0,5 erreicht war, wurde abzentrifugiert (5 min bei 4 °C, 5.000 rpm) und der Überstand verworfen. Dann wurde das Pellet auf Eis in 25 mL TFB I (**Tab. 27**) vorsichtig gelöst. Nach 10 min Inkubation wurde erneut abzentrifugiert und das Pellet auf Eis in 4 mL TFB II gelöst. Danach wurden die Zellen auf ca. 40 1,5 mL-Mikrozentrifugenröhrchen in 100 µL Aliquots verteilt und bei -80 °C eingelagert.

**Tab. 27: Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen**

Lösung	Zusammensetzung (in Milli-Q®-H <sub>2</sub> O)
TFB I	30 mM Kaliumacetat, 10 mM Calciumchlorid, 100 mM Kaliumchlorid, 50 mM Manganchlorid, 15% (v/v) Glycerin
TFB II	10 mM MOPS (steril filtriert), 75 mM Calciumchlorid, 10 mM Kaliumchlorid, 15% (v/v) Glycerin

### **Hitzeschock-Kälteschock-Transformation**

Es wurde der komplette (inaktivierte) 10 µL-Ligationsansatz in die Mitte der chemisch kompetenten Zellen pipettiert, vorsichtig untergemischt und auf Eis für mindestens 15 min inkubiert. Jetzt wurde das 1,5 mL-Mikrozentrifugenröhrchen schnell in ein 42 °C warmes Wasserbad überführt, dort für exakt 60 s gelassen und dann ebenso zügig wieder auf Eis gestellt. Nach 2 min wurde den Zellen 900 µL kaltes SOC-Medium (ohne Antibiotika) hinzugefügt und bei 37 °C, 200 rpm 1 h lang inkubiert. Dann wurden entweder nur 100-200 µL davon, oder der komplette Milliliter auf eine vorgewärmte Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika, sowie IPTG und X-Gal (für Blau-Weiß-Selektion) ausgebracht und bei 37 °C ü/N inkubiert. Die transformierten Bakterien erschienen als Einzelkolonien auf der Agarplatte.

### **F 2.9.2 Elektroporation**

Diese Methode wurde standardmäßig für *E. coli*, *P. putida* und *C. glutamicum* (im FZ Jülich) angewendet.

### **Herstellung elektrokompetenter Zellen**

Von dem entsprechenden Bakterienstamm wurde eine ca. 5 mL fassende Übernachtskultur erstellt. Am nächsten Morgen wurden in einen 500 mL EM-Kolben 200 mL LB-Medium gefüllt und (je nach Bakterienstamm) Antibiotikum oder keines hinzugefügt und mit der kompletten Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden für ca. 3 Stunden bei 37 °C mit 200 rpm geschüttelt und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,7 auf Eis gestellt. Dann wurde die Kultur auf vier 50 mL-Falcon-Röhrchen durch Dekantieren aufgeteilt und bei 4 °C und 5.000 rpm 5 min lang abzentrifugiert, die Überstände verworfen und die Röhrchen mit den Pellets auf Eis gestellt. Dann wurden die Pellets vorsichtig in 25 mL eiskaltem 10%-igem Glycerin resuspendiert und erneut bei 4 °C, 5.000 rpm 5 min lang abzentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurden die Röhrchen wieder auf Eis gestellt und die Pellets von jeweils zwei Röhrchen mit 25 mL eiskaltem 10%-igem Glycerin vereinigt und wieder bei 4 °C, 5.000 rpm 5 min lang abzentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurden die Röhrchen wieder auf Eis gestellt, die zwei Pellets mit 25 mL eiskaltem 10%-igem Glycerin in einem 50 mL-Falcon-Röhrchen vereinigt und bei 4 °C, 5.000 rpm 5 min lang abzentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Röhrchen wieder

auf Eis gestellt, und 10 mL eiskaltes 10%-iges Glycerin hinzugefügt, resuspendiert und ein letztes Mal bei 4 °C, 5.000 rpm 5 min lang zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Röhrchen wieder auf Eis gestellt und das Pellet in 0,5-1 mL eiskaltem 10%-igem Glycerin gelöst. Die entstandene hochkonzentrierte Bakteriensuspension wurde (auf Eis) in 70 µL Aliquots auf ca. 20 1,5 mL-Mikrozentrifugenröhrchen verteilt und bei -80 °C gelagert.

Wichtig bei der Prozedur war die Verwendung von 50 mL (!)-Falcon-Röhrchen und das durchgängige Verarbeiten der Bakterien auf Eis. Wurden die Zellen einmal weniger mit Glycerin gewaschen, so ließ sich später in sie nur eine geringere Menge an DNA elektroporieren.

### **Elektroporation**

Diese Methode funktioniert nach dem Prinzip, dass ein starkes elektrisches Feld temporär kleine Löcher in den Zellmembranen von Mikroorganismen verursachen kann, wodurch die fremde DNA aufgenommen wird.

Es wurden 1,5 µL hochkonzentrierter DNA (z. B. Miniprep) oder bis zu 5 µL gering konzentrierter DNA (z. B. Ligationsansatz) eingesetzt. Im Falle einer Ligation wurde diese meist vorher mittels DNA Fällung aufkonzentriert. Die gesamte Prozedur (außer dem Elektroschock selber) fand auf Eis statt.

Die DNA wurde in die Mitte des Aliquots elektrokompetenter Zellen pipettiert und vorsichtig vermischt. Nach wenigen Minuten Inkubation wurden die Zellen in die Elektroporationsküvette transferiert, diese leicht geschüttelt und auf die Tischplatte aufgestoßen und dann in den Elektroporator („Micropulser“) gestellt. Grüne Küvetten (0,2 cm Dicke) verlangen die Einstellung „Ec2“, braune die Einstellung „Ec1“. Nach Drücken der Taste „pulse“ erfolgte das kurzzeitige Anlegen einer Spannung von 2,5 kV. Dann wurde die Küvette aus dem Gerät genommen und ohne Zeitverzögerung 900 µL LB- oder (besser) SOC-Medium ohne Antibiotikum hinzugefügt. Das weitere Verfahren war analog zu dem nach Hitzeschock-Kälteschock-Transformation.

## F 2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient zur Vervielfältigung von DNA unter Verwendung einer thermostabilen Polymerase. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode entweder zum Amplifizieren von DNA für deren anschließende Klonierung oder zum Nachweis des Vorhandenseins bestimmter DNA-Sequenzen eingesetzt.

### F 2.10.1 PCR zur Kontrolle

Grundsätzlich wurde hierfür die preiswerte *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Ein Standardprotokoll für einen 50 µL Ansatz war wie folgt:

42,25 µL Milli-Q®-Wasser  
 5 µL *Taq* Puffer 10X  
 0,5 µL 5'-Oligonukleotid 50 µM  
 0,5 µL 3'-Oligonukleotid 50 µM  
 1 µL dNTP-Mix 10mM pro dNTP  
 0,5 µL Matrize (z. B. Miniprep)  
 0,25 µL *Taq*-Polymerase (1,25 Units)

Die Standardeinstellung des PCR-Thermocyclers (PCR-Programm) für eine Gradienten-PCR waren wie folgt:

Deckel 106°C, Vorheizen: ein

- 1) 96 °C - 45'
- 2) 96 °C - 45''
- 3) 50 °C - 45'' → Gradient 10,0
- 4) 72 °C - 1', 30 Zyklen der Schritte 2-4
- 5) 72 °C - 10'
- 6) 4 °C - Pause

### Kolonie-PCR

Anstelle extrahierter DNA wurden direkt die DNA-tragenden *E. coli*-Zellen in den PCR Ansatz gegeben. Im Ansatz wurde entweder ein Teil einer Kolonie von der Agarplatte, 1 µL einer Kolonie-Suspension in 200 µL Medium, oder 0,5 µL einer Übernachtskultur eingesetzt. Das PCR-Programm blieb unverändert, nur der erste Schritt wurde auf 5 min verlängert.

### F 2.10.2 „Proofreading“-PCR für späteres Klonieren

Hierfür wurde anstelle der *Taq*-DNA-Polymerase das „Expand High Fidelity<sup>PLUS</sup> PCR system“ (Firma Roche) verwendet. Das System besitzt 3'→5'-Exonucleaseaktivität und 3'-Adenylierungsaktivität, entfernt also falsch eingebaute Nukleotide und ersetzt sie durch neue. Außerdem wird (wie bei der

*Taq*-DNA-Polymerase auch) zumindest bei einem Teil der Produkte ein einzelnes überhängendes Adenosin-Nukleotid am 3'-Ende angefügt. Das alles ist möglich, weil das System eine sogenannte Proofreading-(oder High-Fidelity-)Polymerase und die normale *Taq*-Polymerase enthält, welche für die 3'-A-Überhänge verantwortlich ist. Die A-Überhänge werden für die spätere T/A-Klonierung benötigt. Ein Standardprotokoll für einen 50 µL Ansatz war wie folgt:

34,75 µL Milli-Q<sup>®</sup>-Wasser  
 10 µL Expand High Fidelity<sup>PLUS</sup>-Puffer  
 2,5 µL DMSO  
 0,5 µL 5'-Oligonukleotid 50 µM  
 0,5 µL 3'-Oligonukleotid 50 µM  
 1 µL dNTP-Mix 10mM pro dNTP  
 0,5 µL Matrize (meist Miniprep von pSW1H8)  
 0.25 µL Expand High Fidelity<sup>PLUS</sup> (1,25 Units)

Die Einstellung des PCR-Thermocyclers (PCR-Programm) waren grundsätzlich dieselben, wie bei der Kontroll-PCR. Meist wurden die günstigsten Parameter (z. B. die Annealingtemperatur) aus Kostengründen vorher mit dem „normalen“ *Taq*-Polymerase-Ansatz ermittelt.

### F 2.10.3 PCR-Oligonukleotide (Primer)

Die Primer (=Oligonukleotide) wurden grundsätzlich online bei der Firma Invitrogen bestellt. Von den lyophilisiert angelieferten Primern wurden 500 µM Stammlösungen in TE-Puffer hergestellt. Letztere wurden vor dem Einsatz in der PCR 1:10 mit Milli-Q<sup>®</sup>-Wasser verdünnt. In **Tab. 28** sind alle verwendeten Oligonukleotide aufgelistet.

**Tab. 28:** Verwendete Oligonukleotide (Primer) für die PCR. Restriktionsstellen unterstrichen, Stop-Codons fett, Start-Codons kursiv.

Name	Sequenz	Beschreibung
<b><i>sup</i>-Cluster – Anfangsabschnitte</b>		
A left supcluster pJB861 f	AAA <u>ACA TGT</u> ATG GTA TAC CGC ATC GTT T	Teil A , pTH84 (T/A pTH14)
ABC trans XbaI f new	A <u>TCT AGA</u> ATG GTA TAC CGC ATC GTT TCA CTA CTG CCG	<i>sup</i> -cluster, Teil A, pTH60 (T/A pTH49_1)
ABC trans NdeI f	AAA <u>CAT ATG</u> GTA TAC CGC ATC GTT TCA CTA CTG CCG	<i>sup</i> -cluster, Teil A , pTH36

ABC trans NotI r	<u>AGC GGC CGC</u> CAG GTA ATG GGC GGT GTA TGC	pTH60 (T/A pTH49)
A left supcluster pJB861 r	AAA <u>GCG GCC GCT</u> GCA TCG ACG AGA CCA TAT	~630 bp pTH84 (T/A pTH14)
ABC trans NcoI r	AAA TTC <u>CAT GGC</u> AGG TAA TGG GCG GTG TAT GC	pTH36, (T/A pTH49)
<b>sup-Cluster - Endabschnitte</b>		
end supE nat XhoI f	GCA <u>ACT CGA GGG</u> TGC GCT CGA GAT CAT CAA G	sup-cluster, Teil B, pTH36
End supE NotI f	GCA <u>AGC GGC CGC</u> GGT GCG CTC GAG ATC ATC AAG	pTH84, pTH60 (T/A pTH50)
end supE XhoI r	AAA <u>CTC GAG</u> GGG TCG GCG TGA CCG GTC G	pTH36
end supE SspI r	AAA <u>ATA TTG</u> GGT CGG CGT GAC CGG TCG	pTH84, pTH60 (T/A pTH50)
<b>supA - Anfangsabschnitte</b>		
supA left EcoRI histag f	AAA <u>gaattc</u> ACGAAACTAGCTGATCTCTCC	pTH20 start supA i
supA left XbaI His f	A <u>TCT AGA ATG</u> AAA CAC CAC CAC CAC CAC CAC ggt ggt ctg gtt ACG AAA acg aaa cta gct gat ctc tcc aaa acg acc ggc (Beginn des supA-ORFs in Kleinbuchstaben)	pTH61 Start supA mit XbaI and 6His
Low PKS left new	CAGGACAACGACTCCGCAGCC	Insert pTH20 low
supA left NotI r	<u>AGCGGCCGCC</u> CAGGACAACGACTCCGCAGCC	pTH61
up PKS right f	CGGCAGGCGCAGCAGAATG	pTH3, supA iii, pTH61
Low PKS right EcoRI	AA <u>AGAATT</u> CTGCCGCTAAGAGCTGTGGTCA	pTH3
supA right SspI r	<u>AAATATTTGCCGCTAAGAGCTGTGGTCA</u>	pKJ55; pTH61
<b>supA - Domänen</b>		
supA KS1 SacI f new	AA <u>AGAGCTC</u> ACGAAACTAGCTGATCTCTCCAAAACG	T/A pTH120, pTH127 T/A pTH117, pTH125
supA KS1 HindIII r:	AAAA <u>AGCTTTC</u> AGCTGTATTCTTCCACCACAATGTGGGC	T/A pTH120, pTH127
supA AT1+li SacI f:	AA <u>AGAGCTCCGACAGCGC</u> GAGGCCCGTCTACTGCCT	pTH86, T/A pTH68
supA AT1+li HindIII r:	AAAA <u>AGCTTTC</u> ATAGCAAAGGGTGAACGGCCCTTGGGCG	T/A pTH117, pTH125
KS-AT1 EagI f	<u>AAACGGCCGCTATGACGAACTAGCTGATCTCTCC</u>	T/A pTH113, pTH116
KS-AT1 SacI r	AA <u>AGAGCTCCTTCTCGTCGCCTCGAGCCAGTGGCG</u>	T/A pTH113, pTH116
supA MT long SacI f	AA <u>AGAGCTCGATGACTTAAGGCAACGGCTGGAA</u>	1056 bp, T/A pTH122, pTH129

supA MT long Hind3 r	AAAAAGCTTTCACTGGTTGCGCGCTGTCAACTC	
PKS f	GTTCTGCTCGGCGGACTTA	456 bp, binden in der Mitte von <i>supA</i> ; von K. Zimmermann
PKS r	CGACCTTGACGACGAAACC	
supA ACP Sacl f:	AAAGAGCTCCGGCTGCAGGAGACGCCCGCCGCGGAG	
supA ACP HindIII r:	AAAAAGCTTTCATAGTTCTCCGCCAGATGGCGGGCGAG	
<b>supB</b>		
supB ACP f	AAAGAGCTCACATCAACCGAAGATCGCATC	Sacl, ohne ATG
supB ACP r	AAAAAGCTTTCACCCAGCGTGTGTATCGAGGT	HindIII natürliches TGA
<b>supC</b>		
supC PPt f	AAAGAGCTCTTCGGCAACGATCGGCTCATGGC	Sacl ohne ATG
supC PPt r	AAAAAGCTTTCATCGATACACTCGCCCTGCAT	HindIII natürliches TGA
<b>ped-Cluster</b>		
First8 f	CTGCGCCCTGAGCCTTTTGTGTTG (Jing He)	Anfang von <i>pedF</i> , 634 bp
First8 r	CTAGCCGCAGCCCCTCCATCTGCGGCC	
Seventh1 f	CACCCGAAAGACGTTGATGGA (Jing He)	Stromaufwärts <i>pedI</i> , 790 bp
Seventh1 r	CTAGTGGGCGTTGGGGTTTCTGG	
pedBpf	TTTCTCGAGATCGGCAAGGTTAG	Teil von <i>pedBC</i> , 895bp
pedCpf	GGAATCCTGCAAACCCGTAAG	54 °C
pedI3_pRSETf	AAA AGA TCT GAG CAG AAG GTA TAT GCG GTC ATT ( <i>Bgl</i> II) (Katrin Z.)	555 bp, <i>pedI3</i> , 55 °C
pedI3_pRSETr	AAA AGA TCT TCA TAT CAG GCT CCG TAC GTA CTG ( <i>Bgl</i> II)	
pedOmalF	AAA GGA TCC TCT ATA TCC GCA CCT GAT TTT G ( <i>Bam</i> HI) (Katrin Z.)	1005 bp, <i>pedO</i> , 55 °C
pedO_mal_RP	AAA CTG CAG TCA TTT TTG TGC AGA TAC GAA AAG ( <i>Pst</i> I)	



<b>Klonierung des Replikons für <i>C. glutamicum</i> (rep C.)</b>		
Up rep C. glutamicum	GAG TGT GGC CAT CAA TCC TGC CTA TTT GCC ACG	Kontrolle auf rep C.
Low rep C. glutamicum	AGG GAT CAG AGC TAG GAG CGA GAC ACC CTA AAG	
aadA cassette rev	TCG CTC TCT CCA GGG GAA	Kontrolle auf aadA
up aadA downstream rep C.	CTG CTC TGG CTC TTC CTC GAC TCC CTC CCC CTC AAA AATattccgggatccgctgacc (FRT Stellen der Kassette in Kleinbuchstaben)	pIJ778 verdaut <i>HindIII/EcoRI</i>
low aadA downstream rep C.	CCG TAG AGC GAT CAA AGT TCG GCA ACC CAA GGA GAA GTT tgt agg ctg gag ctg ctt c (FRT Stellen der Kassette in Kleinbuchstaben)	
up CO upstream PKS	CGC CGA ACT AGC AGG GCC TAT CAC CCC ACC GGT CCT CTG tgt ggc cat caa tcc tgc ct (Sequenz von pKG32ctRNAmut in Kleinbuchstaben)	
low CO upstream PKS	CTT GGG GCG AGT TCG GGA TTG CGG AGC ACG ATA GCA CTG aac aaa aaa tgc tct aga a (Sequenz von pKG32ctRNAmut in Kleinbuchstaben)	
<b>sonstige Oligonukleotide</b>		
Primer perme_star f	TCCACACGTGGCACC GCGAT	
T7 f	TAATACGACTCACTATAGGG	
Primer Pm f	GTGTCCGGTTTGATAGG	
KSDPQQF	MNGARGCENNWNMSNATGGAYCCNCARCANMG	nach J. Piel 2002 <sup>[155]</sup>
KSHGTGR	GGRTCNCNARNNSWNGTNCNGTNC CRTG	nach J. Piel 2002 <sup>[155]</sup>
tesA/apeA f	ACCTTCCGTGCCCATATGGCGGACACGTTA	<i>NdeI, XhoI, pTH79</i>
tesA/apeA r	GATCTCCCTCGAGTTATGAGTCATGATTTAC	nach Lee <i>et al.</i> 1997 <sup>[220]</sup>
16S27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	55 °C
16S1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	16S-rRNA, 1.465 bp

## F 2.11 T/A-Klonierung

Diese schnelle und einfache Methode wurde meist zum sogenannten „Subklonieren“ (oder auch „Zwischenklonieren“) von PCR-Produkten in T-Überhang-Vektoren (=T-Vektoren) eingesetzt. Prinzipiell lässt sich mit dieser Methode jedoch jegliche lineare DNA in T-Vektoren ligieren. Der Vorteil des Subklonierens besteht darin, dass eine beliebig große Menge der gewünschten DNA mit absolut fehlerfreier Sequenz (z. B. für Restriktionsverdauung mit anschließender Ligation) zur Verfügung steht. Außerdem muss, falls eine Ligation wiederholt werden muss, nicht wieder ganz von vorn (mit der PCR) angefangen werden.

Bei der T/A-Klonierung wird der Umstand ausgenutzt, dass viele DNA-Polymerasen (z. B. *Taq*-Polymerase) am 3'-Ende jedes PCR-Produkts ein einzelnes überhängendes Nukleotid anfügen. Bei Vorhandensein eines dNTP-Mixes wird vorzugsweise ein A (Adenosin)-Nukleotid angebaut. Ist kein dATP vorhanden, sondern nur dTTP, so fügt die Polymerase stattdessen ein Thymidin-Nukleotid an.

In einen fertigen T-Vektor kann direkt das gereinigte PCR-Produkt per T/A-Klonierung ligiert werden. Eine andere Möglichkeit ist das Anfügen von 3'-A-Überhängen an gereinigte „blunt end“-DNA mit anschließender Ligation in den T-Vektor.

### F 2.11.1 Reinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte (50 µL Ansätze) wurden direkt mit dem „QIAquick PCR purification kit“ der Firma Qiagen gereinigt, oder mit dem „QIAquick gel extraction kit“ (Qiagen) aus einem präparativen Agarosegel aufgereinigt. Die gereinigten PCR-Produkte sollten wegen der relativen Instabilität des A-Überhanges möglichst schnell weiterverarbeitet und auf keinen Fall eingefroren werden.

### F 2.11.2 Herstellung des T-Überhang-Vektors

Der gebrauchsfertige T-Vektor pGEM®-T Easy kann ohne weitere Bearbeitung in der Ligation eingesetzt werden. Da dieser Vektor allerdings sehr teuer ist, wurde fast ausschließlich ein selbstgebauter T-Vektor verwendet. Folgendes Protokoll wurde in unserer Arbeitsgruppe unter Verwendung der Literatur<sup>[314]</sup> selbst erstellt:

Zunächst wurde der Vektor pBluescript II SK(+) in einem 1,5 mL-Mikrozentrifugenröhrchen mit *EcoRV* verdaut. Dazu wurden 10 µL des Standard-Minipreps in einem 50 µL Ansatz verwendet. Nach dem Verdau wurde der Ansatz zur Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym für 20 min bei 80 °C inkubiert. Durch Zugabe von 0,5 µL *Taq*-Polymerase und 10 µL dTTP (10 mM) und 2 Stunden Inkubation bei 70 °C wurden die 3'-endständigen dTTPs angefügt. Der T-Vektor wurde nun analog zum Miniprep extrahiert und gefällt. Dazu wurden 100 µL CHCl<sub>3</sub> hinzugefügt, gevortext und danach für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig (ohne die Zwischenphase zu berühren) in ein neues 1,5 µL-Mikrozentrifugenröhrchen überführt, in dem sich

70  $\mu\text{L}$  Isopropanol befanden. Nach Vortexen wurde bei 4 °C und 13.000 rpm für 20 min zentrifugiert und der Überstand restlos entfernt. Gewaschen wurde durch Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  eiskaltem 70%-igem Ethanol und kurzem Zentrifugieren. Zum Schluss wurde der Ethanol restlos abpipettiert, in der SpeedVac abgedampft und das getrocknete T-Vektor-Pellet in 10  $\mu\text{L}$  Milli-Q<sup>®</sup>-Wasser aufgenommen. Der selbstgebaute T-Vektor wurde bei -20 °C gelagert.

### F 2.11.3 Ligation

Direkt im Anschluss an die Reinigung der PCR-Produkte (Inserts) wurde die T/A-Ligation durchgeführt. Es kamen zwei verschiedene Varianten vor:

**pGEM<sup>®</sup>-T Easy T/A-Klonierung.** Im (seltenen) Falle der Verwendung des „pGEM<sup>®</sup>-T Easy T/A-cloning“-Kits der Firma Promega wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Prinzipiell wurde die Ligation wie folgt durchgeführt:

5,5 $\mu\text{L}$ Milli-Q <sup>®</sup> -Wasser
1 $\mu\text{L}$ pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vektor (50 ng/ $\mu\text{L}$ )
2 $\mu\text{L}$ PCR Produkt (gereinigt)
5 min bei 65 °C, danach auf Eis und Zugabe von:

1 $\mu\text{L}$ T4 ligase Puffer
0,5 $\mu\text{L}$ T4-Ligase (NEB)
ü/N bei 4 °C

**T-Vektor pBluescript II SK(+).** Die T/A-Ligation mit dem selbstgebauten T-Vektor aus pBluescript II SK(+) wurde wie folgt durchgeführt:

1 $\mu\text{L}$ T-Vektor
7 $\mu\text{L}$ gereinigtes PCR Produkt
5 min bei 65°C, danach auf Eis und Zugabe von:

1 $\mu\text{L}$ T4 ligase Puffer
1 $\mu\text{L}$ T4-Ligase
2 Tage bei 4 °C

Anstelle der 2 Tage bei 4 °C wurde in vielen Fällen auch ü/N bei 4 °C oder ü/N bei 16 °C ligiert. Generell wurden die zwei vorgestellten Protokolle für jedwede Ligation verwendet. Im Falle des Nichtgelingens einer Ligation wurde das molare Verhältnis von Vektor zu Insert, das normalerweise ungefähr 1:3 betragen sollte, verändert.

#### F 2.11.4 Blau-Weiß-Selektion

Um die Zahl der gepickten Klone ohne Insert so gering wie möglich zu halten, wurde das Verfahren der Blau-Weiß-Selektion ("Blue-white screening") angewendet. Hierbei bekommen alle negativen Klone (d.h., die ohne Insert) eine blaue Farbe. Die positiven Klone bleiben weiß, weil das Insert das *lacZα* ORF zerstört, was die Bildung von  $\beta$ -Galactosidase verhindert. Letzteres Enzym katalysiert die Hydrolyse der farblosen X-Gal zu einem blauen Farbstoff. Für die Durchführung der Blau-Weiß-Selektion wurden die LB-Agarplatten vor dem Ausstreichen der Bakterien mit jeweils 40  $\mu$ L X-Gal (40 mg/mL in DMF) und einer 100 mM IPTG-Lösung in sterilem Milli-Q<sup>®</sup>-Wasser imprägniert. Nach Inkubation ü/N erscheinen die negativen Klone blau. Zur Verstärkung der blauen Farbe wurden die Platten vor dem Picken der Klone für ~1 h bei 4 °C gelagert.

#### F 2.11.5 Verdau und Sequenzierung

Nach der Selektion der Klone auf Insert, wurden Minipreps angefertigt und zur Kontrolle auf das korrekte Insert mit Restriktionsenzymen verdaut (*EcoRI/HindIII* Doppelverdau im Falle von pBluescript II SK(+), bzw. *EcoRI* im Falle von pGEM<sup>®</sup>-T Easy). Die positiven Konstrukte wurden von der Fa. GATC Biotech in Konstanz mit dem Standard-Primer T7 sequenziert. Falls erforderlich, wurde zusätzlich mit den 3'-Primern T3 (im Falle von pBluescript II SK(+)) oder SP6 (im Falle von pGEM<sup>®</sup>-T Easy) sequenziert.

#### F 2.12 $\lambda$ -Red-Klonierung

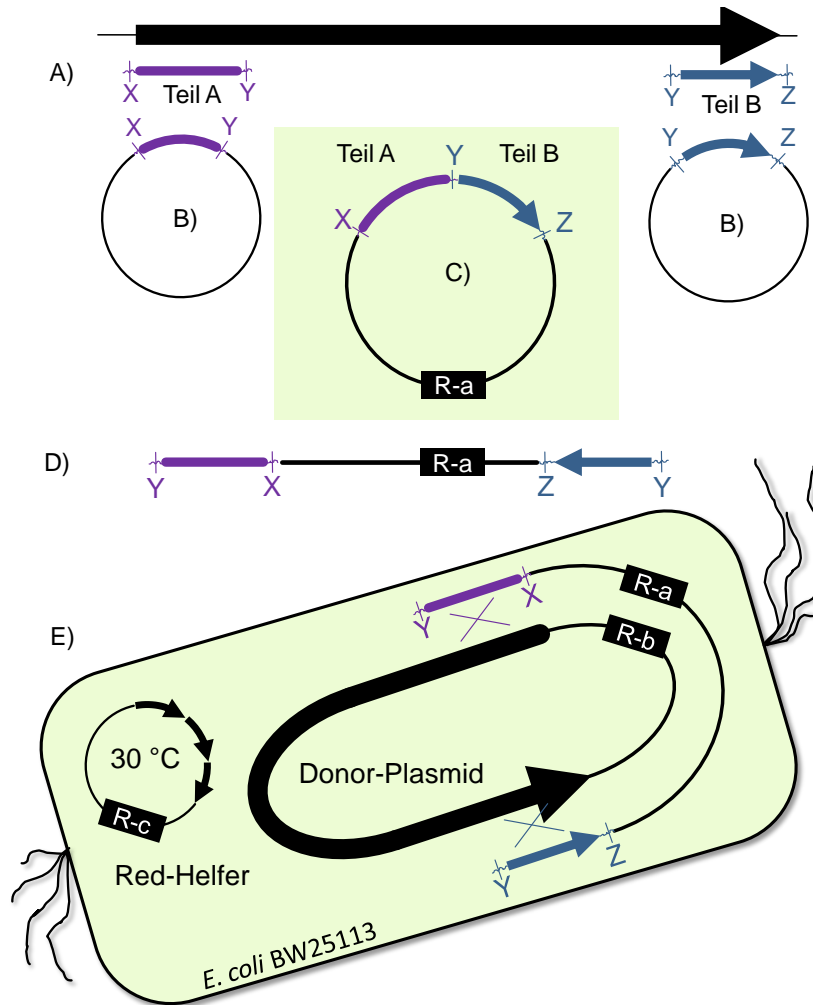
Die  $\lambda$ -Red-vermittelte Rekombination (oder "Red<sup>®</sup>/ET<sup>®</sup> Rekombination") von homologen Sequenzabschnitten ist ein relativ junges Verfahren der Klonierung. Breiteste Anwendung findet die Methode beim sogenannten „Knock-out“ von Genen. Es kann ein ganzes Gen oder Teile davon unter Einhaltung des Leserasters durch einen Selektionsmarker (meist Resistenzkassette) ersetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Technik aber anders eingesetzt, nämlich zum Klonieren eines ganzen Gens oder Genclusters in einen anderen Vektor. Diese Methode gibt die Möglichkeit, auch Gene, die länger sind als PCR Produkte (z. B. länger als 3-5 kb) zielgenau in einen Expressionsvektor zu bringen.

Die ersten Publikationen stammen von der Gruppe um A. F. Stewart (EMBL Heidelberg) Ende der 1990er Jahre.<sup>[315]</sup> Die Methode wurde vor allem von B. L. Wanner,<sup>[304]</sup> B. Gust<sup>[306]</sup> und N. Osterrieder<sup>[316]</sup> weiterentwickelt. Der Name  $\lambda$ -Red

rührt von den Genen *red $\alpha$*  und *red $\beta$*  her, die vom  $\lambda$ -Phagen stammen. Ein Genpärchen mit der gleichen Funktion aus dem  $\lambda$ -Prophagen heißt *RecE* und *RecT* und ist ursächlich für die Bezeichnung ET. *Red $\alpha$*  und *RecE* sind 5'→3'-Exonucleasen und *Red $\beta$*  und *RecT* sind DNA-Annealing Proteine. Sie befinden sich auf einem gesonderten (sogen. „Red Helfer“) Plasmid, welches zusammen mit den beiden zu rekombinierenden DNA-Abschnitten in eine Zelle gebracht wird. Das Red Helfer Plasmid (z. B. pIJ790 oder pKD46) enthält als drittes *red*-Gen noch *red $\gamma$* , welches die RecBCD Exonuklease inhibiert und so den Abbau der eingefügten linearen DNA verhindert. Es werden jeweils 2 Regionen mit mindestens 40-50 bp langen identischen Sequenzen benötigt (Teile A und B in **Abb. 65 A**). Durch das  $\lambda$ -Red-vermittelte Doppelcrossover wird dann der dazwischen liegende Abschnitt mit dem Selektionsmarker eingefügt. Da die homologen Sequenzen frei gewählt werden können, lässt sich jede Position auf der Ziel-DNA beliebig verändern. Die Längenverhältnisse zwischen zu ersetzender Sequenz und ersetzender Sequenz sind ebenfalls frei wählbar. Es können durchaus 2 bp durch 5.000 bp ersetzt werden, oder 20 kb durch 2.000 bp.

Für die Klonierung von Genclustern wurde die Methode folgendermaßen adaptiert: es wurden zwei Regionen von ungefähr 500-600 bp Länge mittels PCR amplifiziert (Teile A und B in **Abb. 65**), wobei der Teil A den Anfang und Teil B das Ende des zu klonierenden Gens/Genclusters enthält. In die PCR Primer wurden geeignete Schnittstellen (X, Y, Z in **Abb. 65**) eingefügt, die für die spätere Ligation in den Expressionsvektor benötigt wurden. Bei der Schnittstelle X für den Teil A musste auf die Einhaltung des Leserasters geachtet und gegebenenfalls das Start-Codon entfernt werden.

Die Ligation der Teile A und B erfolgte praktischerweise in einem Arbeitsgang in Form einer Drei-Punkt-Ligation. Der dann mit dem Enzym Y linearisierte Expressionsvektor enthielt dann also an seinen Enden die zum Gencluster homologen Teile A, bzw. B und in der Mitte den Vektorabschnitt mit dem Resistenzgen (**Abb. 65 D**). Diese lineare DNA wurde in elektrokompetente Zellen von *E. coli* BW25113 elektroporiert, in die zuvor schon das Donor-Plasmid elektroporiert wurde und die zusätzlich das Red-Helfer-Plasmid trugen. Bei der Herstellung der elektrokompetenten Zellen wurden die *red* Gene auf dem Red-Helfer Plasmid mittels 5-10 mM L-Arabinose induziert.



**Abb. 65:** Prinzip des  $\lambda$ -Red-Klonierens. **A)** PCR-Produkte (300-600 bp) vom Anfang und vom Ende des Clusters, bzw. langen ORFs; in die Primern sind einmalige Restriktionsschnittstellen (X, Y, Z) integriert. **B)** Subklonierung der Teile A und B mittels T/A-Klonierung. **C)** Teile A und B werden subklonierten Vektor mit den Restriktionsenzymen X, Y, bzw. Y, Z ausgeschnitten und via 3-Punkt-Ligation in die X, Z-Stellen des Expressionsvektors ligiert. **D)** Der Expressionsvektor mit den Teilen A und B wird mit dem Enzym Y linearisiert und dephosphoryliert. **E)** Das lineare Fragment aus D) wird in elektrokompente *E. coli* BW25113-Zellen transformiert, die bereits vorher mit dem Red-Helfer-Plasmid, sowie dem Donor-Plasmid (mit dem vollständigen Gen, bzw. Gencluster) transformiert wurden.

Meist kam das Red-Helfer-Plasmid pIJ790 zum Einsatz, welches eine Resistenz gegen Chloramphenicol verleiht. Als Alternative konnte pKD46 verwendet werden (Ampicillin-Resistenz). Das Red-Helfer-Plasmid besitzt einen thermosensitiven *ori*, der bei Temperaturen von über 30 °C nicht mehr funktioniert. Dadurch kann das Plasmid, nach Expression der *red*-Gene, durch Inkubation bei 37 °C leicht wieder aus dem Bakterium entfernt werden.<sup>[306]</sup> Bei der abschließenden  $\lambda$ -Red vermittelten homologen Rekombination wurde formal der Vektorabschnitt mit dem Resistenzgen (R-a) gegen den ursprünglichen (Donor-) Vektor mit anderem Resistenzgen (R-b) ersetzt (**Abb. 65 E**).

## F 2.13 Klonierungen – Spezieller Teil

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Klonierungsschritte beschrieben, die zu den Expressionsvektoren für die heterologe Expression der *sup*-Gene geführt haben. Die genetische Grundlage war das Cosmid pSW1H8 aus der metagenomischen Bibliothek von *T. swinhoei*.

Generell wurden Gene, die kürzer als 2.500 bp waren mittels Proofreading-Polymerase in der PCR vervielfältigt. Die spezifischen Oligonukleotide wurden am 5'-Ende mit einer nichtbindenden Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym versehen, um die Gensequenz später passgenau (im Leseraster) in den Expressionsvektor einfügen zu können. Im Idealfall wurden für den Anfang und das Ende verschiedene Restriktionsschnittstellen gewählt, die im Insert nicht und im Vektor nur 1 mal in der MCS in der gewünschten Reihenfolge vorkamen. Damit war ein richtungsorientiertes Klonieren möglich. Es genügte aber auch nur eine Schnittstelle, wobei allerdings die Konstrukte mit falsch herum orientierten Inserten verworfen werden mussten. Beim Primerdesign musste außerdem noch beachtet werden, dass die nichtbindenden Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym nicht am äußersten Ende waren, sondern sich mindestens 3 Nukleotide (z. B. AAA) zwischen ihnen und dem Ende befanden. Im Falle von Plasmiden für die *in vitro* Proteinexpression begann die bindende 5'-Primersequenz hinter dem Start-Codon des Gens. Im 3'-Primer wurde ein Stop-Codon zwischen bindender Sequenz und Restriktionsschnittstelle eingefügt, wenn kein natürliches Stop-Codon vorhanden war.

Für die Klonierung von Genen, bzw. Genclustern, die länger als 2.500 bp sind, wurden andere Methoden (z. B.  $\lambda$ -Red-Klonierung) angewandt. Dies trifft sowohl auf den kompletten *sup*-Gencluster zu, sowie auf die Klonierung von *supA*.

### F 2.13.1 Klonierungen für *in vivo* Expression des *sup*-Genclusters

#### Klonierung der Plasmide für *in vivo* Expression in *E. coli*

Die komplette Insertsequenz von pSW1H8 ist ~39 kb lang und enthält den *sup*-Cluster (~15 kb) ungefähr mittig (siehe Anhang Abb. 5).

Günstigerweise befinden sich stromauf- und stromabwärts des Clusters einmalige *Hind*III-Schnittstellen, mit denen sich der Cluster aus dem Bibliotheks-Cosmid

vollständig herausklonieren ließ (siehe Abb. 27). Es entstand durch Schnitt und Ligation mit *Hind*III in den Vektor pBluescript II SK(+) das Konstrukt pTH27. Dieses Plasmid ist ~20 kb kleiner als pSW1H8 und damit leichter zu handhaben. Außerdem hat es nur ein Resistenzgen (*bla*), das eine Ampicillinresistenz vermittelt, wohingegen pSW1H8 zwei Resistenzen hat (Amp<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>) (Plasmidkarte in Anhang Abb. 7).

Außer pSW1H8 und pTH27 wurden auch sämtliche Shuttle-Vektoren, die für die Expression in *P. putida*, *S. albus* und *C. glutamicum* konstruiert wurden auch in *E. coli* auf Expression von Fettsäuren getestet.

### **Klonierung des Plasmides für *in vivo* Expression in *P. putida***

Der *sup*-Cluster wurde mittels  $\lambda$ -Red-Rekombination (F 2.12) in den Vektor pJB861<sup>[222]</sup> kloniert, was das Plasmid pTH84 ergab (Plasmidkarte in Anhang Abb. 8). Die genauen Schritte waren wie folgt: ein Abschnitt vom Start des ABC-Transporters (stromaufwärts von *supB*) wurde mittels PCR aus pSW1H8 amplifiziert (Primer „A left supcluster pJB861 f“ und „A left supcluster pJB861 r“), in pBluescript II SK(+) via T/A-Klonierung subkloniert und mit *Afl*III und *EcoRV* ausgeschnitten, was Teil A ergab. Ein zweiter Abschnitt nach dem *supE* ORF wurde ebenfalls mittels PCR amplifiziert (Primer „End supE *Not*I f“ und „end supE *Ssp*I r“), in pBluescript II SK(+) via T/A-Klonierung subkloniert und mit *EcoRV* und *EcoRI* ausgeschnitten, was Teil B ergab. Beide Teile wurden mittels Drei-Punkt-Ligation in die *Afl*III und *EcoRI* Schnittstellen von pJB861 kloniert, das erhaltene Plasmid (pTH58) mit *EcoRV* linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Bei der  $\lambda$ -Red-vermittelten Rekombination wurde der Vektor-Teil von pTH27 gegen den Vektor-Teil von pJB861 ausgetauscht.

### **Klonierung der Plasmide für *in vivo* Expression in *S. albus***

Das Plasmid pTH35 (*S. albus* TH1 nach Konjugation) entstand durch Ausschneiden des *Hind*III Fragments aus pTH27, Auffüllen der „sticky“-Enden mit Klenow Enzym und „blunt-end“-Ligation in die *EcoRV* Schnittstelle von pKJ55.<sup>[224]</sup>

Der *sup*-Cluster wurde mittels Lambda-Red-Rekombination (F 2.12) in den Vektor pKJ55<sup>[224]</sup> kloniert, was das Plasmid pTH60 (*S. albus* TH2 nach Konjugation) ergab (Plasmidkarte in Anhang Abb. 9 ). Die genauen Schritte



waren wie folgt: ein Abschnitt vom Start des ABC-Transporters (stromaufwärts von *supB*) wurde mittels PCR aus pSW1H8 amplifiziert (Primer „ABC trans XbaI f new“ und „ABC trans NotI r“), in pBluescript II SK(+) via T/A-Klonierung subkloniert und mit *XbaI* und *NotI* ausgeschnitten, was Teil A ergab. Ein zweiter Abschnitt nach dem *supE* Gen wurde ebenfalls mittels PCR amplifiziert (Primer „End supE NotI f“ und „end supE SspI r“), in pBluescript II SK(+) via T/A-Klonierung subkloniert und mit *NotI* und *EcoRI* ausgeschnitten, was Teil B ergab. Beide Teile wurden mittels Drei-Punkt-Ligation in die *XbaI* und *EcoRI* Schnittstellen von pKJ55 kloniert, das erhaltene Plasmid (pTH57) mit *NotI* linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Bei der  $\lambda$ -Red-vermittelten Rekombination wurde der Vektor-Teil von pSW1H8 gegen den Vektor-Teil von pKJ55 ausgetauscht.

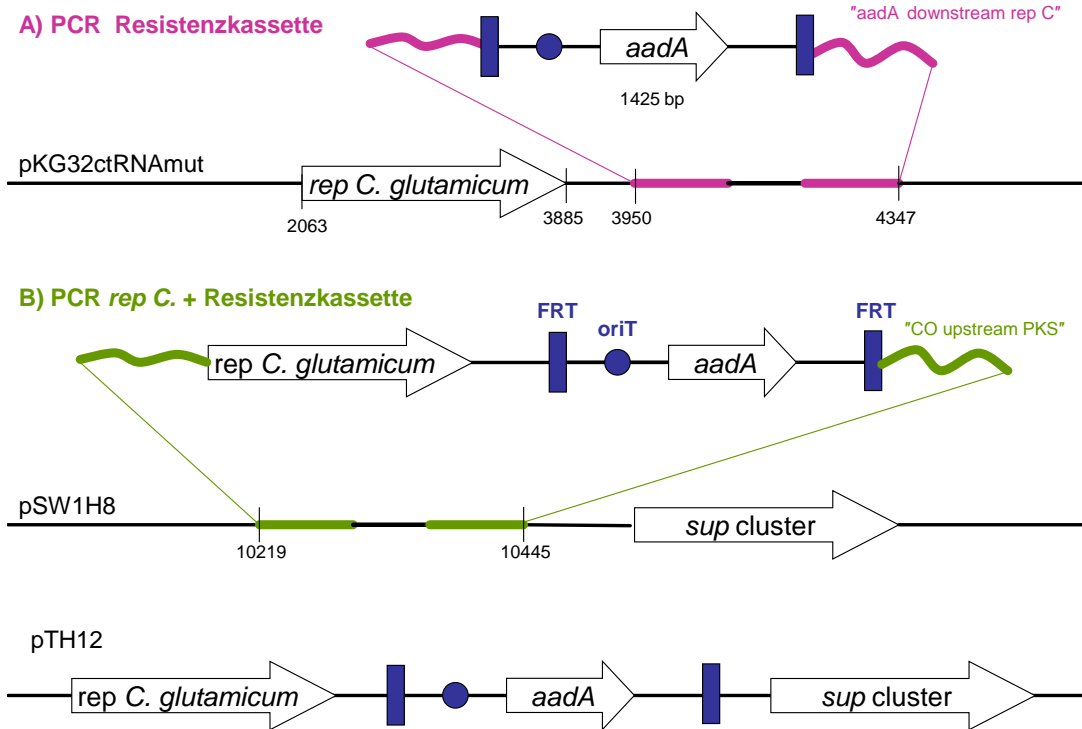
### **Klonierung der Plasmide für *in vivo* Expression in *C. glutamicum***

Das Plasmid pTH26 entstand durch Ausschneiden des *HindIII* Fragments aus pTH27, Auffüllen der "sticky"- Enden mit Klenow Enzym und "blunt-end"-Ligation in die (ebenfalls aufgefüllte) *BamHI* Schnittstelle von pJC1.<sup>[317]</sup> Dieser Vektor war eigentlich für die Expression in *C. glutamicum* geplant, wurde aber dann nicht dafür verwendet, sondern nur in *E. coli* getestet.

Der *sup*-cluster wurde mittels  $\lambda$ -Red-Rekombination (siehe F 2.12) in den Vektor pMSX<sup>[318]</sup> kloniert, was das Plasmid pTH36 ergab (Plasmidkarte in Anhang Abb. 10). Die genauen Schritte waren wie folgt: ein Abschnitt vom Start des ABC-Transporters (stromaufwärts von *supB*) wurde mittels „Proofreading“-PCR aus pSW1H8 amplifiziert (Primer „ABC trans NdeI f“ und „ABC trans NcoI r“), in pBluescript II SK(+) via T/A-Klonierung subkloniert und mit *NdeI* und *NcoI* ausgeschnitten, was Teil A ergab. Ein zweiter Abschnitt nach dem *supE* Gen wurde ebenfalls mittels PCR amplifiziert (Primer „end supE nat *XhoI* f“ und „end supE *XhoI* r“), in pBluescript II SK(+) via T/A-Klonierung subkloniert und mit *XhoI* ausgeschnitten, was Teil B ergab. Beide Teile wurden nacheinander in die entsprechenden Schnittstellen von pMSX kloniert, das erhaltene Plasmid mit *BamHI* linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Bei der  $\lambda$ -Red-vermittelten Rekombination wurde der Vektor-Teil von pTH27 gegen den Vektor-Teil von pMSX ausgetauscht.

### Einfügung von *rep C.* in pSW1H8 für *in vivo* Expression in *C. glutamicum*

Das Replikon *rep C.* vermittelt die Replikation und Kopienanzahl eines Plasmids in coryneformen Bakterien.<sup>[227]</sup> Um das Bibliothekscosmid direkt in *C. glutamicum* exprimieren zu können, wurde *rep C.* stromaufwärts des *sup*-Clusters in pSW1H8 hineinkloniert (**Abb. 66**).



**Abb. 66:** Schema der Integration des Replikons für *C. glutamicum* (*rep C.*) in pSW1H8.

Zuerst wurde stromabwärts von *rep C.* eine Resistenzkassette für Streptomycin (*aadA*-Kassette) in den Vektor pKG32ctRNAmut<sup>[227]</sup> eingefügt (**Abb. 66 A**). Unter Anwendung der  $\lambda$ -Red vermittelten homologen Rekombination wurde wie folgt vorgegangen: mit den Primern „up *aadA* downstream *rep C.*“ und „low *aadA* downstream *rep C.*“ wurde via „Proofreading“-PCR aus pIJ778 die Resistenzkassette *aadA* amplifiziert. Vor der PCR wurde pIJ778 mit *Hind*III und *Eco*RI verdaut und die Bande aus dem Gel aufgereinigt. Das lineare PCR-Produkt wurde in *E. coli* BW25113 elektroporiert, in die vorher sowohl das Red-Helfer-Plasmid pIJ790, als auch das Empfängerplasmid pKG32ctRNAmut elektroporiert worden waren. Die homologe Rekombination fand zwischen den jeweils 39 nichtbindenden Primer-Nukleotiden und den homologen Zielabschnitten auf dem

Plasmid statt. Es entstand pKG32ctRNAmut-rep C., das den Wirtsbakterien Resistenzen gegen Kanamycin und Streptomycin verlieh.

Im zweiten Schritt wurde, ähnlich zum ersten Schritt, das *rep C.* (und die *aadA*-Kassette) aus pKG32ctRNAmut-rep C. in pSW1H8 kloniert (**Abb. 66 B**). Im Detail geschah dies folgendermaßen: der Bereich des *rep C.* mit anschließender *aadA*-Kassette wurde mittels PCR aus pKG32ctRNAmut-rep C. amplifiziert (Primer „up CO upstream PKS“ und „low CO upstream PKS“). Das lineare PCR-Produkt wurde in *E. coli* BW25113 Zellen elektroporiert, in die vorher sowohl das Red-Helfer-Plasmid pIJ790, als auch das Empfängerplasmid pSW1H8 elektroporiert worden waren. Die homologe Rekombination fand zwischen den jeweils 39 nichtbindenden Primer-Nukleotiden und den homologen Zielabschnitten auf pSW1H8 statt (**Abb. 66 B**). Es entstand pTH12, das seinen Wirtsbakterien Resistenzen gegen Ampicillin, Kanamycin und Streptomycin verlieh. Nach Retransformation in *E. coli* XL-1 Blue MRF' wurde die Identität von pTH12 via PCR mit drei verschiedenen Primer-Paaren (up *rep C./aadA*, up /low *rep C.* und PKS f/r) und mittels Restriktionsmuster (*NsiI* und *EcoRI*) einwandfrei nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 11 ).

### F 2.13.2 Klonierung der SupA-PKS

Für die *In-vitro*-Studien wurden das *supA*-Gen, sowie Teile des *supA* ORFs, die für abgrenzbare enzymatische Funktionen (=Domänen) kodieren, in den Expressionsvektor pHIS8 kloniert, der sich durch einen starken Promotor (*T7lac*), sowie einen His8-Tag auszeichnet. Wurde eine Koexpression mit der PPTase Svp angestrebt, wurde der Vektor pHIS8-Svp verwendet, der zusätzlich das *svp*-Gen enthält (Anhang Abb. 2). Im Falle der Expression durch *S. albus*, wurde der, ins Genom integrierende, Vektor pKJ55 gewählt mit dem konstitutiven Promotor *PermE\** gewählt (Anhang Abb. 1).

#### Klonierung der SupA-PKS für *E. coli*

Die **Abb. 67** zeigt schematisch die Klonierung von SupA (Plasmid pTH23). Der Anfangsteil (Teil i in **Abb. 67**) des *SupA* ORFs wurde unter Weglassung des Start-Codons mittels PCR amplifiziert (Primer: „supA left *EcoRI* histag f“ und „Low PKS left new“) und in pGEM®-T Easy subkloniert (pTH20). Auch ein Teil des Endes von *supA* (Teil iii) wurde mittels PCR amplifiziert (Primer: „up PKS

right f<sup>c</sup> und „Low PKS right *EcoRI*“) und in pGEM®-T Easy subkloniert (pTH3). Der verbleibende große mittlere Teil (Teil ii) von *supA* wurde mit *NsiI* und *BglII* aus pSW1H8 ausgeschnitten. Die Teile ii und iii wurden via 3-Punkt-Ligation in pGEM®-T Easy wie folgt ligiert:

#### *3-Punkt-Ligation (für pTH5, Abb. 67 C)*

0,5 µL 1:5 verdünnter T-Vektor (Miniprep von pGEM®-T Easy, geschnitten mit *NsiI* und *BglII*, 3 kb) plus 1 µL *supA* iii (pTH3 geschnitten mit *BglII* und *EcoRI*, 400 bp), plus 15 µL *supA* ii (pSW1H8 geschnitten mit *NsiI* und *BglII*, 9,3 kb). Es wurde zunächst 5 min bei 65°C inkubiert, dann auf RT abgekühlt und 2 µL T4-Ligase Puffer und 1 µL T4-Ligase hinzugefügt. Die Ligation erfolgte bei 14 °C (3 h).

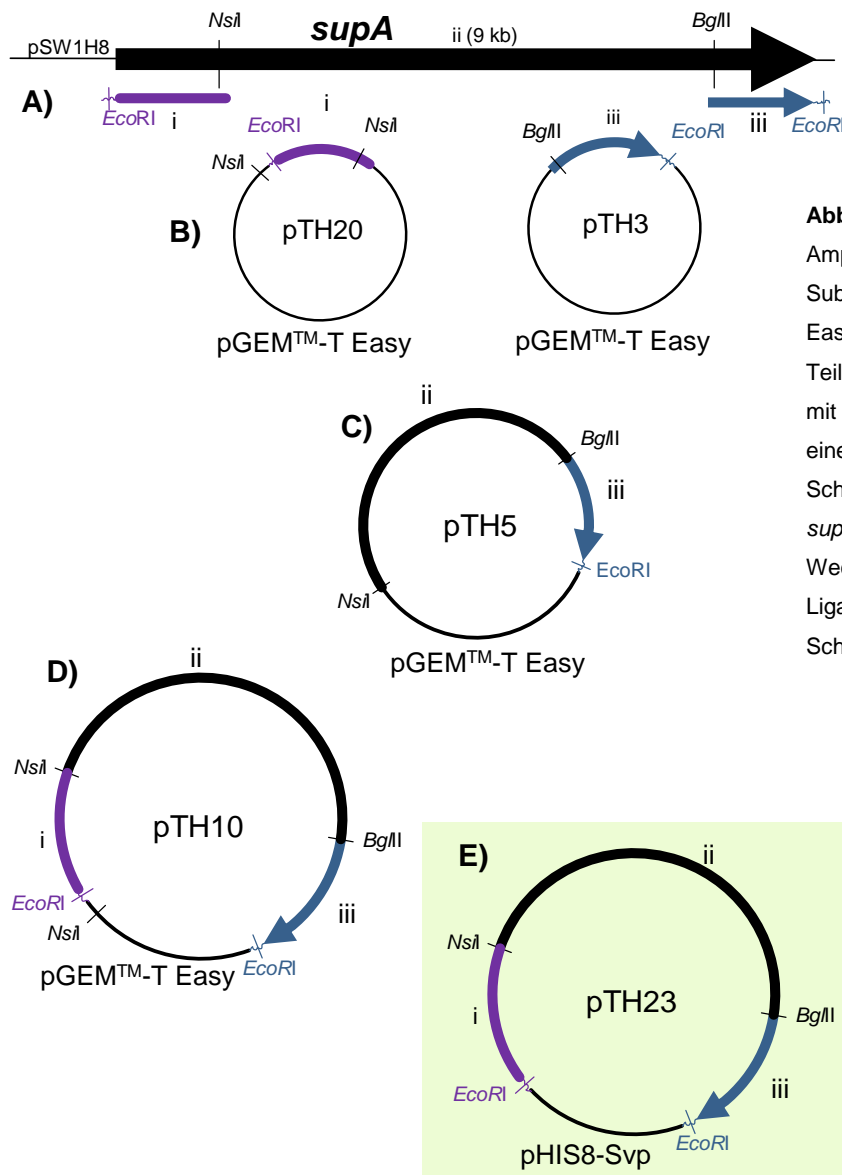
Das resultierende Plasmid pTH5 wurde mit *NsiI* linearisiert und dephosphoryliert und mit dem, mit *NsiI* herausgeschnittenen, Insert (Teil i) ligiert. War das Insert in richtiger Orientierung, resultierte das Plasmid pTH10 (Abb. 67 D). Das *supA* Fragment wurde nun mit *EcoRI* aus pTH10 herausgeschnitten und in die *EcoRI* Stelle von pHis8-Svp kloniert. Bei richtiger Orientierung des Inserts entstand so das Plasmid pTH23:

#### *Ligation für pTH23*

1 µL Vektor (pHis8-Svp geschnitten mit *EcoRI* ((25 µL mp, 2,5 µL *EcoRI* im 50 µL Verdau), inaktiviert, dephosphoryliert, gefällt, gelöst in 30 µL Milli-Q®-Wasser) plus 7,5 µL Insert *supA* (2,5 µL pTH10, 0,25 µL *EcoRI* im 10 µL Verdau), inaktiviert. Die Inkubation erfolgte ü/N bei 4 °C.

Um eine Variante von pTH23 ohne das PPTase Gen (*svp*) zu bekommen, wurde pTH23 mit *SfiI* geschnitten, die ~16 kb Bande (die den Vektor-Teil beinhaltet) aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und religiert. Resultat war das Plasmid pTH23<sub>apo</sub>.

Zusätzlich wurde für vergleichende Zwecke ein Expressionsvektor erzeugt, der einen C-terminal verkürztes *supA*-ORF enthält. Hierzu wurde pTH23 mit *NotI* geschnitten, das ~12,5 kb Fragment (das den Vektor-Teil beinhaltet) aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und religiert. Resultat war das Plasmid pTH63. Sein Produkt sollte eine, mit einem His8-Tag versehene, gekürzte PKS mit der Domänenabfolge KS-AT-DH-MT-ER-KR sein.



**Abb. 67:** Klonierung von pTH23. **A)** PCR-Amplifizierung der Teile i and iii. **B)** Subklonierung der Teile i und iii in pGEM™-T Easy T/A-Vektor. **C)** 3-Punkt-Ligation der Teile ii und iii in pGEM™-T Easy (geschnitten mit *NsiI* und *EcoRI*), ergab pTH5. **D)** Ligation eines *NsiI*-Fragments mit Teil i in die *NsiI*-Schnittstelle von pTH5, ergab das komplette *supA*-Gen in pGEM™-T Easy, pTH10. **E)** Wechsel des Vektors zu pHIS8-Svp durch Ligation eines *EcoRI*-Fragments in die *EcoRI*-Schnittstelle von pTH10-Svp.

### Klonierung der SupA für *S. albus*

Der Anfangsteil von *supA* wurde, unter Weglassung des ATG-Codons und mit Einfügung eines N-terminalen His6-Tags, mittels PCR aus pSW1H8 amplifiziert (Primer „supA left *XbaI* His f“ und „supA left *NotI* r“), in pBluescript II SK(+) via T/A-Klonierung subkloniert und mit *XbaI* und *NotI* ausgeschnitten, was Teil A ergab. Der Endabschnitt des *supA* ORFs wurde ebenfalls mittels PCR amplifiziert (Primer „up PKS right f“ und „supA right *SspI* r“), in pBluescript II SK(+) via T/A-Klonierung subkloniert und mit *NotI* und *SspI* ausgeschnitten, was Teil B ergab. Beide Teile wurden mittels Drei-Punkt-Ligation in die *XbaI* und *EcoRV* Schnittstellen von pKJ55 kloniert, das erhaltene Plasmid (pTH53) mit *NotI* linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Bei der  $\lambda$ -Red-vermittelten

Rekombination wurde der Vektor-Teil von pTH53 gegen den Vektor-Teil von pKJ55 ausgetauscht. Das resultierende Plasmid pTH61 ergab nach erfolgreicher Konjugation in *S. albus* den Stamm *S. albus* TH3.

#### **Klonierung der SupA<sub>KS1</sub>**

Die Sequenz für die KS1 Domäne (inklusive der Linkerregionen) von SupA wurde mittels PCR aus pSW1H8 amplifiziert (Primer: „supA KS1 *SacI* f new“ und „supA KS1 *HindIII* r“) und mittels T/A-Klonierung in pBluescript II SK(+) subkloniert, was das Plasmid pTH120 ergab. Das Insert wurde mit *SacI* und *HindIII* ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen von pHIS8 kloniert, um das Plasmid pTH127 zu erhalten.

#### **Klonierung der SupA<sub>AT1</sub>**

Die Sequenz für die AT1 Domäne (inklusive der Linkerregionen) von SupA wurde mittels PCR aus pSW1H8 amplifiziert (Primer: „supA AT1+li *SacI* f“ und „supA AT1+li *HindIII* r“) und mittels T/A-Klonierung in pBluescript II SK(+) subkloniert, was das Plasmid pTH68 ergab. Das Insert wurde mit *SacI* und *HindIII* ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen von pHIS8 kloniert, um das Plasmid pTH86 zu erhalten.

#### **Klonierung der SupA<sub>KS-AT1</sub> Didomäne**

Die Sequenz für die KS1-AT1 Didomäne (inklusive der Linkerregionen) von SupA wurde mittels PCR aus pSW1H8 amplifiziert (Primer: „supA KS1 *SacI* f new“ und „supA AT1+li *HindIII* r“) und mittels T/A-Klonierung in pBluescript II SK(+) subkloniert, was pTH117 ergab. Das Insert wurde mit *SacI* und *HindIII* ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen von pHIS8 kloniert, um das Plasmid pTH125 zu erhalten. Ein zweites Plasmid zur Expression der SupA<sub>KS-AT1</sub> Didomäne wurde auf der Basis von pET52b+ (Firma Novagen) wie folgt erstellt: die entsprechende Sequenz wurde mittels PCR aus pSW1H8 amplifiziert (Primer: „KS-AT1 *EagI* f“ und „KS-AT1 *SacI* r“) und mittels T/A-Klonierung in pBluescript II SK(+) subkloniert, was pTH113 ergab. Das Insert wurde aus pTH113 mit *EagI* und *SacI* herausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pET52b+ kloniert, um das Plasmid pTH116 zu erhalten.

### Klonierung der SupA<sub>MT</sub>

Die Sequenz für die SupA<sub>MT</sub> Domäne wurde mittels PCR aus pSW1H8 amplifiziert (Primer: „supA MT long *SacI* f“ und „supA MT long *HindIII* r“) und mittels T/A-Klonierung in pBluescript II SK(+) subkloniert, was pTH122 ergab. Das Insert wurde mit *SacI* und *HindIII* ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen von pHIS8 für das Plasmid pTH129 kloniert.

### Klonierung der SupA<sub>ACP</sub>

Die Sequenz für die SupA-ACP Domäne wurde mittels PCR aus pSW1H8 amplifiziert (Primer: „supA ACP *SacI* f“ und „supA ACP *HindIII* r“) und mittels T/A Cloning in pBluescript II SK(+) subkloniert, was das Plasmid pTH71 ergab. Das Insert wurde mit *SacI* und *HindIII* ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen von pHIS8-Svp für das Plasmid pTH97*holo* kloniert. Das Plasmid für die Expression der *apo*-Form der SupA-ACP (= pHN80) erfolgte durch Ausschneiden des *svp*-Gens aus pTH97*holo* mit *NotI* und anschließender Religation des Vektor-Teils.

### F 2.13.3 Klonierung des SupB ACP

Das *supB* ORF wurde unter Weglassung des Start-Codons mittels PCR aus pSW1H8 amplifiziert (Primer: „supB ACP f“ und „supB ACP r“) und mittels T/A-Klonierung in pBluescript II SK(+) subkloniert. Das Insert wurde mit *SacI* und *HindIII* ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen von pHIS8-Svp für pTH89*holo*, bzw. pHIS8 für pTH89*apo* ligiert.

### F 2.13.4 Klonierung der SupC PPTase

Das *supB* ORF wurde unter Weglassung des Start-Codons mittels PCR aus pSW1H8 amplifiziert (Primer: „supC PPt f“ und „supC PPt r“) und mittels T/A-Klonierung in pBluescript II SK(+) subkloniert. Das Insert wurde mit *SacI* und *HindIII* ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen von pHIS8 kloniert, um das Plasmid pTH90 zu erhalten.

### F 2.13.5 Klonierung der TesA Thioesterase (Typ I)

Die Klonierung der TE I TesA aus *E. coli* K12 JM109 erfolgte entsprechend der Literatur.<sup>[220]</sup> Das PCR Produkt von ~550 bp Länge (Primer „*tesA/apeA* f“ und „*tesA/apeA* r“) wurde in pBluescript II SK(+) subkloniert (pTH79), mit *NdeI* und

*Xho*I wieder ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen von pET15b ligiert, um das Plasmid pTH91 zu erhalten.

### F 2.13.6 Tabelle der in dieser Arbeit erstellten Expressionsplasmide

In **Tab. 29** auf der folgenden Seite sind sämtliche, in der vorliegenden Arbeit erstellte, Expressionsplasmide aufgelistet.

**Tab. 29: In dieser Arbeit erstellte Expressionsplasmide**

Plasmid	basierend auf	Resistenz	Insert	Kommentar
<b>sup-cluster</b>				
pTH12	pSW1H8	Amp <sup>100</sup> , Kan <sup>50</sup> , Str <sup>50</sup>	Cosmid der Klon-Bibliothek	Replikon für <i>C. glutamicum</i> eingefügt
pTH26	pJC1 <sup>[317]</sup>	Kan <sup>50</sup>	<i>Hind</i> III-Fragment, "blunt end", <i>Bam</i> HI	nicht induzierbar für <i>Corynebacterium</i>
pTH36	pMSX	Kan <sup>50</sup>	<i>Sup</i> -Cluster	für <i>Corynebacterium</i>
pTH27	pBluescript II SK(+)	Amp <sup>100</sup>	in umgekehrter Orientierung	<i>Hind</i> III-Fragment von pSW1H8
pTH84	pJB861	Kan <sup>50</sup>	<i>sup</i> -cluster	<i>P. putida</i>
pTH35	pKJ55	Apr <sup>50</sup>	<i>Hind</i> III-Fragment, "blunt end", <i>Eco</i> RV	<i>S. albus</i> TH1
pTH60	pKJ55	Apr <sup>50</sup>	<i>sup</i> -Cluster	<i>S. albus</i> TH2
<b>supA</b>				
pTH23	pHIS8-svp	Kan <sup>50</sup>	<i>supA</i>	
pTH23 <sub>apo</sub>	pHIS8	Kan <sup>50</sup>	<i>supA</i>	ohne Svp
pTH61	pKJ55	Apr <sup>50</sup>		His6-Tag, SupA <i>S. albus</i> TH3
pTH63	pTH23	Kan <sup>50</sup>	<i>supA</i> , C-terminal gekürzt	His8-Tag, SupA <sub>KS-AT-DH-MT-ER-KR</sub>
<b>SupA<sub>KS1</sub></b>				
pTH127	pHIS8	Kan <sup>50</sup>	KS1	<i>Sac</i> I und <i>Hind</i> III
<b>SupA<sub>KS-AT1</sub></b>				
pTH125_2	pHIS8	Kan <sup>50</sup>	KS-AT1, mit <i>Sac</i> I und <i>Hind</i> III	
pTH116_1a	pET52b+	Amp <sup>100</sup>	KS-AT1, mit <i>Eag</i> I und <i>Sac</i> I	2,9 kb
<b>SupA<sub>AT</sub></b>				
pTH126_2	pHIS8	Kan <sup>50</sup>	AT2, mit <i>Sac</i> I und <i>Hind</i> III	
pTH86_3	pHIS8	Kan <sup>50</sup>	AT1, mit <i>Sac</i> I und <i>Hind</i> III	1,4 kb
<b>SupA<sub>MT</sub></b>				
pTH129	pHIS8	Kan <sup>50</sup>	mit <i>Sac</i> I und <i>Hind</i> III	
<b>SupA<sub>ACP</sub></b>				
pTH97	pHIS8-svp	Kan <sup>50</sup>	<i>holo</i> -SupA <sub>ACP</sub>	
pHN80	pHIS8	Kan <sup>50</sup>	<i>apo</i> -SupA <sub>ACP</sub>	H. Niederkrüger (AK J. Piel)
<b>ACP SupB</b>				
pTH89 <sub>holo</sub>	pHIS8-svp	Kan <sup>50</sup>	<i>holo</i> -ACP	
pTH89 <sub>apo</sub>	pHIS8	Kan <sup>50</sup>	<i>apo</i> -ACP	
<b>PPTase SupC</b>				
pTH90	pHIS8	Kan <sup>50</sup>		
<b>Sonstige Expressionsplasmide</b>				
pTH91	pET15b	Amp <sup>100</sup>	<i>tesA</i> , mit <i>Nsi</i> I und <i>Xho</i> I	TE I aus <i>E. coli</i> K12 JM109



## F 2.14 Bioassay mit *Bacillus megaterium*

Zu 100 mL flüssigem LB-Agar, der nicht wärmer als ~50 °C sein durfte, wurden 10 mL einer Übernachtskultur von *Bacillus megaterium* gegeben. Damit wurden 5 normale Agarplatten gegossen. Auf den frisch gefestigten Agar wurden mit einer sterilen Pinzette sterile Papierpunkte von ~5 mm Durchmesser gedrückt, die mittels Lochers aus Filterpapier gestanzt worden waren; auf jede Platte einer in der Mitte und sechs in gleichem Abstand darum herum. Auf den Filterpapierpunkt in der Mitte der Platte wurden als Positivkontrolle 4,5 µL Vancomycin (10 µg/mL) pipettiert. Auf die anderen Punkte wurden jeweils 4,5 µL, der Proben, sowie als Negativkontrolle MeOH (das Lösungsmittel der Proben) pipettiert. Nach Inkubation bei 37 °C ü/N konnte das Ergebnis (Hemmhof oder nicht) abgelesen werden.

## F 2.15 Kultivierungsversuch des *Paederus*-Symbionten

Neben der Standard Agarplatte und der Flüssigkultur in Reagenzgläsern, wurde vor allem die Methode der 3D-Kultur in halbflüssigem Medium angewandt. Meist ist ein dominantes Wachstum (Überwachsen) eines unerwünschten Mikroorganismus die Ursache der Nichtkultivierbarkeit von Bakterien. <sup>[206]</sup> Die 3D-Kulturen minimieren diese Gefahr, da sich die Kolonien separat voneinander entwickeln können.

### 3D-Kulturen

Die Kultivierung der Bakterien in 3D-Kulturen wurde in Anlehnung an Hrvatin und Piel durchgeführt. <sup>[203]</sup> Dazu wurden zunächst die Medien in 2-facher Konzentration hergestellt und autoklaviert und dann zu gleichen Teilen mit der autoklavierten, noch flüssigen, 1%-igen SeaPrep®-Agarose-Lösung in destilliertem H<sub>2</sub>O vermischt. Nun wurden entweder 10 mL Medium in lange Reagenzgläser, bzw. 15 mL Falcon-Röhrchen gegeben, oder 1 mL in die Kavitäten einer 6-Well-Mikrotiterplatte, oder 300 µL in die Kavitäten einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Nach dem Inokulieren mit den Bakterien und gewissenhaften Vortexen, wurden die Röhrchen, bzw. die Mikrotiterplatten für ca. 1 h auf Eis gelagert, wobei die Agarose in einen halbflüssigen Zustand übergeht, der selbst während der anschließenden Inkubation (bei z. B. 37 °C) anhält. Die Kulturen können durch Vortexen und leichtes Erwärmen (10 min bei 45 °C)

wieder flüssig gemacht und abzentrifugiert werden. Es ist sogar auch möglich, einzelne Kolonien mit der Pipette zur Subkultivierung zu entnehmen.

### **Bakterien**

Die zu kultivierenden Bakterien („*Paed. Symbiont*“, -80°C Glycerin-Gefrierkultur), wurden unter dem Mikroskop mit Hilfe der Thoma-Kammer gezählt und so angeimpft, das ~ 1000, ~100, bzw. ~10 Bakterien auf 1 mL 3D-Kultur kamen. Für ~ 1000 Bakterien/mL wurden beispielsweise 162 µL der „*Paed. Symbiont*“ Gefrierkultur in 1458 µL Medium verdünnt, und 180 µL Aliquots für eine 10 mL Kultur eingesetzt. Für die Verdünnungsreihen in den Mikrotiterplatten wurden initial die 300 µL fassenden Kavitäten mit 10 µL Glycerin-Gefrierkultur ( $5,5 \times 10^8$  Bakterien/mL) angeimpft und dann 11-mal jeweils 10 µL in das rechts danebenliegende Kavität übertragen. Die 1 mL Medium fassenden Kavitäten der 6-Well-Mikrotiterplatten wurden auch mit 10 µL Gefrierkultur angeimpft.

### **Medien**

Neben dem Standard-LB-Medium, wurden die Zellkulturmedien Schneider Insect Medium, Grace´s Insect Medium, IPL\_41 und M199 verwendet. Als Supplemente wurde auch Fötale Rinderserum (1 mL in 10 mL) und IMP (Inosin-5'-Monophosphat, 7,5 mM Arbeitskonz.) eingesetzt. Es wurden die pH-Werte pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0 getestet.

### **Antibiotika**

Als Antibiotika wurden Polymyxin B sulfat (PMX B) 300 units oder 600 units/mL Kultur, Vancomycin Hydrochlorid 10 µg/mL oder 30 µg/mL, Tellurit ( $K_2TeO_3$ ) 103 µg/L, 1028 µg/mL (Standard) und 10,28 µg/mL eingesetzt.

### **Inkubationen**

Die 3D-Kulturen wurden bei 30 °C im Dunkeln für 1-5 Tage inkubiert, einige Röhrchen wurden 6 Monate bei 30 °C weiter inkubiert, andere lagerten nach Inkubation 7 Monate bei 4 °C. Flüssigkulturen in Reagenzgläsern wurden mit 200 rpm bei 16 °C oder 30 °C geschüttelt. Die Mikrotiterplatten wurden im Dunkeln bei 28 °C inkubiert.

## **F 3 Proteinexpression, Proteinassays, Proteinanalytik**

Im Folgenden werden die Methoden der Proteinexpression, Proteinassays und Proteinanalytik beschrieben.

### **F 3.1 Proteinexpression**

Die verwendeten Methoden der Proteinexpression werden in den nächsten Abschnitten, beginnend mit der Transformation des Expressionsstammes, ihrer zeitlichen Abfolge nach erläutert.

#### **F 3.1.1 Transformation in den Expressionsstamm**

Die Methoden der Transformation sind ausführlich im Abschnitt F 2.9 beschrieben. Hier geht es um die Besonderheiten im Bezug auf die Proteinexpression.

##### ***E. coli* BL21(DE3)**

Für die Proteinexpression in *E. coli* wurde standardmäßig der Stamm *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Es wurde immer eine frische Transformation (F 2.9) des Expressionsplasmids in den Expressionsstamm angefertigt, oder von einer (höchstens 4 Wochen alten) Agarplatte angezogen. Die Verwendung von Gefrierkulturen führte manchmal zu keiner Expression.

In einigen Fällen wurden dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) Chaperon-Plasmide der Firma Takara durch Elektroporation hinzugefügt. Von dem Stamm mit Chaperon wurden nach Standardprotokoll elektrokompente Zellen hergestellt und diese ganz normal behandelt und transformiert.

##### **Elektroporation von *P. putida* KT2440**

Die Transformation von *P. putida* KT2440 erfolgte genauso wie bei *E. coli* durch Elektroporation.

##### **Elektroporation von *C. glutamicum* ATCC13032**

Die Elektroporation von *C. glutamicum* ATCC13032 wurde von K. Krumbach (AG L. Eggeling, FZ Jülich) nach einer in der Literatur beschriebenen Prozedur durchgeführt.<sup>[312]</sup> Der Stamm wurde generell bei 30 °C auf LB-Agarplatten angezogen.

### **Konjugation von *S. albus***

Da für *S. albus* keine Methode der Elektroporation etabliert ist, wurde eine Konjugation nach Flett et al. 1997 durchgeführt.<sup>[313]</sup>

Das zu konjugierende Plasmid wurde zunächst in den Stamm *E. coli* ET12567<sup>[305]</sup> elektroporiert, der das Plasmid pUZ8002 trägt. Der so transformierte Stamm wurde in LB + Glucose + Kan<sup>25</sup> + Cam<sup>25</sup> + Antibiotikum für das zu konjugierende Plasmid auf Agarplatte ü/N kultiviert. Von einer Einzelkolonie dieser Agarplatte wurde eine Übernachtskultur (5 mL LB mit Glucose) mit denselben Antibiotika angefertigt. Davon wurden 100 µL zu 5 mL LB mit Glucose plus Antibiotika bei 37 °C mit 200 rpm solange inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ~0.4-0.6 erreicht war. Von einer Glycerin-Gefrierkultur wurden ~10<sup>8</sup> *S. albus* Sporen (100 µL oder 60 µL) in 500 µL TES (= 0,05 M TES pH 8,0) resuspendiert und einem Hitzeschock (10 min 50 °C) ausgesetzt. Nach Abkühlung wurden 500 µL DSGM dazugegeben und für 1,5 h bei 37 °C mit 200 rpm inkubiert. Die *E. coli* Zellen wurden 3-mal mit LB-Medium gewaschen (jeweils 3 min mit 6.000 rpm) und das Pellet mit den gekeimten Sporen (1 mL) resuspendiert. Die Mischung wurde komplett auf 2CM-Agarplatten aufgetragen und bei 30 °C für mindestens 16 h inkubiert. Dann wurde die Agarplatte mit 1 mL Antibiotika-Lösung überschichtet und weiter bei 30 °C für 3-5 Tage inkubiert. Die Antibiotika-Lösung bestand aus 1 mg/mL Nalidixinsäure und dem Antibiotikum des konjugierten Plasmids (1 mg/mL Apramycin). Die Exkonjuganten erschienen als weiße Einzelkolonien mit stumpfer Oberfläche.

### **F 3.1.2 Kultivierung der Expressionsstämme**

Im Folgenden werden die verwendeten Kultivierungsmethoden im Allgemeinen beschrieben. Die tatsächlich verwendeten Parameter für die Expressionen der einzelnen Proteine sind im Ergebnisteil aufgeführt.

#### **Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)**

Den Auftakt der Kultivierung bildete immer eine Übernachtskultur von der entsprechenden Agarplatte, dem Resultat der Transformation. Hierzu wurden ~5 Kolonien gepickt und damit ~5 mL LB-Medium in langen Reagenzgläsern mit Antibiotikum entsprechend dem Expressionsvektor (meist Kan<sup>50</sup> oder Amp<sup>100</sup>), angeimpft. Wenn ein Chaperon verwendet wurde, wurde zusätzlich, je nach Typ,

Cam<sup>25</sup> oder Tet<sup>12.5</sup> dazugegeben. Die Reagenzgläser wurden in schräger Stellung mit 200 rpm im Schüttelinkubator bei 37 °C für ca. 16 h geschüttelt.

Mit der Übernachtskultur wurden die Hauptkulturen 1:40 angeimpft. Es wurde die entsprechenden Antibiotika für den Vektor und (evtl. das Chaperon) hinzugefügt. Die Kulturen wurden dann im Erlenmeyerkolben (mit Schikane) bei 37 °C mit 200 rpm für 3 h inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> etwa 0,5 erreicht hatte. Danach wurden die Kulturen auf 16 °C temperiert.

Wenn die 16 °C erreicht waren, wurde mit 0,2 - 1 mM IPTG induziert. Falls ein Chaperon koexprimiert wurde, wurde dieses zusätzlich mit L-Arabinose [1 mL Stammlsg. auf 100 mL Kultur (~5 mM), im Falle von pGro7, pKJE7, pTf16] oder Tetracyclin (5 ng/mL, im Falle von pG-Tf2 und pG-KJE8) induziert. Die Kulturen wurden weiter für ~16-20 h bei 16 °C mit 200 rpm inkubiert.

Neben Chaperonen wurden zur Erreichung einer besseren Löslichkeit der Proteine auch Medienzusätze, wie NaCl (10 g/L), EtOH (3 mL/100 mL), Glucose (20 g/100 mL und Saccharose (30 g/mL) ausprobiert. Auch das "Overnight Express® Instant TB Medium" (Novagen/Merck) wurde getestet.

Die Expressionsvolumen für eine Standardexpression waren meist 100 mL, 200 mL oder 400 mL Medium in 500 mL, 1000 mL, oder 2000 mL Erlenmeyer-Schikane-Kolben. Vor der dieser großvolumigen Expression wurden die besten Bedingungen im Kleinmaßstab ("small scale") ausprobiert. Durch die Verwendung von Reagenzgläsern konnten bis zu 60 verschiedene Expressionsbedingungen gleichzeitig getestet werden. Kleinmaßstab-Kulturen wurden beispielsweise folgendermaßen angefertigt: zu 3 mL Medium wurde 60 µL Übernachtskultur gegeben und für 2,5 h bei 37 °C mit 200 rpm inkubiert. Nach der Induktion mit 0.1 mM IPTG und 30 µL L-Arabinose Stammlsg. wurde 2 h lang weiter inkubiert.

### **Kultivierung von *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL**

Es wurden zunächst Übernachtskulturen analog zu BL21(DE3) angefertigt, jedoch benötigte der Stamm *E. coli* ArcticExpress® (DE3)RIL zusätzlich noch 20 µg/mL Gentamycin und 50 µg/mL Streptomycin. Die Reagenzgläser wurden in schräger Stellung mit 200 rpm im Schüttelinkubator ~16 h bei 37 °C geschüttelt.

Mit der Übernachtskultur wurden die Hauptkulturen wieder 1:40 angeimpft, jedoch wurde nun kein Antibiotikum mehr hinzugefügt. Die Kulturen wurden im Schikanekolben bei 24-30 °C für 3-5 h bei 250 rpm inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> etwa 0,6-1,0 erreicht hatte. Danach wurden die Kulturen auf 11 °C-12 °C temperiert.

Wenn die 11 °C - 12 °C erreicht waren, wurde mit 0.5 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden dann weiter bei 11 °C und 235 rpm für ~16-24 h inkubiert.

Die Expressionsvolumina waren die gleichen wie bei *E. coli* BL21(DE3).

### **Kultivierung von *E. coli* Rosetta-gami@2(DE3)plysS**

Es wurden zunächst Übernachtskulturen analog zu *E. coli* BL21(DE3) angefertigt, jedoch benötigte der Stamm *E. coli* Rosetta-gami@2(DE3)plysS zusätzlich noch 25 µg/mL Chloramphenicol, 50 µg/mL Streptomycin und 12,5 µg/mL Tetracyclin. Die Reagenzgläser wurden in schräger Stellung mit 200 rpm im Schüttelinkubator bei 37 °C für ca. 16 h geschüttelt.

Mit der Übernachtskultur werden die Hauptkulturen 1:40 angeimpft und das entsprechenden Antibiotikum für den Vektor hinzugefügt. Die Kulturen wurden im Schikanekolben bei 37 °C für 4-6 h inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> etwa 1.0 erreicht hatte. Danach wurden die Kulturen auf 16 °C temperiert.

Wenn die 16 °C erreicht waren, wurde mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden weiter für ~16 h bei 16 °C mit 200 rpm inkubiert. Der Stamm wächst bei 16 °C nicht mehr (oder kaum noch) weiter. Deshalb es ist zu empfehlen, die Bakterien vorher zu großer Zelldichte anwachsen zu lassen.

### **Kultivierung von *P. putida* KT2440**

Die Kultivierung von *P. putida* erfolgt praktisch genauso, wie die von *E. coli* BL21(DE3). Der Stamm wächst auch mindestens genauso schnell. Bei der Verwendung des Plasmids pJB861 muss nur beachtet werden, dass mit *m*-Toluylsäure (5 mM) induziert wird. Diese Substanz färbt die Kulturen nach ein paar Tagen Standzeit dunkelbraun.

### **Kultivierung von *S. albus***

Die Kultivierung von *S. albus* wich deutlich von der der anderen Bakterien ab. Es wurde keine Übernachtskultur, sondern stattdessen eine andere Vorkultur

angeimpft: 30 mL LB-Medium plus Apr<sup>70</sup> und Nal<sup>25</sup> in 1.000 mL EM-Schikane-Kolben wurden mit ~50-100 µL Glycerin-Gefrierkultur-Sporenlösung inokuliert.

Diese Vorkultur wurde bei 27 °C mit 250 rpm für 48 h inkubiert. Danach wurden 270 mL LB+Apr<sup>50</sup> dazugegeben und unter gleichen Bedingungen 24 h, 48 h, oder 112 h weiter inkubiert.

Die Expressionsvolumen für eine Standardexpression waren meist 200 mL oder 400 mL Medium in 1000 mL oder 2000 mL Erlenmeyer-Schikane-Kolben. Bei *S. albus* wurde auf vorherige Kultivierung im Kleinmaßstab verzichtet.

### **F 3.1.3 Ernten der Zellen und Gewinnung des Proteinlysates**

Das Ernten der Zellen erfolgte durch Überführung der Kultur in 50 mL Falcon-Röhrchen oder 2 mL-Mikrozentrifugenröhrchen (im Falle von Kleinmaßstabskulturen) und anschließendem Zentrifugieren für 5-10 min bei 4 °C und 5.000 rpm (alle Schritte auf Eis!). Wenn die große Zentrifuge (Hermle) mit den 1 L Töpfen verwendet wurde, wurde 30 min lang bei 3.600 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets bei -20 °C oder -80 °C eingefroren.

#### **Zellaufschluss**

Der Zellaufschluss erfolgte durch das Einfrieren/Auftauen der Zellen, den Lysepuffer an sich und (vor allem) durch die Wirkung von entweder Ultraschall oder der Behandlung in der French-Press.

#### *Ultraschall*

Die Ultraschallbehandlung wurde bei *E. coli* und *P. putida* durchgeführt. Zur Gewinnung der Proteinlysate wurden die Pellets zunächst auf Eis in Lysepuffer aufgetaut und gelöst: zu den Pellets in den 50 mL Falcon-Röhrchen wurden 2-6 mL Lysepuffer und zu den Pellets in den 2 mL-Mikrozentrifugenröhrchen (Kleinmaßstab) 100 µL Lysepuffer hinzugefügt.

Es wurden 8-mal 10 s Ultraschall-Stöße mit 65 % Leistung (oder 3-mal 10 s mit 95 % Leistung) verabreicht, wobei die Röhrchen zwischen den Stößen immer auf Eis gelagert wurden. Am Geräusch ließ sich erkennen, ob die Zellen aufgeschlossen waren oder nicht. Am Anfang war das Geräusch laut und kratzig, am Ende ein leises hohes Pfeifen.

### *French Press*

Im Falle von *S. albus*-Kulturen kam die French-Press zum Einsatz: es wurden zu den pelletierten Zellen 35 mL Lysepuffer und 500-1.000  $\mu$ L Lysozym (50 mg/mL STE Puffer) hinzugefügt und 3-mal mit ~1.500 psi aufgeschlossen.

### **Gewinnung des Proteinlysates**

Die aufgeschlossenen Zellen in Lysepuffer wurden entweder in 1,5 mL, bzw. 2 mL Mikrozentrifugenröhrchen in der auf 4 °C gekühlten Mikrozentrifuge für 20-30 min bei 14.000 rpm, oder in 50 mL Falcon-Röhrchen in der Rotina 35R Zentrifuge für 30-40 min bei 11.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Dadurch wurden Pellet und Lysat voneinander getrennt. Der Überstand (Proteinlysate) wurde in Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C gelagert. Die Pellets wurden in 1 mL Lysepuffer resuspendiert und ebenfalls bei 4 °C gelagert.

### **Protease-Hemmer**

Es kamen, dem Lysepuffer zugesetzt, verschiedene Protease-hemmende Substanzen zur Anwendung: Leupeptin hemmt die Serin- und Cysteinproteasen; die Stammlösung war 5 mg/mL (= 10 mM) in MilliQ®-Wasser, die Arbeitskonzentration 0,5-50  $\mu$ g/mL. PMSF hemmt nur die Serin-Proteasen; die Stammlösung von Serin war 17,4 mg/mL (100 mM) in Isopropanol, die Arbeitskonzentration war 17-174  $\mu$ g/mL (100  $\mu$ L Stammlösung zu 500  $\mu$ L Lysepuffer). In einigen Fällen wurde auch der „Protease Inhibitor Cocktail“ (Sigma) (125  $\mu$ L zu 500  $\mu$ L Lysepuffer) ausprobiert.

### **Denaturierung**

In nur einem Fall wurde das Proteinlysate denaturiert. Dies geschah durch Zugabe von 8 M Harnstoff (1,2 g je 5 mL Lysat).

### **F 3.1.4 His-Tag-Affinitätschromatographie**

Das Proteinlysate (meist 2-6 mL) wurde mit 200-600  $\mu$ L Ni-NTA eine Stunde lang auf Eis schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Suspension aus Lysat und Ni-NTA in eine Poly-Prep® Chromatographie Säule gefüllt. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Nun wurde 2-mal mit 600  $\mu$ L Lysepuffer gewaschen und die Waschfraktionen aufgefangen. Das His-Fusionsprotein wurde mit Lysepuffer eluiert, dem Imidazol beigemischt wurde. Bei einer Imidazol-Konzentration von



100-300 mM löst sich der His-Tag mitsamt dem Protein von dem Ni-NTA und kann den Filter passieren. Bei niedrigeren Imidazol-Konzentrationen werden alle anderen Proteine ausgewaschen. Es wurden demnach Elutionsfraktionen mit 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM und 250 mM Imidazol angefertigt, manchmal zusätzlich auch 30 mM und 300 mM. Das jeweilige Volumen war meist 200  $\mu$ L.

### F 3.1.5 Aufkonzentrierung und Entsalzung der Proteine

#### TCA-Fällung

Diese Methode inaktiviert die Proteine irreversibel. Sie konnte aber gut für die Aufkonzentrierung vor SDS-PAGE (A), sowie für die anschließende Hydrolyse der Fettsäuren eingesetzt werden (B): A) zu 100  $\mu$ L Lysat wurde 1mL 10%-ige TCA gegeben, bei 2500 rpm für 2,5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und etwas SDS-Laufpuffer und Tris-Base hinzugefügt. Die Farbe sollte bei der Zugabe der Base wieder von hellgelb zu dem gewohnten blau umschlagen. B) zu 4,5 mL Proteinlysate wurden 600  $\mu$ L 50%-ige TCA gegeben und bei 2.500 rpm 2,5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann nochmal gefällt. Die Proteinpellets wurden in bis zu 2 mL 2M Tris Base gelöst.

#### Ammoniumsulfatfällung

Diese Fällung ist reversibel. Das Pellet kann in Lysepuffer wieder renaturiert werden. Es wurde eine 4 M Lösung (~35%, 105,7 g/200mL H<sub>2</sub>O) angefertigt, Schritt für Schritt zum Lysat hinzugefügt und ü/N bei 4 °C gefällt. Die **Tab. 30** gibt eine Übersicht über die getesteten die Ammoniumsulfat-Konzentrationen.

**Tab. 30:** Konzentrationsangaben für die Ammoniumsulfatfällung.

4 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Volumen des Proteinlysates	Endkonzentration
1400 $\mu$ L	600 $\mu$ L	70%
1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	50%
600 $\mu$ L	1400 $\mu$ L	30%
200 $\mu$ L	1800 $\mu$ L	10%

Für SupA hat sich eine Fällung mit 20-30% als am besten herausgestellt.

## SpeedVac

Beim Aufkonzentrieren der Proteinlysate in der SpeedVac entstand auch manchmal eine spontane Fällung der Proteine. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in einer geringeren Menge Lysepuffer resuspendiert.

## Entsalzung und Aufkonzentrierung mit VivaSpin

Die Entsalzung erfolgte meist mit VivaSpin Zentrifugaleinheiten (Fa. Sartorius). Diese Zentrifugaleinheiten filtern durch eine Membran mit definierter Porengröße (MWCO). Es gibt sie als VivaSpin 500 mit 500 µL und VivaSpin 15R mit 15 mL Fassungsvermögen. Erstere haben die Größe von 2 mL Mikrozentrifugenröhrchen und Letztere von 50 mL Falcon-Röhrchen. Der MWCO sollte so gewählt werden, dass er in etwa die Hälfte der molaren Masse des zu reinigenden Proteins entspricht. Am häufigsten wurde ein MWCO von 5.000 Da verwendet. Es kann neben der Reinigung, bzw. Entsalzung eine Aufkonzentrierung erreicht werden, wenn das Protein letztendlich in weniger Volumen aufgenommen wird.

Meist wurden die VivaSpin 500 verwendet. Es wurden 100-200 µL der Elutionsfraktion oder des Lysates bei 14.000 rpm in der Mikrozentrifuge für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, dann 3-mal mit 100-200 µL Milli-Q<sup>®</sup>-H<sub>2</sub>O gewaschen und der Durchfluss verworfen. Es blieb immer ein Rest von ~25 µL in der Zentrifugaleinheit zurück, der das aufkonzentrierte und entsalzte Protein enthielt.

## F 3.2 Protein-Assays

Zum einen wurde ein PPTase-Assay durchgeführt und zum Anderen ein AT-ACP-Assay mit <sup>14</sup>C-markiertem Malonyl-CoA (**34**), bzw. Acetyl-CoA (**33**). Der PPTase-Assay ist mit dem AT-ACP-Assay verknüpft, da die Umwandlung des *apo*-ACP in das *holo*-ACP im PPTase-Assay im AT-ACP-Assay durch die radioaktive Markierung des ACP bewiesen wird.

### F 3.2.1 PPTase-Assay

Als ACP kamen jeweils die Elutionsfraktionen von pTH89*apo*, pTH97*holo* und pHN80 (alle in *E. coli* BL21(DE3)) und die Fraktion von pTH97*holo* (aus *E. coli* Rosetta-gami@2(DE3)plysS) zum Einsatz; zusätzlich der *apo*-ACP PedN und PsyA<sub>ACP3</sub> (beide aus BL21(DE3)).

Als PPTasen wurden die Elutionsfraktionen von pTH90 in ArcticExpress (DE3)RIL, sowie pTH90/pKJE7 und die Sfp (aus BL21(DE3)) verwendet.

Alle Reaktionen fanden im Puffer der jeweiligen Elutionsfraktion (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150-250 mM Imidazol, pH 8.0) statt. Folgender Ansatz wurde zusammenpipettiert:

160 µL Elutionsfraktion <i>apo</i> -ACP (~ 300 µg/mL)
160 µL PPTase (~ 100 µg/mL)
4 µL CoA 125 mM (160 µM Endkonzentration)
<hr/> 2 h bei 30 °C

Zur Herstellung der CoA-Lösung wurden 9,59375 mg CoA (**36**) in 10 mL Milli-Q<sup>®</sup>-Wasser gelöst (=125 mM).

### F 3.2.2 AT-ACP Assay mit <sup>14</sup>C-markiertem Substrat

Es wurde radioaktiv markiertes Substrat eingesetzt, um die Aktivität von AT und ACP festzustellen, bzw. ein, eine dieser enzymatischen Funktionen enthaltendes, Protein zu markieren. Es kamen 2-<sup>14</sup>C-Malonyl-CoA (**34**) und 1-<sup>14</sup>C-Acetyl-CoA (**33**) zur Anwendung. Die eingesetzten ACP waren die gleichen wie beim PPTase Assay, zuzüglich deren holo-Formen (außer von PedN und PsyA<sub>ACP3</sub>).

Als AT wurde ausschließlich die SupA<sub>AT1</sub> eingesetzt (pTH86), in einigen Fällen in der Didomänen-Variante SupA<sub>KS-AT1</sub> (pTH125). Beide Proteine waren in *E. coli* ArcticExpress (DE3)RIL exprimiert worden.

Alle Assays wurden im Puffer der jeweiligen Elutionsfraktion (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150-250 mM Imidazol, pH8.0) durchgeführt.

Folgender Ansatz wurde zusammenpipettiert:

4 µl 10 mM DTT oder 4 µL 10 mM TCEP (Endkonz. 2 mM)
5 µl AT (~200 µg/mL)
9 µl ACP (~300 µg/mL)
2 µl [2- <sup>14</sup> C]-Malonyl-CoA (10 µCi/ml) oder 1 µl [1- <sup>14</sup> C]-Acetyl-CoA (20 µCi/ml)
<hr/> 5 min bei RT, oder 30 s auf Eis

Die Assay-Reaktionen wurden durch Zugabe des radioaktiven Substrates gestartet und durch das „Kochen“ der Proben bei 99 °C für 5 min in 2 x SDS-Laufpuffer gestoppt.

### F 3.3 Analytik der Proteine

Die Analytik der Proteine ging von der SDS-PAGE über die HPLC bis zur Massenspektrometrie.

#### F 3.3.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung und anschließenden Visualisierung der Proteine wurden SDS-Polyacrylamidgele angefertigt. Als Kammern dienen zwei rechteckige Glasplatten mit u-förmigem Dichtgummi (obere Seite offen), die mittels Klammern fixiert und senkrecht aufgestellt wurden.

#### Trenngel

Das Trenngel wurde nach **Tab. 31** angesetzt. Je nach der Größe der verwendeten Gelkammer wurden 15 mL (ausreichend für 2 Gele der Größe Mini und Midi, sowie 1 Gel der Größe Midi-long) oder 50 mL (für 1 großes Gel) Trenngel angesetzt. Die 10%-ige (w/v) APS-Lösung konnte (abweichend zur Empfehlung des Frisch-Ansetzens) einige Tage bei 4 °C gelagert werden.

**Tab. 31:** Trenngel-Rezepte für SDS-PAGE.

Komponente	15 mL 5 % <sup>[a]</sup>	15 mL 8%	15 mL 10%	15 mL 12%	15 mL 20%	50 mL 20%	50 mL 7,5%
beste Auftrennung bei	~100 kDa	~100 kDa	~70 kDa	~50 kDa	~30 kDa	~30 kDa	~100 kDa
Trenngel 4 x Puffer <sup>[b]</sup>	--	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	12,5 mL	---
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	7,9 mL	8,25 mL	7,5 mL	6,75 mL	3,75 mL	12,5 mL	24,25 mL
30% Acrylamid-Mix	3,0 mL	3 mL	3,75 mL	4,5 mL	7,5 mL	25 mL	12,5 mL
1,5 M Tris (pH 8,0)	3,8 mL	--	--	--	--	--	12,5 mL
10% SDS	150 µL	--	--	--	--	--	0,5 µL
10% APS	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	80 µL	250 µL
TEMED	12 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	8 µL	25 µL
<sup>[a]</sup> nach <sup>[319]</sup>							
<sup>[b]</sup> 1,5 M Tris (90,825 g), 0,8% SDS (40 mL 10% SDS, ad 300 mL H <sub>2</sub> O), pH 8,8 (mit HCl), ad 500 mL H <sub>2</sub> O							

Das Trenngel wurde in die vorbereitete Kammer(n) gegossen, wobei ein entsprechend großer oberer Rand (1-2 cm) für das später hinzukommende Sammelgel gelassen wurde, und mit ein wenig Isopropanol überschichtet. Dann wurde das Sammelgel angesetzt.

## Sammelgel

Je nach der Größe der verwendeten Gelkammer (Multigel, Fa. Biometra) wurden 4 mL (ausreichend für 2 Gele der Größe Mini und Midi, sowie 1 Gel der Größe Midi-long) oder 5 mL (für 1 großes Gel) Sammelgel angesetzt ( **Tab. 32**).

**Tab. 32:** Sammelgel-Rezepte für SDS-PAGE.

Komponente	2 mL 5 % <sup>[a]</sup>	4 mL 5 % a	5 mL 4,4%	5 mL 4% großes Gel
Sammelgel 4X Puffer <sup>[b]</sup>	--	--	1,25	---
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1,4 mL	2,8	3,25	3,675
30% Acrylamid-Mix	330 µL	660 µL	500 µL	650
1,0 M Tris (pH 6,8)	250 µL	500 µL	---	625
10% SDS	20 µL	40 µL	--	50
10% APS	20 µL	40 µL	50 µL	25
TEMED	2 µL	4 µL	5 µL	5
<sup>[a]</sup> nach <sup>[319]</sup>				
<sup>[b]</sup> 0,5 M Tris (30,275 g), 0,8% SDS (40 mL 10% SDS) <i>ad</i> 300 mL H <sub>2</sub> O, pH auf 6,8 mit HCl einstellen, <i>ad</i> 500 mL H <sub>2</sub> O				

Nach dem Polymerisieren des Trenngels (ca. 1-2 h) wurde der Isopropanol entfernt und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> nachgespült, das Sammelgel aufgegossen und der Kamm eingesetzt.

Nach ~30 min konnten die Gummis entfernt und die Glaskammern in das Gehäuse eingesetzt und mit Klammern befestigt werden. Nun wurde das Gehäuse mit SDS-Elektrophoresepuffer aufgefüllt und die Kämmen entfernt.

Die zu beladenden Proteinproben wurden mit SDS-Laufpuffer vermischt (z. B. 20 µL Probe plus 20 µL 2 x SDS-Laufpuffer) und im Thermoblock für 5 min bei 99 °C denaturiert. Für gering konzentrierte Proben wurde auch 4-fach konzentrierter SDS-Laufpuffer verwendet.

In die kleinen Taschen der Mini- und Midi-Gele wurden meist 13 µL der Lysate und 6 µL der Pellets aufgetragen. In die großen Taschen dieser Gele passten maximal 20 µL. Vom Größenstandard Roti-Mark (Carl Roth) wurden 3,5 µL und von NEB Broad-Range Marker wurden 7 µL aufgetragen. Im Falle der Verwendung des großen Gels (Protean II xi) wurden 60 µL Probe und 10 µL Roti-Mark Größenstandard aufgetragen.

Nach Schließen des Deckels wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Nachdem die blaue Linie im Trenngel angekommen war (~30 min), konnte die Spannung auf 130-150 V erhöht werden. Die Gesamtlaufzeit betrug meist 2-4 h. Im Falle der großen Gelkammer wurde eine Wasserkühlung angeschlossen und bei konstant 100 V für 16 h laufen gelassen.

Nach Beendigung des Laufes, was meist der Fall war, wenn die blaue Bande kurz vor dem Auslaufen aus dem Gel war, wurde das Gerät ausgeschaltet, der Puffer weggegossen und die Gele vorsichtig von den Glasplatten in eine Plastikschaale, zu der es einen dicht schließenden Deckel gab, überführt.

### **Coomassie-Färbung**

Das Gel wurde in der Plastikschaale mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gespült und dann mit der Färbelösung großzügig bedeckt. Nach ~30 min schüttelnder Inkubation bei RT war das Gel komplett kräftig blau. Je nach Frische der Färbelösung konnte die Zeit etwas kürzer oder länger sein. Nun wurde die Lösung wieder zurück in die Flasche gegossen, das Gel kurz mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gespült, mit Entfärbepuffer überschichtet und weiter schüttelnd bei RT inkubiert. Der Entfärber wurde, wenn er stark blau geworden war, gewechselt. Die Entfärbung dauerte, je nach Frische des Entfärbers und Häufigkeit des Wechsels 30 min- 2 h. Der gebrauchte Entfärber konnte problemlos über einen Aktivkohlefilter wieder gereinigt und danach wiederverwendet werden.

Nach Entfärbung wurden die Gele in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  zwischengelagert und mit einem herkömmlichen Scanner eingescannt. Nach dem Scannen wurden die Gele zur Archivierung zwischen zwei Celluloseacetat-Folien in speziellen Acrylglasrahmen der Fa. Carl Roth getrocknet. Dazu mussten sie zusammen mit den Folien vorher für mindestens 30 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  eingeweicht werden. Noch besser, und obligatorisch für große Gele, war das Einweichen in Trocknerlösung (10% Glycerin, 20% Ethanol in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ).

### **Silberfärbung des Proteingels**

Das Protokoll für die Silberfärbung ist in **Tab. 33** zusammengefasst. Die Silberfärbung ist deutlicher sensitiver als die Coomassie-Färbung, jedoch auch wesentlich aufwändiger. Da manche Proteine sich mit der Coomassie-Methode nicht gut anfärben lassen, wurde die Silberfärbung in den Fällen angewandt, in

denen in der SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung kein überexprimiertes Zielprotein sichtbar war.

**Tab. 33:** Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen.

Arbeitsschritt	Endkonzentration	Ansatz
Fixieren, >1 h	50% MeOH 12% Eisessig 500 µL/L Formalin, 37%	500 mL MeOH 120 mL Eisessig 250 µL Formalin ----- ad 1000 mL H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Waschen, 3 x 20 min	50% EtOH	1000 mL
Imprägnieren, 1 min	200 mg/L Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	250 µL ----- ad 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Waschen, 3 x 20 s	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
Silber, 20 min	2 g/L AgNO <sub>3</sub> 750 µL/L Formalin, 37%	500 µL 37,5 µL ----- ad 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Waschen, 2 x 20 s	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
Entwickeln bis Banden erscheinen	60 g/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 500 µL/L Formalin, 37% 4 mg/L Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	50 mL 25 µL 5 µL
Waschen, kurz	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
Stoppen, 10 min	50% MeOH 12% Eisessig	500 mL
Waschen, >20 min	30% MeOH 3% Glycerin	500 mL
Waschen (Ende)	3% Glycerin	500 mL

### Visualisierung von Radioaktivität in SDS-PAGE Gelen

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Coomassie-Färbung eingescannt und dann auf dickem Papier unter Vakuum für 12 h bei 60 °C getrocknet. Danach wurden die Gele nochmals gescannt und in einer Filmkassette (20 x 40 cm) fixiert. Auf die fixierten Gele wurde mit der weißen Seite ein 20 x 40 cm großer Detektionsfilm („Screen“) gelegt, die Kassette geschlossen und für 24-96 h in einem Stahlschrank gelagert. Der Screen wurde dann in einem Image Reader eingelesen (Fujix BAS 1000, Software BAS Reader) und mit der Software TINA 2.09d ausgewertet.

### F 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

#### *Amidoschwarz-Methode*

Diese Methode hat gegenüber der sog. „Bradford“-Methode den Vorteil, dass ein Tropfen des gelösten Proteins zur Bestimmung ausreicht. Allerdings ist sie dafür etwas weniger exakt.

Es wurde auf einer speziellen weißen Celluloseacetat-Folie eine Eichreihe, bestehend aus 10 einzelnen Tropfen unterschiedlicher BSA-Konzentration (0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,4; 2,8; 3,2, 3,6 mg/mL in Lysepuffer) angefertigt. Darunter wurden Tropfen der zu messenden Proteinlösungen aufgetragen. Die Tropfen wurden mit dem Fön getrocknet. Nun wurden die Folie in der Färbelösung ( **Tab.** 34) 10 min schüttelnd gefärbt. Die Lösungen können mehrmals verwendet werden. Die Folie wurde dann kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült und in der Entfärbelösung 3 x 5 min schüttelnd entfärbt und schließlich getrocknet. Es war bereits jetzt möglich, die blaugrau gefärbten Punkte ihrer Intensität nach zu vergleichen und den jeweiligen BSA-Konzentrationen zuzuordnen. Zur genaueren Messung der Punktdichten wurden die Punkte ausgeschnitten, in 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen überführt und in 500 µL Auflöselösung aufgelöst (30 min bei 50 °C, 1.000 rpm im Thermomixer). Abschließend wurden die Extinktionen der Punkte-Auflösungen im Photometer bei 620 nm gemessen.

**Tab. 34:** Lösungen für die Amidoschwarz-Methode.

Lösung	Bestandteil	Menge (in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> )
Färbelösung	Amidoschwarz	0,5% (w/v)
	Methanol	45% (v/v)
	Eisessig	10% (v/v)
Entfärbelösung	Methanol	47,5% (v/v)
	Eisessig	5% (v/v)
Auflöselösung	Ameisensäure	80% (v/v)
	Eisessig	10% (v/v)
	Trichloressigsäure	10% (w/v)

#### *Messung der Gelbanden-Dichten im SDS-Polyacrylamidgel*

Diese Methode kam zum Einsatz, wenn das Protein, dessen Konzentration es zu bestimmen galt, zusammen mit Chaperonen in der Elutionsfraktion vorlag.

Es wurde ein 20%-iges SDS-PAGE Minigel angefertigt. Für die Eichgerade wurden jeweils 100 µL BSA in den Konzentrationen 0,2; 0,4; 0,8 und 1,6 mg/mL



mit 100  $\mu\text{L}$  2 x SDS-Laufpuffer vermischt und 10  $\mu\text{L}$  davon aufgetragen. Von den zu messenden Proben wurden 10  $\mu\text{L}$  mit 10  $\mu\text{L}$  2 x SDS-Laufpuffer vermischt und 10  $\mu\text{L}$  davon aufgetragen. Alle Proben wurden vor dem Auftragen für 5 min bei 99 °C denaturiert. Das fertige, Coomassie gefärbte Gel wurde in der Gel-Doku-Anlage mit der SynGene Software ausgewertet. Es wurden die Gelbanden markiert und deren Dichtewerte im Verhältnis zu den BSA Standards bestimmt und daraus deren Konzentration berechnet.

### F 3.3.3 Tryptischer In-Gel-Verdau von Proteinbanden

Diese Methode eignet sich vor allem für die Verifizierung von SDS-PAGE Gelbanden mittels Massebestimmung durch MALDI/MS oder auch ESI/MS.

Die Proteinbande wurde aus dem Coomassie gefärbten, noch nicht getrockneten SDS-PAGE mittels Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 mL Mikrozentrifugenröhrchen verbracht. Dann wurde 2 x 15 min mit 500  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gewaschen, danach 2 x 15 min mit  $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetonitril}$  (AcCN) (1/1) und abschließend 1 x 15 min mit 500  $\mu\text{L}$  AcCN gewaschen. Das Gelstück sollte nun komplett entfärbt sein. Wenn noch blaue Farbe zu sehen war, wurden die Waschschrte wiederholt.

Nun wurde das AcCN entfernt und das Gelstück 15 min an der Luft getrocknet. Danach wurden 20-100  $\mu\text{L}$  einer Trypsin-Lösung (6,4  $\mu\text{L}$  Trypsin (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) in 1 mL frischem 40 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer (32 mg/10 mL) auf das Gelstück pipettiert. Nachdem das Gelstück für 10 min gequollen war, wurde noch mehr 40 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer (ohne Trypsin) dazugegeben damit das Gelstück vollständig überdeckt blieb. Nun wurde bei 37 °C für 3,5-16 h inkubiert. Der Überstand enthielt das verdaute Protein. Der Überstand wurde mittels VivaSpin aufkonzentriert und entsalzt (siehe F 3.1.5), sowie in der SpeedVac eingetrocknet. In dem Falle, dass die Konzentration an Protein zu gering war, wurde das nach Verdau verbliebene Gelstück erneut extrahiert, die Überstände vereinigt und aufkonzentriert.

### F 3.3.4 HPLC-Messung der ACP

Das ACP SupB wurde mit der HPLC (Fa. Jasco) analysiert. Als Säule wurde die analytische C-18-Säule (ODS-3) 250 x 4.0 gewählt. Es wurden 100  $\mu\text{L}$  der Elutionsfraktion (Lysepuffer, 200 mM Imidazol) von pTH89*holo* und pTH89*apo*

injiziert. Die Laufmittel waren: A = Acetonitril + 0,1% TFA, B = Wasser + 0,1% TFA. Es wurde ein Fluss von 1 mL/min gefahren. Das Protein konnte mittels UV-Detektors bei 206 nm detektiert werden. Folgende HPLC-Methode wurde für die ACP-Messung verwandt:

**Methode „flat“ = 60 min**

0-10 min → 30% von Laufmittel A

10-30 min → Gradient von 30-65% von Laufmittel A

30-40 min → 65% von Laufmittel A

40-55 min → Gradient von 65-30% von Laufmittel A

55-60 min → 30% von Laufmittel A

### F 3.3.5 LC/MS Messung der ACP

Das SupB-ACP wurde auch mit LC/MS gemessen. Als Säule wurde die analytische C-18-Säule Nucleodur 100, 125 x 2 mm, 5 µm verwendet. Es wurden 30 µL der Elutionsfraktion (Lysepuffer, 200 mM Imidazol) von pTH89*holo* und pTH89*apo* injiziert. Die Laufmittel waren: A = Acetonitril + 0,1% TFA, B = Wasser + 0,1% TFA. Es wurde ein Fluss von 0,4 mL/min gefahren. Das Protein konnte mittels UV-Detektors bei 254 nm detektiert werden, danach maß das angeschlossene ESI-microQ-TOF Massenspektrometer die Massen im Positivmodus. Folgende HPLC-Methode wurde für die ACP-Messung verwandt:

**Methode „more flat“ = 70 min**

0-10 min → 30% von Laufmittel A

10-40 min → Gradient von 30-65% von Laufmittel A

40-50 min → 65% von Laufmittel A

50-65 min → Gradient von 65-30% von Laufmittel A

65-70 min → 30% von Laufmittel A

Für eine direkte Messung mit ESI-microQ-TOF, unter Umgehung der HPLC, wurden die Proben vorher mit VivaSpin entsalzt (F 3.1.5), mit dem gleichen Volumen Acetonitril + 0,2% TFA versetzt und im Positivmodus gemessen.

### F 3.3.6 MALDI-TOF-TOF-MS der Proteine

Diese Methode hat den Vorteil, dass relativ geringe Substanzmengen gemessen werden können. Außerdem lassen sich relativ große (~15.000 Da) Molekülmassen messen. Der Nachteil ist die relativ geringe Genauigkeit der Massenangaben. Die Proben wurden vor der Messung mittels VivaSpin 500 entsalzt (siehe F 3.1.5) und in der SpeedVac getrocknet. Zur Messung wurden die Proben in ~ 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  resuspendiert.

### F 3.3.7 ESI-FT-ICR-MS

Die Elutionsfraktionen der Proteine (200  $\mu\text{L}$ ) wurden mittels Filtrierung durch VivaSpin 500 Zentrifugaleinheiten entsalzt (siehe F 3.1.5). Das Residualvolumen (25  $\mu\text{L}$ ) wurde mit dem gleichen Volumen Acetonitril + 0,2% TFA versetzt und im Positivmodus gemessen.

### F 3.3.8 Berechnung der Proteinmassen

Die AS-Zusammensetzung der Proteine wurde mit Hilfe der Software Vector NTI aus der Nukleotidsequenz berechnet. Dabei wurde der His-Tag mit einbezogen. Da die ebenfalls von den gängigen Programmen (z. B. Editseq, Vector NTI) berechenbare Masse der Proteine nicht mit der exakten (monoisotopischen) Masse des Proteins übereinstimmt, wurde hierfür eine Excel-Kalkulation verwendet, welche von der Analytikabteilung der Chemie Uni Bonn (M. Engeser) erstellt wurde. Die exakte Massendifferenz zwischen einem *apo*- und einem *holo*-ACP beträgt ~340,1 Da, was der Masse des Phosphopantetheinarms (~339,1 Da) plus einem Proton entspricht. Das Proton kommt dazu, um die negative Ladung am Phosphat des Phosphopantetheinarms auszugleichen (siehe Abb. 8).<sup>[235]</sup>

## F 4 Analytik der Fettsäuren und Lipide

Die Methode der Wahl war, sowohl bei Bakterienkulturen, als auch bei Schwammmaterial, die Lipidextraktion nach Bligh & Dyer mit anschließender milder alkalischer Methanolyse.<sup>[320, 321]</sup> Die einzelnen Schritte sind in den folgenden Abschnitten beschrieben. Beim Umgang mit Lipiden und Fettsäuren musste generell fettfrei und weichmacherfrei gearbeitet werden, was bedeutete, dass nur saubere Glasware und kein Plastik verwendet werden durfte. Mit Teflon (PTFE) beschichtete Schraubdeckel waren erlaubt. Die Glasware konnte nach Waschen (mit Wasser und Seife) sowie Muffeln (4 h bei 400 °C), die Deckel nach Waschen mit Aceton (3-mal), wiederverwendet werden. Die Lösemittel sollten eine sehr hohe Reinheit aufweisen (p.a. oder HPLC/GC). Wenn in den Protokollen H<sub>2</sub>O angegeben ist, ist stets „Nanopure“-Wasser (siehe F 1.6.2) gemeint.

### F 4.1 Lipidextraktion

Bei der Lipidextraktion werden zunächst die Gewebe und Zellen zerstört und die Lipide aus den Membranen und Vesikeln herausgelöst, dann werden die Lipide in Chloroform gelöst und gegen eine Methanol/Wasser-Phase gereinigt.

#### F 4.1.1 Lipidextraktion aus *E. coli* und *P. putida*

Im Folgenden werden die generellen Methoden der Lipidextraktion beschrieben. Die im Einzelfall tatsächlich verwendeten Parameter (Zeiten, Temperaturen) werden im Ergebnisteil aufgeführt.

#### Transformation und Kultivierung

Die Stämme wurden wie beschrieben (siehe F 3.1.1) mit dem Expressionsplasmid elektroporiert und Übernachtskulturen angefertigt.

Die Kulturen wurden analog zu den Kulturen für die *in vitro* Proteinexpression behandelt (siehe F 3.1.2), sowohl die Wirtsbakterien, als auch die Zeiten und Temperaturen der Kultivierung betreffend. Am häufigsten wurde bei 16 °C inkubiert. Im Falle des Vorhandenseins eines induzierbaren Promotors, bzw. eines Chaperons wurde mit 0,2-0,5 mM IPTG (*T7lac*, *Ptac*), 1 mM oder 5 mM m-Toluylsäure (*Pm*) oder 1mL L-Arabinose Stammlösung pro 100 mL Kultur (*araB*) induziert. Nach Induktion wurde dann meist ü/N bei 16 °C, 200 rpm weiter inkubiert.

## Extraktion

Für die Lipidextraktion wurden 10 mL Kulturlösung von *E. coli* oder *P. putida* abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 2 mL „Nanopure“-Wasser gelöst und in 15 mL Schraubdeckelgläser (Firma Supelco) überführt.

Die Extraktion erfolgte nach den Regeln von Bligh und Dyer,<sup>[244]</sup> wonach ein Verhältnis von 1:1:0.9 von  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O zu wahren ist. Demnach wurden zu den 2 mL Bakteriensuspension 2,5 mL  $\text{CHCl}_3$  hinzugefügt und geschüttelt, dann 5 mL MeOH hinzugegeben und gevortext. Wichtig ist, dass es sich jetzt noch um ein Einphasensystem handelt. Die Röhrchen wurden ü/N bei 30 °C geschüttelt (im Dunkeln). Dann wurden 2,5 mL  $\text{CHCl}_3$  und zuletzt 2.5 mL H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Die Röhrchen mussten solange stehen, bis sich die 2 Phasen separiert und geklärt haben (einige Stunden). Bei einer zu großen Bakterienmenge bildete sich eine dicke Interphase, die es zu vermeiden galt. Durch Zentrifugieren (z. B. 5 min bei 2500 rpm) konnte bei Bedarf die Phasentrennung beschleunigt und die Ausdehnung der Interphase auf ein Minimum begrenzt werden. Die obere (MeOH/H<sub>2</sub>O) Phase und die Interphase wurden mittels Pasteurpipette abgesogen und evtl. weiterverwendet. Die untere Phase enthielt die Lipide und wurde in ein neues Schraubdeckelglas überführt, indem es eine kleine Säule (in normaler Pasteurpipette mit etwas Glaswolle) aus wasserfreiem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> passierte. Ziel war es, kein Wasser mit zu überführen. Die Lipide wurden unter einem leichten N<sub>2</sub>-Strom vom Lösemittel befreit, wobei es hilfreich war, die Verdunstungskälte durch leichtes Anwärmen der Gläschen auszugleichen. Der Lipidextrakt wurde bei -20 °C gelagert, am besten nicht vollkommen trocken, sondern in einem Tropfen Chloroform.

### F 4.1.2 Lipidextraktion aus *S. albus*

*S. albus* wurde wie beschrieben transformiert (siehe F 3.1.1) und kultiviert (siehe F 3.1.2). Da *S. albus* langsamer wächst als *E. coli* oder *P. putida*, wurden 20 mL Bakterienkultur für mindestens 3-5 Tage bei 30 °C geschüttelt (200 rpm). Da ein Zentrifugieren bei diesen filamentösen Bakterien nicht so einfach ist, wurden die 20 mL komplett extrahiert. Dazu wurden 30 mL  $\text{CHCl}_3$  und 50 mL MeOH dazugegeben, um das Einphasensystem zu erreichen. Dann wurde Ultraschall eingesetzt und ü/N geschüttelt (im Dunkeln). Danach wurden 25 mL  $\text{CHCl}_3$  und

25 mL "Nanopure"-Wasser dazugegeben und gewartet, bis sich die zwei Phasen vollständig separiert hatten. Die untere (Lipid-) Phase wurde in einem Rundkolben eingengt und in ein 15 mL Schraubdeckelgläschen überführt, wobei sie eine kurze Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Säule passierte. Unter leichtem N<sub>2</sub> Strom wurde dann das Lösungsmittel vollständig abgedampft. Die obere (MeOH/H<sub>2</sub>O) Phase wurde nicht verworfen, sondern sauer methyliert (F 4.3.2).

Bei *S. albus* wurde außerdem auch von Kulturen auf Agarplatten extrahiert. Dazu wurden 100 µL Sporen auf MS Agarplatten (normaler Größe, F 1.6.2) 3 bis 12 Tage bei 30 °C inkubiert und eine halbe Platte mit der Impföse und/oder sterilen Wattestäbchen abgenommen und in 2 mL „Nanopure“-Wasser gelöst, das sich in einem 15 mL Schraubdeckelgläschen befand. Das weitere Verfahren war dann identisch mit dem bei *E. coli* und *P. putida* (siehe F 4.1.1).

#### **F 4.1.3 Lipidextraktion aus *C. glutamicum***

Die Kultivierung von *C. glutamicum* ATCC13032 wurde von K. Krumbach (AG L. Eggeling, FZ Jülich) durchgeführt. Der Stamm wurde elektroporiert (siehe F 3.1.1) und generell bei 30 °C auf LB-Agarplatten angezogen. Auf dem Vektor pJC1 ist kein induzierbarer Promotor enthalten, auf pMSX befindet sich der *Ptac* Promotor, welcher mit IPTG induzierbar ist. Es wurde aber auf eine Induktion verzichtet, weil dieser Promotor immer eine ausreichende Grundaktivität in *C. glutamicum* hat. Die Messung der polaren Lipide (mittels Dünnschichtchromatographie) und der Fettsäurezusammensetzung (MIDI Protokoll, F 4.5) des mit dem *sup*-Cluster transformierten Stammes erfolgte durch einen Service der DSMZ (<http://www.dsmz.de/identification/main>).

#### **F 4.1.4 Lipidextraktion aus Schwammmaterial**

Das Prinzip war das Gleiche wie bei der Lipidextraktion aus Bakterien, nur die Aufarbeitung des Materials und die Gesamtmengen an Lösungsmitteln waren anders. Es wurde das Schwammmaterial aus dem -80 °C Vorrat genommen und ein etwa pfirsichkerngroßes Stück (z. B. 9,3 g) abgespalten. Der Schwamm wurde in einen sterilen Mörser überführt und mit flüssigem Stickstoff übergossen, damit er nicht auftaut. In tiefgefrorenem Zustand wurde der Schwamm zermahlen und in einen 500 mL EM-Kolben transferiert. Nun wurden zu den 9,3 g Nassgewicht (enthält 82,7%, also 7,7 mL Wasser) 48,3 mL H<sub>2</sub>O und 70 mL CHCl<sub>3</sub> hinzugefügt und geschüttelt. Dann wurden 140 mL MeOH dazugegeben. Das

Einphasensystem wurde mit dem Ultraschallfänger für 2 min bei 55% Leistung geschallt und anschließend 24 Stunden bei RT unter Lichtabschluss stehen gelassen. Gelegentlich wurde der Kolben geschüttelt. Die Lösung wurde durch einen Filter aus Glaswolle in einen 500 mL Messzylinder transferiert und 70 mL  $\text{CHCl}_3$  und 56 mL „Nanopure“-Wasser hinzugegeben. Nach Schütteln wurde ein paar Stunden bis ü/N auf die vollständige Trennung der 2 Phasen gewartet. Dann wurde mittels einer 20 mL Glaspipette die 223 mL der oberen (MeOH/H<sub>2</sub>O) Phase abgesaugt und zur sauren Methanolyse (F 4.3.2) in einen Rundkolben überführt. Die untere Phase (Lipide, ~130 mL) wurde durch eine Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Säule in einen weiteren Rundkolben überführt, am Rotationsverdampfer eingengt, in 15 mL Schraubdeckelgläschen transferiert und vollständig getrocknet. Die Lipidextrakte wurden in einem Tropfen  $\text{CHCl}_3$  bei -20 °C eingelagert.

## F 4.2 Fraktionierung der Lipide

Die Lipidfraktion wurde in Neutrallipide (NL), Glycolipide (GL) und Polare Lipide (PL) fraktioniert. In speziellen Fällen (bei einigen Schwämmen) wurde zusätzlich die PL-Fraktion weiter nach Polarität fraktioniert.

### NL, GL, PL

Das Kernstück der *"Polar lipid fatty acid analysis"* (PLFA)-Methode ist die Auftrennung der Gesamtlipide nach Polarität in die drei Fraktionen NL, GL und PL, wobei meist nur die PL Fraktion weiterbearbeitet wird.<sup>[322]</sup> Das hat a) den Vorteil, dass die Massenspektren „sauberer“ sind, und b) hat die PL Fraktion die höchste Aussagekraft für die Fettsäure-Biomarker-Analyse.<sup>[323]</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde aber keine klassische PLFA durchgeführt, sondern alle Fraktionen gemessen.

Zuerst wurden die Säulen vorbereitet: zu 0,5 -1 g Silica-Gel (Unisil 100-200 Mesh) wurden 5 mL 0,02 M NH<sub>4</sub>-Acetat in MeOH gegeben. Das Gemisch wurde mittels Pasteurpipette nach und nach in eine, mit etwas Glaswolle locker gestopfte, großvolumige Pasteurpipette (sogen. „Monster-Pipette“) gespritzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstanden. Das Silica Gel hatte in der Säule eine Höhe von etwa 1,5 -2 cm. 1 g Unisil ist ausreichend für bis zu 25 mg Lipid.

Bei allen weiteren Schritten war es wichtig, dass die Säule nie trocken wurde. Zum Waschen der Säule wurden nacheinander 5-10 mL Aceton und 5-10 mL  $\text{CHCl}_3$  über die Säule gegeben. Dann wurde die Lipidprobe in 100  $\mu\text{L}$   $\text{CHCl}_3$  gelöst und auf die Säule gegeben. Eluiert wurden die NL mit 5-10 mL  $\text{CHCl}_3$ , die GL mit 5-10 mL Aceton und die PL mit 10-20 mL MeOH ( **Tab. 35**). Die drei Fraktionen wurden mittels leichten  $\text{N}_2$ -Stroms vom Lösemittel befreit, wobei besonders bei der PL Fraktion ein leichtes Anwärmen der Röhren hilfreich war.

**Tab. 35: Fraktionierung der Lipide**

Fraktion→	NL	GL	PL
Eluent→	$\text{CHCl}_3$	Aceton	MeOH
Eluat→	Neutrallipide	Glyco-/Sulfolipide	polare Lipide

### Auftrennung der PL Fraktion in PL1, PL2, PL3, PL4

Die Auftrennung der Polaren Lipide in 4 weitere Fraktionen erfolgte auf einer neuen Silica Gel Säule (wie oben) nach Christie ( **Tab. 36**).<sup>[217]</sup> Die PL1 wurde mit 5 mL  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5) eluiert, die PL2 mit 5 mL  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (80:20), die PL3 mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (50:50) und die PL4 mit 5 mL reinem MeOH. In der PL1 sollte sich hauptsächlich DPG/PA, in der PL2 PE/PS, der PL3 PI/PC und in der PL4 SM/IyPC befinden.

**Tab. 36: Fraktionierung der Polaren Lipide.**

Fraktion→	PL1	PL2	PL3	PL4
Eluent→	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5)	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (80:20)	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (50:50)	MeOH
Eluat→	DPG + PA	PE + PS	PI + PC	SM + IyPC

## F 4.3 Gewinnung und Derivatisierung der Fettsäuren

Von den intakten Lipiden werden in den nächsten Schritten die Fettsäuren abhydrolysiert und derivatisiert. Die Derivatisierung ist für die GC/MS-Messung nötig, um Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den polaren Carboxylgruppen untereinander zu verhindern und die Fettsäuren damit volatiler zu machen.

Im Falle der Methanolyse geschieht die Hydrolyse und Derivatisierung (Methylierung) in einer Reaktion. Im Allgemeinen war die einfache Methylierung der Säuregruppe ausreichend für die Messungen. Um zusätzlich genauere Informationen über die Abzweigposition der Methylgruppe(n) in MBFA zu erlangen, wurden Pyrrolidin- und Picolinyl-Derivate erzeugt und mit GC/MS gemessen.



### F 4.3.1 Milde alkalische Methanolyse zu FAME

Diese Methode eignet sich für die Methanolyse *O*-Acyl-gebundener Fettsäure. FFA werden normalerweise nicht umgewandelt, ebenso wenig wie Sphingolipide und Etherlipide.<sup>[217]</sup> Sie ist, neben der Auftrennung der Lipide in drei Fraktionen (F 4.2), Bestandteil der PLFA-Methode.

Die Lipide, bzw. Lipid-Fraktionen (max. ~20 mg) wurden in 1 mL trockenem (wichtig!) MeOH aufgenommen. Für die bessere Lösung der unpolaren Lipide (z. B. Cholesterin, TAG) wurden einige Tropfen MTBE dazugegeben. Dazu wurde 1 mL 0,4 M KOH in trockenem MeOH aufgelöst. Die Lösung wurde stets frisch angesetzt. Nach Vortexen wurden die fest geschlossenen Schraubdeckelgläschen für 30-45 min bei 60 °C inkubiert. Parafilm zum Versiegeln der Röhren war hilfreich. Nach dem Abkühlen auf RT wurden 200 µL MeOH/Eisessig (9:1) hinzugefügt. Die FAME wurden nach Waschen mit 5 mL H<sub>2</sub>O entweder 2-mal mit 3-5 mL Hexan, Hexan/Diethylether (95:5), oder Hexan/MTBE (1/1) extrahiert. Zum Schluss wurden die FAME mittels Passage einer kleinen Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Säule (~3 cm trockenes Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in normaler Pasteurpipette, mit etwas Glaswolle gestopft) getrocknet und unter N<sub>2</sub> eingedampft.

### F 4.3.2 saure Transmethylierung/Methylierung zu FAME

Sowohl Freie Fettsäuren, als auch *O*-Acyl- und *N*-Acyl-gebundene Fettsäuren werden mit dieser Methode methyliert, bzw. transmethyliert.

#### Lipide/Lipidfraktionen

Die saure Transmethylierung der Lipide, bzw. NL, GL und PL Fraktionen wurde wie folgt durchgeführt: zu den getrockneten Proben in 15 mL Schraubdeckelgläschen wurden ein paar Tropfen MTBE gegeben und dann 1 mL (bei mehr als 10 mg Lipid wurden 2 mL genommen) 1,25 M HCl in MeOH (Sigma) hinzugefügt. Das geschah unter leichtem N<sub>2</sub> Strom, um möglichst wenig Wasser anwesend zu haben. Die fest geschlossenen, mit Parafilm abgedichteten Gläschen, wurden ü/N bei 50 °C im Trockenschrank inkubiert. Um die FAME aufzureinigen wurden sie vor der Extraktion zusätzlich über eine Silica Gel Säule (1 g Unisil, 10 mL 0,02 M NH<sub>4</sub>-Acetat in MeOH gegeben. Extrahiert wurde genauso wie nach der alkalischen Methanolyse (F 4.3.1).

### **Methanol/Wasser-Phasen**

Für die Methylierung der möglicherweise noch enthaltenen FFA wurden generell die MeOH/H<sub>2</sub>O (M/H) Phasen der Bligh & Dyer Extraktion nachbehandelt. Sie bestehen zu ~53% aus Methanol. Hierzu wurde den Phasen 1/10 ihres Volumens konzentrierte HCl (37%) hinzugefügt (Endkonz. ~1,2 M) und 1 h refluxiert oder (bei kleinem Volumen) in dicht verschlossenen Spitzkolben oder Schraubdeckelgläschen bei 50 °C ü/N inkubiert. Die FAME wurden dann wie nach der alkalischen Methylierung (F 4.3.1) extrahiert und entwässert. Resultate waren die Proben der FAME der M/H-Phasen der Gesamtlipide (=LM/H). Auch die M/H-Phasen, die nach der FAME-Extraktion der alkalischen Methanolyse anfielen wurden auf die gleiche Weise zusätzlich sauer methyliert, um vor allem die nicht *O*-Ester-gebundenen Fettsäuren auch zu erfassen. Daraus resultierten die Proben der M/H-Phasen der Phospholipide (=PLM/H) und der Sphingolipide/lysoPC (=smM/H).

#### **F 4.3.3 Pyrrolidide**

Die Pyrrolidin-Derivate der Fettsäuren wurden direkt aus den FAME gewonnen.<sup>[217, 253]</sup> Dazu wurden 1 mL (2 mL bei mehr als 10 mg FAME) Pyrrolidin und 100 µL Eisessig (200 µL bei 2 mL) zu den getrockneten FAME hinzugefügt. Die fest verschlossenen, mit Parafilm abgedichteten, 15 mL-Schraubdeckelgläschen wurden für mindestens 1 h bei 100 °C im Trockenschrank inkubiert. Die Pyrrolidide wurden mit 8 mL Hexan/Diethylether (1:1) gegen 3-mal 4 mL H<sub>2</sub>O extrahiert (Wasser ist die untere Phase) und über eine Silica Gel Säule gegeben (F 4.3.1).

Die Pyrrolidide der Fettsäuren waren im Vergleich zu den Picolinylestern einfacher herzustellen und die Verluste an Intensität gegenüber den FAME waren geringer. Dennoch konnten gegenüber der standardmäßigen Methylierung nur ungefähr die Hälfte der Peaks mit diesen speziellen Derivatisierungsmethoden erkannt werden, bei den Picolinylestern waren es nur ungefähr 20%.

#### **F 4.3.4 Picolinylester**

Die Picolinylester wurden meist nach der Methode von Destailats und Angers dargestellt,<sup>[324]</sup> die eine Umesterung der FAME bedeutet. Hiernach wurden in einem separaten Schraubdeckelgläschen mittels Pasteurpipette zu zwei Teilen 3-pyridinmethanol ein Teil Kalium-*tert*-butoxid (1,0 M in THF) gegeben und

gemischt. Von dieser Mischung wurden mit der Pasteurpipette ~300  $\mu\text{L}$  zu der Probe (max. 10 mg FAME in 1 mL DCM oder  $\text{CHCl}_3$ ) gegeben. Die fest verschlossenen Schraubdeckelgläschen wurden für 30-45 min in den Trockenschrank bei 50 °C gestellt. Nach Abkühlung auf RT wurden 3 mL 2,5%-ige  $\text{NaHCO}_3$  Lösung hinzugefügt und die untere Phase durch ein  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  Säulchen in ein neues Schraubdeckelgläschen gegeben. Es durfte nichts Bräunliches überführt werden. Nun wurden die restlichen Picolinyester aus dem ersten Gläschen mit 2 mL Hexan extrahiert und die obere Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in dasselbe neue Röhrchen gegeben. Der Inhalt des ersten Röhrchens wurde wieder mit 2 mL Hexan gegen 1 mL 2,5%-ige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung extrahiert und die obere Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  Säulchen zu dem Schraubdeckelgläschen gegeben, das die kombinierten Extrakte enthielt. Zum Schluss wurde unter leichtem  $\text{N}_2$ -Strom abgedampft und bei -20 °C gelagert.

#### **F 4.3.5 Hydrolyse der Fettsäuren mit KOH**

Die Fettsäuren, die noch an Enzymen gebunden waren wurden von diesen mittels KOH abhydrolysiert und anschließend methyliert. Dazu wurden die mit TCA (F 3.1.5) gefällten Proteine in 2 mL 2 M Tris-Base gelöst und 2 mL 1 M KOH-Lösung dazugegeben. Die Mischung wurde 45 min bei 65 °C in fest geschlossenen Schraubdeckelgläschen inkubiert. Nach Abkühlung wurden 2 mL 2 M HCl-Lösung hinzugefügt und mittels Indikatorpapier geprüft, ob der pH-Wert im Sauren lag. Dann wurden die Fettsäuren 3-mal mit 5 mL Isohexan/Diethylether (1/1) extrahiert (obere Phase), über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter  $\text{N}_2$  eingedampft. Die wässrige Phase (7 mL) wurde in ein neues Schraubdeckelgläschen überführt und 70  $\mu\text{L}$  Hydroxylamin dazugegeben, das selektiv Thioester spaltet und evtl. nicht erfasste Fettsäure noch hydrolysieren soll. Nach 1 h bei 37 °C wurde mit 5 mL Isohexan/Diethylether (1/1) extrahiert (obere Phase), über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter  $\text{N}_2$  eingedampft. Das Ergebnis - die hydrolysierten Fettsäuren in getrocknetem Zustand - wurde für die GC/MS Messung sauer methyliert: hierzu wurden unter  $\text{N}_2$ -Strom 1,5 mL 1,2 M HCl in MeOH dazugegeben und ü/N bei 50 °C inkubiert. Die Aufreinigung der FAME erfolgte wie unter F 4.3.1 beschrieben, bzw. es wurde meistens im Anschluss die Harnstofffraktionierung durchgeführt (siehe folgender Abschnitt).

#### F 4.4 Harnstofffraktionierung

Zur Anreicherung der FAME mit Methylverzweigung und/oder Doppelbindung(en) gegenüber den geradkettigen FAME wurde die Harnstofffraktionierung angewendet.<sup>[217, 325]</sup> Dies konnte günstigerweise gleich im Anschluss an eine Methylierung geschehen, dann wurde 1-mal Extrahieren und Abdampfen eingespart.

Es wurden 15 mL Schraubdeckelgläschen mit 1,5 g Harnstoff vorbereitet, wobei der Harnstoff durch 15 Tropfen MeOH angefeuchtet wurde. Zu 1,5 ml FAME in HCl/MeOH wurden 5 mL Hexan hinzugefügt und die FAME (obere Phase) in die vorbereiteten Schraubdeckelgläschen mit Harnstoff überführt und kräftig gevortext. Die Röhrchen wurden ü/N bei RT stehen gelassen. Dann wurden noch einmal 5 mL Hexan hinzugefügt (meist eine Re-Extraktion oder die erste Extraktion einer Doppelprobe) und kräftig gevortext. Nochmals wurde das Röhrchen ü/N stehen gelassen. Zum Schluss wurden die Harnstoffkristalle mit insgesamt 20 mL Hexan gespült/extrahiert und über eine Silica-Gel-Säule (0,5 g Unisil) gereinigt und unter leichtem N<sub>2</sub>-Strom eingedampft.

#### F 4.5 MIDI Protokoll

Zur einfachen und schnellen Erstellung eines Fettsäureprofils von *E. coli* und damit zum Test, ob MBFA produziert wurden, wurde das MIDI Protokoll angewendet, das in der Literatur von Sasser sehr gut beschrieben wurde.<sup>[326]</sup> Im Kern ist es eine Hydrolyse der Lipide (ohne vorherige Extraktion) mit anschließender saurer Methylierung der Fettsäuren, FAME-Extraktion und Reinigung. Die Extraktion erfolgte entweder ausgehend von der LB-Agarplatte (24 h bei 30 °C) oder von einer 10 mL LB-Flüssigkultur.

Um die Sensitivität der Methode zu erhöhen und um den internen Standard (analog zur PLFA) hinzufügen zu können, wurde die Methode leicht abgewandelt: Die FAME wurden nach der Extraktion nicht nur gewaschen, sondern über eine Silica-Gel-Säule (0,5 g Unisil) gereinigt und unter leichtem N<sub>2</sub>-Strom eingedampft. Die Messung mit GC/MS erfolgte dann genauso, wie die der anderen FAME-Proben auch (F 4.6).

#### **F 4.6 Messung mit GC/MS**

Die abgedampften Proben wurden in Hexan gelöst (meist 200 - 500  $\mu\text{L}$ ), wobei ein interner Standard im Hexan enthalten war. Der Standard war 19:0 FAME in einer Endkonzentration von 32  $\mu\text{M}$ . Hierzu wurde eine Stammlösung (die bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde) erstellt, die 100 mg 19:0 FAME in 100 mL Hexan enthielt. Die Arbeitslösung enthielt dann 100  $\mu\text{L}$  Stammlösung in 9,9 mL Hexan. Somit waren in 500  $\mu\text{L}$  in Hexan gelöster Probe 5 ng 19:0 FAME enthalten, was 32  $\mu\text{M}$  entspricht.

Die GC/MS-Messungen wurden auf dem Gerät QP2010 der Firma Shimadzu durchgeführt. Die Säule war die HP-1 (30 m, 0,25 mm  $\varnothing$ , 0,25  $\mu\text{m}$  Schichtdicke, Fa. Agilent), das Trägergas war Helium. Das Temperaturprogramm (Methode Piel 1) war wie folgt: Start  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dann mit  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  bis auf  $290\text{ }^{\circ}\text{C}$  heizen, dann 15 min bei  $290\text{ }^{\circ}\text{C}$  halten. Im Falle der Picolinylester und Pyrrolidide wurde die Haltezeit von 15 min auf 25 min verlängert (Methode Piel2).

## F 5 Genanalysen und Stammbäume

Die Nukleotidsequenzen des *sup*-Clusters, sowie Sequenzen des Genoms eines Poribakteriums wurden *in silico* analysiert. Im Folgenden werden die Herkunft der Poribakterium-Sequenzen, sowie die zur Analyse verwandte Software beschrieben.

### F 5.1 Genomanalyse eines Poribakteriums

Die Arbeiten zur Genomanalyse wurden im Wesentlichen im Labor von Ute Hentschel (Uni Würzburg) geleistet.<sup>[11]</sup> Kurz gefasst, wurden aus dem marinen Schwamm *A. aerophoba* (Verongida, Aplysinidae) durch differentielles Zentrifugieren die Schwammassozierten Prokaryoten (SAP) gewonnen und einer Einzelzellsortierung mittels Durchflusszytometrie unterzogen. Von einer daraus resultierenden einzelnen Poribakterienzelle wurde mittels WGA-Technik (unter Verwendung der phi29 Polymerase) das gesamte Genom amplifiziert. Die amplifizierte DNA wurde pyrosequenziert und mit der 454-Methode assembliert.<sup>[11]</sup> Der Anteil der vorliegenden Arbeit bestand in der manuellen Annotierung der Sequenzen, die mutmaßlich zum Sekundärmetabolismus gehörten.

### F 5.2 Verwendete Software

Die Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe der Programme EditSeq und GeneQuest (DNASTAR, Lasergene) erfasst und translatiert. Die resultierenden AS-Sequenzen wurden mit BLAST ("blastp", Version 2.2.22+, online, NCBI, nr-database,<sup>[327]</sup>) auf Homologien hin untersucht. Für Alinierungen wurden die Sequenzen in BioEdit importiert und mit dem integrierten ClustalW aliniert. Die daraus resultierenden FASTA-Dateien wurden in ClustalX2 ([www.igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/](http://www.igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/))<sup>[328]</sup> geöffnet und Bootstrap N-J Stammbäume erstellt (Phylip Format 111 Replikate, 1000 Bootstraps), die mit dem Programm TreeView ([www.taxonomy.zoology.gla.ac.uk](http://www.taxonomy.zoology.gla.ac.uk)) visualisiert werden konnten.

### F 5.3 Zugriffsnummern der *sup*-Cluster-Sequenzen

Die Sequenzen des Poribakteriums sind bei GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) unter den Nummern ADFK00000000 und ADFK01000000 hinterlegt worden. Die Sequenzen der *sup*-Cluster sind bei GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) unter den Zugriffsnummern DQ438986 (pAE27P20), DQ438987 (pAPKS18), FJ560486.1 (1k6), DQ438988 (pSW1H8), DQ228487 (2063G) und AY907537 (SA1) zu finden.

## G LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L. Fieseler, U. Hentschel, L. Grozdanov, A. Schirmer, G. Wen, M. Platzer, S. Hrvatin, D. Butzke, K. Zimmermann, J. Piel, *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73*, 2144.
- [2] T. Hochmuth, J. Piel, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1841.
- [3] L. Betancor, M. J. Fernandez, K. J. Weissman, P. F. Leadlay, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2962.
- [4] D. E. Cane, *J Biol Chem* **2010**.
- [5] A. Y. Chen, N. A. Schnarr, C. Y. Kim, D. E. Cane, C. Khosla, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 3067.
- [6] K. M. Fisch, C. Gurgui, N. Heycke, S. A. van der Sar, S. A. Anderson, V. L. Webb, S. Taudien, M. Platzer, B. K. Rubio, S. J. Robinson, P. Crews, J. Piel, *Nat Chem Biol* **2009**, *5*, 494.
- [7] J. Piel, *Nat Prod Rep* **2010**, *27*, 996.
- [8] A. B. Friedrich, H. Merkert, T. Fendert, J. Hacker, P. Proksch, U. Hentschel, *Mar Biol* **1999**, *134*, 461.
- [9] M. Laroche, C. Imperatore, L. Grozdanov, V. Costantino, A. Mangoni, U. Hentschel, E. Fattorusso, *Mar Biol* **2007**, *151*, 1365.
- [10] J. F. Rontani, N. Zabeti, C. Aubert, *J Am Soc Mass Spectrom* **2009**, *20*, 1997.
- [11] A. Siegl, J. Kamke, T. Hochmuth, J. Piel, M. Richter, C. Liang, T. Dandekar, U. Hentschel, *ISME J* **2010**, *5*, 61.
- [12] T. Hochmuth, H. Niederkrüger, C. Gernert, A. Siegl, S. Taudien, M. Platzer, P. Crews, U. Hentschel, J. Piel, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2572.
- [13] T. K. Kim, J. A. Fuerst, *Environ Microbiol* **2006**, *8*, 1460.
- [14] A. Siegl, U. Hentschel, *Environ Microbiol Rep* **2010**, *2*, 507.
- [15] A. Schirmer, R. Gadkari, C. D. Reeves, F. Ibrahim, E. F. DeLong, C. R. Hutchinson, *Appl Environ Microbiol* **2005**, *71*, 4840.
- [16] M. S. Butler, *J Nat Prod* **2004**, *67*, 2141.
- [17] M. S. Rappé, S. J. Giovannoni, *Ann Rev Microbiol* **2003**, *57*, 369.
- [18] B. J. Rawlings, *Nat Prod Rep* **1999**, *16*, 425.
- [19] E. Zazopoulos, K. Huang, A. Staffa, W. Liu, B. O. Bachmann, K. Nonaka, J. Ahlert, J. S. Thorson, B. Shen, C. M. Farnet, *Nat Biotechnol* **2003**, *21*, 187.
- [20] M. Namikoshi, K. L. Rinehart, *J Ind Microbiol Biot* **1996**, *17*, 373.
- [21] D. J. Edwards, B. L. Marquez, L. M. Nogle, K. McPhail, D. E. Goeger, M. A. Roberts, W. H. Gerwick, *Chem Biol* **2004**, *11*, 817.
- [22] J. W. Blunt, B. R. Copp, W. P. Hu, M. H. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep, *Nat Prod Rep* **2008**, *25*, 35.
- [23] R. A. Hill, *Annu Rep Section "B" (Organic Chemistry)* **2007**, *103*, 125.
- [24] S. P. Gunasekera, G. K. Paul, R. E. Longley, R. A. Isbrucker, S. A. Pomponi, *J Nat Prod* **2002**, *65*, 1643.
- [25] U. Hentschel, K. M. Usher, M. W. Taylor, *FEMS Microbiol Ecol* **2006**, *55*, 167.
- [26] U. Hentschel, J. Hopke, M. Horn, A. B. Friedrich, M. Wagner, J. Hacker, B. S. Moore, *Appl Environ Microbiol* **2002**, *68*, 4431.
- [27] J. Piel, in *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology, Vol. 2* (Eds.: L. Mander, H.-W. Lui), Elsevier, Oxford, **2010**, pp. 475.
- [28] P. Proksch, R. A. Edrada, R. Ebel, *Appl Microbiol Biotechnol* **2002**, *59*, 125.
- [29] A. M. S. Mayer, K. B. Glaser, C. Cuevas, R. S. Jacobs, W. Kem, R. D. Little, J. M. McIntosh, D. J. Newman, B. C. Potts, D. E. Shuster, *Trends Pharmacol Sci* **2010**, *31*, 255.
- [30] A. M. S. Mayer, **2011**.
- [31] W. Bergmann, R. J. Feeney, *J Am Chem Soc* **1950**, *72*, 2809.
- [32] W. Bergmann, R. J. Feeney, *J Org Chem* **1951**, *16*, 981.
- [33] J.-P. Bingham, E. Mitsunaga, Z. L. Bergeron, *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *183*, 1.

- [34] J. D. Scott, R. M. Williams, *Chem Rev* **2002**, *102*, 1669.
- [35] K. L. Jackson, J. A. Henderson, A. J. Phillips, *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 3044.
- [36] T. R. Thomas, D. P. Kavlekar, P. A. LokaBharathi, *Mar Drugs* **2010**, *8*, 1417.
- [37] D. J. Faulkner, *Nat Prod Rep* **2002**, *19*, 1.
- [38] K. R. Watts, K. Tenney, P. Crews, *Curr Opin Biotechnol* **2010**, *21*, 808.
- [39] K. H. Sharp, S. K. Davidson, M. G. Haygood, *ISME J* **2007**, *1*, 693.
- [40] A. E. Trindade-Silva, G. E. Lim-Fong, K. H. Sharp, M. G. Haygood, *Curr Opin Biotechnol* **2010**, *21*, 834.
- [41] S. K. Davidson, S. W. Allen, G. E. Lim, C. M. Anderson, M. G. Haygood, *Appl Environ Microbiol* **2001**, *67*, 4531.
- [42] S. Sudek, N. B. Lopanik, L. E. Waggoner, M. Hildebrand, C. Anderson, H. Liu, A. Patel, D. H. Sherman, M. G. Haygood, *J Nat Prod* **2007**, *70*, 67.
- [43] W. Fenical, P. R. Jensen, M. A. Palladino, K. S. Lam, G. K. Lloyd, B. C. Potts, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 2175.
- [44] V. A. Klenchin, R. King, J. Tanaka, G. Marriott, I. Rayment, *Chem Biol* **2005**, *12*, 287.
- [45] D. R. Terry, I. Spector, T. Higa, M. R. Bubb, *J Biol Chem* **1997**, *272*, 7841.
- [46] C. A. Bewley, N. D. Holland, D. J. Faulkner, *Cell Mol Life Sci* **1996**, *52*, 716.
- [47] E. H. Andrianasolo, H. Groß, D. Goeger, M. Musafija-Girt, K. McPhail, R. M. Leal, S. L. Mooberry, W. H. Gerwick, *Org Lett* **2005**, *7*, 1375.
- [48] C. Fattorusso, G. Campiani, B. Catalanotti, M. Persico, N. Basilico, S. Parapini, D. Taramelli, C. Campagnuolo, E. Fattorusso, A. Romano, O. Tagliatalata-Scafati, *J Med Chem* **2006**, *49*, 7088.
- [49] J. Wang, B. Zhao, W. Zhang, X. Wu, R. Wang, Y. Huang, D. Chen, K. Park, B. C. Weimer, Y. Shen, *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 7054.
- [50] E. Quinoa, Y. Kakou, P. Crews, *J Org Chem* **1988**, *53*, 3642.
- [51] T. A. Johnson, K. Tenney, R. H. Cichewicz, B. I. Morinaka, K. N. White, T. Amagata, B. Subramanian, J. Media, S. L. Mooberry, F. A. Valeriote, P. Crews, *J Med Chem* **2007**, *50*, 3795.
- [52] Y. Kakou, P. Crews, G. J. Bakus, *J Nat Prod* **1987**, *50*, 482.
- [53] P. Crews, Y. Kakou, E. Quinoa, *J Am Chem Soc* **1988**, *110*, 4365.
- [54] S. Faivre, S. Chièze, C. Delbaldo, N. Ady-vago, C. Guzman, L. Lopez-Lazaro, S. Lozahic, J. Jimeno, F. Pico, J. P. Armand, J. A. L. Martin, E. Raymond, *J Clin Oncol* **2005**, *23*, 7871.
- [55] M. T. Hamann, P. J. Scheuer, *J Am Chem Soc* **1993**, *115*, 5825.
- [56] R. Talpir, Y. Benayahu, Y. Kashman, L. Pannell, M. Schleyer, *Tetrahedron Lett* **1994**, *35*, 4453.
- [57] E. W. Schmidt, C. A. Bewley, D. J. Faulkner, *J Org Chem* **1998**, *63*, 1254.
- [58] E. W. Schmidt, A. Y. Obratsova, S. K. Davidson, D. J. Faulkner, M. G. Haygood, *Mar Biol* **2000**, *136*, 969.
- [59] S. Matsunaga, N. Fusetani, K. Hashimoto, M. Walchli, *J Am Chem Soc* **1989**, *111*, 2582.
- [60] T. Araki, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Biosci Biotech Bioch* **2005**, *69*, 1318.
- [61] A. Plaza, G. Bifulco, M. Masullo, J. R. Lloyd, J. L. Keffer, P. L. Colin, J. N. A. Hooper, L. J. Bell, C. A. Bewley, *J Org Chem* **2010**, *75*, 4344.
- [62] E. W. Schmidt, J. T. Nelson, D. A. Rasko, S. Sudek, J. A. Eisen, M. G. Haygood, J. Ravel, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 7315.
- [63] H. Greve, I. Mohamed, A. Pontius, S. Kehraus, H. Groß, G. König, *Phytochemistry Reviews* **2010**, *9*, 537.
- [64] R. A. Edrada, P. Proksch, V. Wray, L. Witte, W. E. G. Müller, R. W. M. Van Soest, *J Nat Prod* **1996**, *59*, 1056.
- [65] M. Yousaf, K. A. El Sayed, K. V. Rao, C. W. Lim, J.-F. Hu, M. Kelly, S. G. Franzblau, F. Zhang, O. Peraud, R. T. Hill, M. T. Hamann, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7397.
- [66] O. Peraud, Dissertation thesis, University of Maryland (College Park), **2006**.



- [67] L. D. Mydlarz, R. S. Jacobs, J. Boehnlein, R. G. Kerr, *Chem Biol* **2003**, *10*, 1051.
- [68] D. Newman, R. Hill, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2006**, *33*, 539.
- [69] M. Amigo, M. Paya, S. De Rosa, M. C. Terencio, *Br J Pharmacol* **2007**, *152*, 353.
- [70] M. Amigo, J. Schalkwijk, D. Olthuis, S. De Rosa, M. Paya, M. C. Terencio, E. Lamme, *Life Sci* **2006**, *79*, 2395.
- [71] S. Matsunaga, N. Fusetani, Y. Kato, H. Hirota, *J Am Chem Soc* **1991**, *113*, 9690.
- [72] J. J. Banik, S. F. Brady, *Curr Opin Microbiol* **2010**, *13*, 603.
- [73] J. Kennedy, J. Marchesi, A. Dobson, *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, *75*, 11.
- [74] B. A. Pfeifer, C. Khosla, *Microbiol Mol Biol Rev* **2001**, *65*, 106.
- [75] L. E. N. Quadri, P. H. Weinreb, M. Lei, M. M. Nakano, P. Zuber, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1998**, *37*, 1585.
- [76] X. Gao, P. Wang, Y. Tang, *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, *88*, 1233.
- [77] A. Li, J. Piel, *Chem Biol* **2002**, *9*, 1017.
- [78] W. E. G. Müller, V. A. Grebenjuk, G. Le Pennec, H.-C. Schröder, F. Brümmer, U. Hentschel, I. M. Müller, H.-J. Breter, *Mar Biotechnol* **2004**, *6*, 105.
- [79] F. Brümmer, M. Nickel, Universitätsbibliothek der Universität Stuttgart, Stuttgart, **2003**.
- [80] D. Schwarzer, M. A. Marahiel, *Naturwissenschaften* **2001**, *88*, 93.
- [81] C. Calestani, J. P. Rast, E. H. Davidson, *Development* **2003**, *130*, 4587.
- [82] J. J. Thelen, J. B. Ohlrogge, *Metab Eng* **2002**, *4*, 12.
- [83] L. Zhang, A. K. Joshi, S. Smith, *J Biol Chem* **2003**, *278*, 40067.
- [84] J. K. Hiltunen, F. Okubo, V. A. Kursu, K. J. Autio, A. J. Kastaniotis, *Biochem Soc Trans* **2005**, *33*, 1162.
- [85] E. Schweizer, J. Hofmann, *Microbiol Mol Biol Rev* **2004**, *68*, 501.
- [86] S. W. White, J. Zheng, Y. M. Zhang, Rock, *Annu Rev Biochem* **2005**, *74*, 791.
- [87] C. Hertweck, *Angew Chem* **2009**, *121*, 4782.
- [88] C. Hertweck, A. Luzhetskyy, Y. Rebets, A. Bechthold, *Nat Prod Rep* **2007**, *24*, 162.
- [89] M. B. Austin, J. P. Noel, *Nat Prod Rep* **2003**, *20*, 79.
- [90] I. Abe, H. Morita, *Nat Prod Rep* **2010**, *27*, 809.
- [91] E. S. Sattely, M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Nat Prod Rep* **2008**, *25*, 757.
- [92] F. Kopp, M. A. Marahiel, *Nat Prod Rep* **2007**, *24*, 735.
- [93] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat Prod Rep* **2001**, *18*, 380.
- [94] B. S. Moore, C. Hertweck, *Nat Prod Rep* **2002**, *19*, 70.
- [95] T. Chopra, S. Banerjee, S. Gupta, G. Yadav, S. Anand, A. Surolia, R. P. Roy, D. Mohanty, R. S. Gokhale, *PLoS Biol* **2008**, *6*, e163.
- [96] N. B. Lopanik, J. A. Shields, T. J. Buchholz, C. M. Rath, J. Hothersall, M. G. Haygood, K. Håkansson, C. M. Thomas, D. H. Sherman, *Chem Biol* **2008**, *15*, 1175.
- [97] S. Smith, S. C. Tsai, *Nat Prod Rep* **2007**, *24*, 1041.
- [98] R. J. Heath, C. O. Rock, *Natural Product Reports* **2002**, *19*, 581.
- [99] T. Nguyen, K. Ishida, H. Jenke-Kodama, E. Dittmann, C. Gurgui, T. Hochmuth, S. Taudien, M. Platzer, C. Hertweck, J. Piel, *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 225.
- [100] S. J. Kakavas, L. Katz, D. Stassi, *J Bacteriol* **1997**, *179*, 7515.
- [101] D. A. Hopwood, *Complex enzymes in microbial natural product biosynthesis: Polyketides, aminocoumarins and carbohydrates*, Academic Press, **2009**.
- [102] Y. Tang, C. Y. Kim, Mathews, II, D. E. Cane, C. Khosla, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 11124.
- [103] H. M. O'Hare, A. Baerga-Ortiz, B. Popovic, J. B. Spencer, P. F. Leadlay, *Chem Biol* **2006**, *13*, 287.
- [104] U. Oppermann, C. Filling, M. Hult, N. Shafqat, X. Wu, M. Lindh, J. Shafqat, E. Nordling, Y. Kallberg, B. Persson, H. Jörnvall, *Chemico-Biological Interactions* **2003**, *143-144*, 247.
- [105] D. H. Kwan, P. F. Leadlay, *ACS Chem Biol* **2010**, *5*, 829.

- [106] J. Schümann, C. Hertweck, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 9564.
- [107] G. Zhu, Y. Li, X. Cai, J. J. Millership, M. J. Marchewka, J. S. Keithly, *Mol Biochem Parasitol* **2004**, *134*, 127.
- [108] R. H. Lambalot, A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, C. T. Walsh, *Chem Biol* **1996**, *3*, 923.
- [109] X. Cai, D. Herschap, G. Zhu, *Eukaryot Cell* **2005**, *4*, 1211.
- [110] H. D. Mootz, K. Schorgendorfer, M. A. Marahiel, *FEMS Microbiol Lett* **2002**, *213*, 51.
- [111] C. Sanchez, L. Du, D. J. Edwards, M. D. Toney, B. Shen, *Chem Biol* **2001**, *8*, 725.
- [112] B. Shen, L. Du, C. Sanchez, D. J. Edwards, M. Chen, J. M. Murrell, *J Ind Microbiol Biot* **2001**, *27*, 378.
- [113] H. Jenke-Kodama, E. Dittmann, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1858.
- [114] S. Kapur, A. Y. Chen, D. E. Cane, C. Khosla, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 22066.
- [115] T. Maier, M. Leibundgut, N. Ban, *Science* **2008**, *321*, 1315.
- [116] M. Leibundgut, T. Maier, S. Jenni, N. Ban, *Curr Opin Struct Biol* **2008**, *18*, 714.
- [117] S. Jenni, M. Leibundgut, T. Maier, N. Ban, *Science* **2006**, *311*, 1263.
- [118] I. B. Lomakin, Y. Xiong, T. A. Steitz, *Cell* **2007**, *129*, 319.
- [119] J. He, C. Hertweck, *Chem Biol* **2003**, *10*, 1225.
- [120] S. C. Wenzel, F. Gross, Y. Zhang, J. Fu, A. F. Stewart, R. Müller, *Chem Biol* **2005**, *12*, 349.
- [121] H. Jenke-Kodama, R. Müller, E. Dittmann, *Evolutionary mechanisms underlying secondary metabolite diversity.*, Vol. 65, Birkhäuser, **2008**.
- [122] S. Kroken, N. L. Glass, J. W. Taylor, O. C. Yoder, B. G. Turgeon, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 15670.
- [123] T. A. Castoe, T. Stephens, B. P. Noonan, C. Calestani, *Gene* **2007**, *392*, 47.
- [124] I. Fujii, N. Yoshida, S. Shimomaki, H. Oikawa, Y. Ebizuka, *Chem Biol* **2005**, *12*, 1301.
- [125] J. B. Spencer, P. M. Jordan, *Biochem J* **1992**, *288* 839.
- [126] L. Shao, X. D. Qu, X. Y. Jia, Q. F. Zhao, Z. H. Tian, M. Wang, G. L. Tang, W. Liu, *Biochem Bioph Res Co* **2006**, *345*, 133.
- [127] S. Gaisser, A. Trefzer, S. Stockert, A. Kirschning, A. Bechthold, *J Bacteriol* **1997**, *179*, 6271.
- [128] R. Boll, C. Hofmann, B. Heitmann, G. Hauser, S. Glaser, T. Koslowski, T. Friedrich, A. Bechthold, *J Biol Chem* **2006**, *281*, 14756.
- [129] J. M. Crawford, B. C. Dancy, E. A. Hill, D. W. Udvary, C. A. Townsend, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 16728.
- [130] J. M. Crawford, C. A. Townsend, *Nat Rev Microbiol* **2010**, *8*, 879.
- [131] K. C. Onwueme, C. J. Vos, J. Zurita, J. A. Ferreras, L. E. Quadri, *Prog Lipid Res* **2005**, *44*, 259.
- [132] K. C. Onwueme, J. A. Ferreras, J. Buglino, C. D. Lima, L. E. Quadri, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 4608.
- [133] O. A. Trivedi, P. Arora, A. Vats, M. Z. Ansari, R. Tickoo, V. Sridharan, D. Mohanty, R. S. Gokhale, *Mol Cell* **2005**, *17*, 631.
- [134] S. T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, B. G. Barrell, *Nature* **1998**, *393*, 537.
- [135] R. S. Gokhale, P. Saxena, T. Chopra, D. Mohanty, *Nat Prod Rep* **2007**, *24*, 267.
- [136] D. E. Minnikin, L. Kremer, L. G. Dover, G. S. Besra, *Chem Biol* **2002**, *9*, 545.
- [137] T. D. Sirakova, A. K. Thirumala, V. S. Dubey, H. Sprecher, P. E. Kolattukudy, *J Biol Chem* **2001**, *276*, 16833.

- [138] I. Matsunaga, A. Bhatt, D. C. Young, T. Y. Cheng, S. J. Eyles, G. S. Besra, V. Briken, S. A. Porcelli, C. E. Costello, W. R. Jacobs, Jr., D. B. Moody, *J Exp Med* **2004**, *200*, 1559.
- [139] X. Chen, Z. F. Guo, P. M. Lai, K. H. Sze, Z. Guo, *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, *49*, 7926.
- [140] J. Ahlert, E. Shepard, N. Lomovskaya, E. Zazopoulos, A. Staffa, B. O. Bachmann, K. Huang, L. Fonstein, A. Czisny, R. E. Whitwam, C. M. Farnet, J. S. Thorson, *Science* **2002**, *297*, 1173.
- [141] V. S. Rangan, S. Smith, *Chapter 6: Fatty acid synthesis in Eukaryotes*, 4th ed., Elsevier Science, **2002**.
- [142] K. Takayama, C. Wang, G. S. Besra, *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 81.
- [143] A. Bhatt, V. Molle, G. S. Besra, W. R. Jacobs, Jr., L. Kremer, *Mol Microbiol* **2007**, *64*, 1442.
- [144] S. Donadio, P. Monciardini, M. Sosio, *Nat Prod Rep* **2007**, *24*, 1073.
- [145] J. P. Berge, G. Barnathan, *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2005**, *96*, 49.
- [146] C. N. Shulse, E. E. Allen, *Environ Microbiol* **2011**, *13*, 684.
- [147] J. G. Metz, P. Roessler, D. Facciotti, C. Levering, F. Dittrich, M. Lassner, R. Valentine, K. Lardizabal, F. Domergue, A. Yamada, K. Yazawa, V. Knauf, J. Browse, *Science* **2001**, *293*, 290.
- [148] E. E. Allen, D. H. Bartlett, *Microbiology* **2002**, *148*, 1903.
- [149] A. Hauvermale, J. Kuner, B. Rosenzweig, D. Guerra, S. Diltz, J. G. Metz, *Lipids* **2006**, *41*, 739.
- [150] E. L. Campbell, M. F. Cohen, J. C. Meeks, *Arch Microbiol* **1997**, *167*, 251.
- [151] K. Awai, S. Lechno-Yossef, C. P. Wolk, in *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions* (Eds.: H. Wada, N. Murata), Springer Science, **2009**, pp. 179.
- [152] B. A. Pfeifer, S. J. Admiraal, H. Gramajo, D. E. Cane, C. Khosla, *Science* **2001**, *291*, 1790.
- [153] D. A. Hopwood, *Chem Rev* **1997**, *97*, 2465.
- [154] Y. Q. Cheng, G. L. Tang, B. Shen, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 3149.
- [155] J. Piel, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 14002.
- [156] C. Khosla, Y. Tang, A. Y. Chen, N. A. Schnarr, D. E. Cane, *Ann Rev Biochem* **2007**, *76*, 195.
- [157] C. Scotti, M. Piatti, A. Cuzzoni, P. Perani, A. Tognoni, G. Grandi, A. Galizzi, A. M. Albertini, *Gene* **1993**, *130*, 65.
- [158] X. H. Chen, J. Vater, J. Piel, P. Franke, R. Scholz, K. Schneider, A. Koumoutsis, G. Hitzeroth, N. Grammel, A. W. Strittmatter, G. Gottschalk, R. D. Süßmuth, R. Borriß, *J Bacteriol* **2006**, *188*, 4024.
- [159] C. T. Calderone, D. F. Iwig, P. C. Dorrestein, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *Chem Biol* **2007**, *14*, 835.
- [160] A. K. El-Sayed, J. Hothersall, S. M. Cooper, E. Stephens, T. J. Simpson, C. M. Thomas, *Chem Biol* **2003**, *10*, 419.
- [161] C. P. Ridley, H. Y. Lee, C. Khosla, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 4595.
- [162] T. Weber, K. J. Laiple, E. K. Pross, A. Textor, S. Grond, K. Welzel, S. Pelzer, A. Vente, W. Wohlleben, *Chem Biol* **2008**, *15*, 175.
- [163] N. Pulsawat, S. Kitani, T. Nihira, *Gene* **2007**, *393*, 31.
- [164] R. Teta, M. Gurgui, E. J. N. Helfrich, S. Künne, A. Schneider, G. Van Echten-Deckert, A. Mangoni, J. Piel, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2506.
- [165] H. Irschik, M. Kopp, K. J. Weissman, K. Buntin, J. Piel, R. Müller, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1840.
- [166] J. Moldenhauer, D. C. Götz, C. R. Albert, S. K. Bischof, K. Schneider, R. D. Süßmuth, M. Engeser, H. Groß, G. Bringmann, J. Piel, *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, *49*, 1465.
- [167] J. Moldenhauer, X. H. Chen, R. Borriß, J. Piel, *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, *46*, 8195.
- [168] G.-L. Tang, Y.-Q. Cheng, B. Shen, *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 33.

- [169] Ö. Erol, T. F. Schäberle, A. Schmitz, S. Rachid, C. Gurgui, M. El Omari, F. Lohr, S. Kehraus, J. Piel, R. Müller, G. M. König, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1253.
- [170] S. R. Wesener, V. Y. Potharla, Y.-Q. Cheng, *Appl Environ Microbiol* **2010**, doi:10.1128/AEM.01513.
- [171] I. M. Ehrenreich, J. B. Waterbury, E. A. Webb, *Appl Environ Microbiol* **2005**, *71*, 7401.
- [172] W. Zhang, Z. Li, X. Miao, F. Zhang, *Mar Biotechnol* **2009**, *11*, 346.
- [173] T. Martens, L. Gram, H.-P. Grossart, D. Kessler, R. Müller, M. Simon, S. Wenzel, T. Brinkhoff, *Microb Ecol* **2007**, *54*, 31.
- [174] C.-W. Li, J.-Y. Chen, T.-E. Hua, *Science* **1998**, *279*, 879.
- [175] G. D. Love, E. Grosjean, C. Stalvies, D. A. Fike, J. P. Grotzinger, A. S. Bradley, A. E. Kelly, M. Bhatia, W. Meredith, C. E. Snape, S. A. Bowring, D. J. Condon, R. E. Summons, *Nature* **2009**, *457*, 718.
- [176] A. E. Wright, *Curr Opin Biotechnol* **2010**, *21*, 801.
- [177] R. Wehner, W. Gehring, *Zoologie*, 23 ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1995**.
- [178] J. Piel, *Nat Prod Rep* **2009**, *26*, 338.
- [179] J. Piel, *Curr Med Chem* **2006**, *13*, 39.
- [180] M. W. Taylor, R. Radax, D. Steger, M. Wagner, *Microbiol Mol Biol Rev* **2007**, *71*, 295.
- [181] Y. K. Lee, J.-H. Lee, H. K. Lee, *J Microbiol* **2001**, *39*, 254.
- [182] V. J. Paul, M. P. Puglisi, R. Ritson-Williams, *Nat Prod Rep* **2006**, *23*, 153.
- [183] X. Turon, I. Tarjuelo, M. J. Uriz, *Functional Ecology* **1998**, *12*, 631.
- [184] D. Sipkema, M. C. Franssen, R. Osinga, J. Tramper, R. H. Wijffels, *Mar Biotechnol (NY)* **2005**, *7*, 142.
- [185] V. Thiel, S. C. Neulinger, T. Staufenberg, R. Schmaljohann, J. F. Imhoff, *FEMS Microbiol Ecol* **2007**, *59*, 47.
- [186] N. S. Webster, M. W. Taylor, F. Behnam, S. Lucker, T. Rattei, S. Whalan, M. Horn, M. Wagner, *Environ Microbiol* **2009**.
- [187] M. Bright, S. Bulgheresi, *Nat Rev Microbiol* **2010**, *8*, 218.
- [188] J. Vacelet, C. Donadey, *J Exp Mar Biol Ecol* **1977**, *30*, 301.
- [189] U. Hentschel, L. Fieseler, M. Wehrl, C. Gernert, M. Steinert, J. Hacker, M. Horn, in *Marine Molecular Biotechnology* (Ed.: W. E. G. Müller), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2003**.
- [190] M.-L. Schläppy, S. Schöttner, G. Lavik, M. Kuypers, D. de Beer, F. Hoffmann, *Mar Biol* **2009**, *157*, 593.
- [191] P. Zhu, Q. Li, G. Wang, *Microb Ecol* **2008**, *55*, 406.
- [192] N. S. Webster, R. E. Cobb, A. P. Negri, *ISME J* **2008**, *2*, 830.
- [193] N. S. Webster, M. W. Taylor, F. Behnam, S. Lucker, T. Rattei, S. Whalan, M. Horn, M. Wagner, *Environ Microbiol* **2010**, *12*, 2070.
- [194] N. Webster, S. , M. Taylor, W. , F. Behnam, S. Lucker, T. Rattei, S. Whalan, M. Horn, M. Wagner, *Environmental Microbiology* **2009**, 9999.
- [195] L. Fieseler, M. Horn, M. Wagner, U. Hentschel, *Appl Environ Microbiol* **2004**, *70*, 3724.
- [196] M. Wagner, M. Horn, *Curr Opin Biotechnol* **2006**, *17*, 241.
- [197] N. M. Mohamed, K. Saito, Y. Tal, R. T. Hill, *ISME J* **2009**, *4*, 38.
- [198] S. Schmitt, H. Angermeier, R. Schiller, N. Lindquist, U. Hentschel, *Appl Environ Microbiol* **2008**, AEM.00878.
- [199] M. C. Moffitt, B. A. Neilan, *J Mol Evol* **2003**, *56*, 446.
- [200] A. Ginolhac, C. Jarrin, B. Gillet, P. Robe, P. Pujic, K. Tuphile, H. Bertrand, T. M. Vogel, G. Perriere, P. Simonet, R. Nalin, *Appl Environ Microbiol* **2004**, *70*, 5522.
- [201] J. Piel, D. Hui, N. Fusetani, S. Matsunaga, *Environ Microbiol* **2004**, *6*, 921.
- [202] H. Jenke-Kodama, A. Sandmann, R. Müller, E. Dittmann, *Mol Biol Evol* **2005**, *22*, 2027.
- [203] S. Hrvatin, J. Piel, *J Microbiol Methods* **2007**, *68*, 434.

- [204] A. L. Lane, B. S. Moore, *Nat Prod Rep* **2011**, *28*, 411.
- [205] J. Piel, D. Butzke, N. Fusetani, D. Hui, M. Platzner, G. Wen, S. Matsunaga, *J Nat Prod* **2005**, *68*, 472.
- [206] M. Kador, Dissertation thesis, Universität Bayreuth (Bayreuth), **2007**.
- [207] J. Kobayashi, F. Itagaki, H. Shigemori, T. Sasaki, *J Nat Prod* **1993**, *56*, 976.
- [208] J. Piel, D. Hui, G. Wen, D. Butzke, M. Platzner, N. Fusetani, S. Matsunaga, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 16222.
- [209] R. H. Cichewicz, F. A. Valeriote, P. Crews, *Org Lett* **2004**, *6*, 1951.
- [210] G. R. Pettit, J.-P. Xu, J.-C. Chapuis, R. K. Pettit, L. P. Tackett, D. L. Doubek, J. N. A. Hooper, J. M. Schmidt, *J Med Chem* **2004**, *47*, 1149.
- [211] G. K. Paul, S. P. Gunasekera, R. E. Longley, S. A. Pomponi, *J Nat Prod* **2002**, *65*, 59.
- [212] N. B. Perry, J. W. Blunt, M. H. G. Munro, A. M. Thompson, *J Org Chem* **1990**, *55*, 223.
- [213] J. S. Simpson, M. J. Garson, J. W. Blunt, M. H. G. Munro, J. N. A. Hooper, *J Nat Prod* **2000**, *63*, 704.
- [214] L. M. West, P. T. Northcote, K. A. Hood, J. H. Miller, M. J. Page, *J Nat Prod* **2000**, *63*, 707.
- [215] D. E. Minnikin, L. Kremer, L. G. Dover, G. S. Besra, *Chemistry & Biology* **2002**, *9*, 545.
- [216] M. B. Reed, P. Domenech, C. Manca, H. Su, A. K. Barczak, B. N. Kreiswirth, G. Kaplan, C. E. Barry, *Nature* **2004**, *431*, 84.
- [217] W. W. Christie, *Lipid Analysis, 3rd ed.*, The Oily Press, PJ Barnes & Associates, Bridgewater, England, **2003**.
- [218] T. Kaneda, *Microbiol Rev* **1991**, *55*, 288.
- [219] A. M. Gil-Serrano, I. Gonzalez-Jimenez, P. Tejero-Mateo, M. Megias, M. J. Romero-Vazquez, *J Bacteriol* **1994**, *176*, 2454.
- [220] Y.-L. Lee, J. C. Chen, J.-F. Shaw, *Biochem Bioph Res Co* **1997**, *231*, 452.
- [221] F. Gross, D. Gottschalk, R. Müller, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, *68*, 66.
- [222] J. M. Blatny, T. Brautaset, H. C. Winther-Larsen, P. Karunakaran, S. Valla, *Plasmid* **1997**, *38*, 35.
- [223] A. Mrozik, S. Labuzek, Z. Piotrowska-Seget, *Microbiol Res* **2005**, *160*, 149.
- [224] G. Lackner, A. Schenk, Z. Xu, K. Reinhardt, Z. S. Yunt, J. Piel, C. Hertweck, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 9306.
- [225] T. A. Cropp, A. A. Smogowicz, E. W. Hafner, C. D. Denoya, H. A. McArthur, K. A. Reynolds, *Can J Microbiol* **2000**, *46*, 506.
- [226] E. Radmacher, L. J. Alderwick, G. S. Besra, A. K. Brown, K. J. C. Gibson, H. Sahm, L. Eggeling, *Microbiology* **2005**, *151*, 2421.
- [227] T. Venkova-Canova, M. Patek, J. Nesvera, *J Bacteriol* **2003**, *185*, 2402.
- [228] J. Nesvera, M. Patek, J. Hochmannova, Z. Abrahamova, V. Becvarova, M. Jelinkova, J. Vohradsky, *J Bacteriol* **1997**, *179*, 1525.
- [229] K.-H. Jang, D. Pierotti, G. W. Kemp, G. R. Best, M. L. Britz, *Microbiology* **1997**, *143*, 3209.
- [230] W. Kim, J. J. Lee, S. G. Paik, Y. S. Hong, *J Microbiol Biotechnol* **2010**, *20*, 1484.
- [231] S.-E. Lu, J. Novak, F. W. Austin, G. Gu, D. Ellis, M. Kirk, S. Wilson-Stanford, M. Tonelli, L. Smith, *Biochemistry* **2009**, *48*, 8312.
- [232] F. Ripoll, C. Deshayes, S. Pasek, F. Laval, J.-L. Beretti, F. Biet, J.-L. Risler, M. Daffe, G. Etienne, J.-L. Gaillard, J.-M. Reyrat, *BMC Genomics* **2007**, *8*, 114.
- [233] C. D. Reeves, S. Murli, G. W. Ashley, M. Piagentini, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* **2001**, *40*, 15464.
- [234] H. Petkovic, A. Sandmann, I. R. Challis, H.-J. Hecht, B. Silakowski, L. Low, N. Beeston, E. Kuscer, J. Garcia-Bernardo, P. F. Leadlay, S. G. Kendrew, B. Wilkinson, R. Müller, *Org Biomol Chem* **2008**, *6*, 500.
- [235] P. C. Dorrestein, N. L. Kelleher, *Nat Prod Rep* **2006**, *23*, 893.

- [236] L. E. Quadri, P. H. Weinreb, M. Lei, M. M. Nakano, P. Zuber, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1998**, *37*, 1585.
- [237] N. Barekzi, S. Joshi, S. Irwin, T. Ontl, H. P. Schweizer, *Microbiology* **2004**, *150*, 795.
- [238] C. T. Calderone, W. E. Kowtoniuk, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, P. C. Dorrestein, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 8977.
- [239] C. J. Arthur, A. Szafranska, S. E. Evans, S. C. Findlow, S. G. Burston, P. Owen, I. Clark-Lewis, T. J. Simpson, J. Crosby, M. P. Crump, *Biochemistry* **2005**, *44*, 15414.
- [240] A. Misra, S. K. Sharma, N. Surolia, A. Surolia, *Chem Biol* **2007**, *14*, 775.
- [241] T. Hochmuth, **2010**.
- [242] S. Albrizio, P. Ciminiello, E. Fattorusso, S. Magno, J. R. Pawlik, *J Nat Prod* **1995**, *58*, 647.
- [243] A. Cutignano, G. Cimino, A. Giordano, G. d'Ippolito, A. Fontana, *Tetrahedron Lett* **2004**, *45*, 2627.
- [244] E. G. Bligh, W. J. Dyer, *Can J Biochem Physiol* **1959**, *37*, 911.
- [245] D. Hedrick, A. Peacock, P. Long, D. White, *Lipids* **2008**, *43*, 843.
- [246] M. J. Garson, M. P. Zimmermann, C. N. Battershill, J. L. Holden, P. T. Murphy, *Lipids* **1994**, *29*, 509.
- [247] A. B. Imbs, D. A. Demidkova, T. N. Dautova, N. A. Latyshev, *Lipids* **2009**, *44*, 325.
- [248] T. Režanka, I. Dor, A. Prell, V. M. Dembitsky, *Folia Microbiol (Praha)* **2003**, *48*, 71.
- [249] C. Denis, G. Wielgosz-Collin, A. Breteche, N. Ruiz, V. Rabesaotra, N. Boury-Esnault, J. M. Kornprobst, G. Barnathan, *Lipids* **2009**, *44*, 655.
- [250] G. Barnathan, E. Genin, N. E. Velosaotsy, J. M. Kornprobst, S. Al-Lihaibi, A. Al-Sofyani, R. Nongonierma, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **2003**, *135*, 297.
- [251] J. M. Kornprobst, G. Barnathan, *Mar Drugs* **2010**, *8*, 2569.
- [252] A. Dasgupta, E. Ayanoglu, C. Djerassi, *Lipids* **1984**, *19*, 768.
- [253] W. W. Christie, ed., *The AOCS lipid library* **2009**, <http://lipidlibrary.aocs.org/index.html>.
- [254] J. L. Harwood, N. J. Russell, *Lipids in Plants and Microbes*, Allen & Unwin, London, **1984**.
- [255] Z. Cohen, M. C. Margheri, L. Tomaselli, *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1155.
- [256] E. Selstam, D. Campbell, *Arch Microbiol* **1996**, *166*, 132.
- [257] N. M. Carballeira, J. R. Medina, *J Nat Prod* **1994**, *57*, 1688.
- [258] R. D. Walkup, G. C. Jamieson, M. R. Ratcliff, C. Djerassi, *Lipids* **1981**, *16*, 631.
- [259] N. Carballeira, J. E. Thompson, E. Ayanoglu, C. Djerassi, *J Org Chem* **1986**, *51*, 2751.
- [260] R. Morales, C. Litchfield, *Lipids* **1977**, *12*, 570.
- [261] J. H. Law, *Accounts of Chemical Research* **1971**, *4*, 199.
- [262] P. H. Buist, *Nat Prod Rep* **2007**, *24*, 1110.
- [263] N. M. Carballeira, J. Alicea, *Lipids* **2002**, *37*, 305.
- [264] V. M. Dembitsky, *Lipids* **2006**, *41*, 309.
- [265] A. Schreiber, G. Wörheide, V. Thiel, *Chem Phys Lipids* **2006**, *143*, 29.
- [266] W. Christie, E. Brechany, K. Stefanov, S. Popov, *Lipids* **1992**, *27*, 640.
- [267] S. A. Rod'kina, *Chemistry of Natural Compounds* **2005**, *41*, 289.
- [268] W. M. Ratnayake, B. Olsson, R. G. Ackman, *Lipids* **1989**, *24*, 630.
- [269] J. Nechev, W. W. Christie, R. Robaina, F. de Diego, S. Popov, K. Stefanov, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **2004**, *137*, 365.
- [270] Y. G. Joh, I. J. Elenkov, K. L. Stefanov, S. S. Popov, G. Dobson, W. W. Christie, *Lipids* **1997**, *32*, 13.
- [271] J. Miralles, G. Barnathan, R. Galonnier, T. Sall, A. Samb, E. M. Gaydou, J. M. Kornprobst, *Lipids* **1995**, *30*, 459.

- [272] G. Barnathan, J.-M. Kornprobst, P. Doumenq, J. Miralles, N. Boury-Esnault, *J Nat Prod* **1993**, *56*, 2104.
- [273] S. Chou, P. Chedore, A. Haddad, N. R. Paul, S. Kasatiya, *J Clin Microbiol* **1996**, *34*, 1317.
- [274] M. Jackson, G. Stadthagen, B. Gicquel, *Tuberculosis (Edinb)* **2007**, *87*, 78.
- [275] E. Radmacher, L. J. Alderwick, G. S. Besra, A. K. Brown, K. J. Gibson, H. Sahn, L. Eggeling, *Microbiology* **2005**, *151*, 2421.
- [276] S. G. Dastager, J. C. Lee, Y. J. Ju, D. J. Park, C. J. Kim, *Curr Microbiol* **2008**, *56*, 569.
- [277] N. Nicolaidis, J. M. Apon, *Lipids* **1976**, *11*, 781.
- [278] Y. Seyama, K. Ohashi, T. Imamura, T. Kasama, H. Otsuka, *J Biochem* **1983**, *94*, 1231.
- [279] M. H. Dekker, T. Piersma, J. S. Damste, *Lipids* **2000**, *35*, 533.
- [280] A. Smith, W. Duncan, *Lipids* **1979**, *14*, 350.
- [281] V. Thiel, A. Jenisch, G. Wörheide, A. Löwenberg, J. Reitner, W. Michaelis, *Org Chem* **1999**, *30*, 1.
- [282] F. T. Gillan, I. L. Stoilov, J. E. Thompson, R. W. Hogg, C. R. Wilkinson, C. Djerassi, *Lipids* **1988**, *23*, 1139.
- [283] V. Thiel, M. Blumenberg, J. Hefter, T. Pape, S. Pomponi, J. Reed, J. Reitner, G. Wörheide, W. Michaelis, *Naturwissenschaften* **2002**, *89*, 60.
- [284] S. A. Rodkina, *Russ J Mar Biol* **2005**, *31*, S49.
- [285] A. Cutignano, A. Tramice, S. De Caro, G. Villani, G. Cimino, A. Fontana, *Angew Chem* **2003**, *115*, 2737.
- [286] L. Gu, J. Jia, H. Liu, K. Håkansson, W. H. Gerwick, D. H. Sherman, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 9014.
- [287] Y. Huang, S.-X. Huang, J. Ju, G. Tang, T. Liu, B. Shen, *Org Lett* **2011**, *13*, 498.
- [288] N. Carballeira, M. Maldonado, *Lipids* **1988**, *23*, 690.
- [289] N. M. Carballeira, F. Shalabi, *J Nat Prod* **1994**, *57*, 1152.
- [290] N. M. Carballeira, C. Cruz, A. Sostre, *J Nat Prod* **1996**, *59*, 1076.
- [291] G. Barnathan, J. M. Kornprobst, P. Doumenq, J. Miralles, *Lipids* **1996**, *31*, 193.
- [292] L. A. D. Dur, *Int J Food Sci Tech* **1983**, *18*, 207.
- [293] E. Ayanoglu, R. Walkup, D. Sica, C. Djerassi, *Lipids* **1982**, *17*, 617.
- [294] N. M. Carballeira, N. Montano, J. Vicente, A. D. Rodriguez, *Lipids* **2007**, *42*, 519.
- [295] N. M. Carballeira, F. Shalabi, M. E. Maldonado, *Lipids* **1990**, *25*, 235.
- [296] A. Martínez, C. Duque, Y. Fujimoto, *Lipids* **1997**, *32*, 565.
- [297] J. Nechev, W. W. Christie, R. Robaina, F. M. de Diego, A. Ivanova, S. Popov, K. Stefanov, *Hydrobiologia* **2002**, *489*, 91.
- [298] J. Nechev, W. W. Christie, R. Robaina, F. de Diego, S. Popov, K. Stefanov, *European Journal of Lipid Science and Technology* **2002**, *104*, 800.
- [299] N. M. Carballeira, L. Maldonado, *Lipids* **1988**, *23*, 682.
- [300] N. M. Carballeira, V. Negrón, E. D. Reyes, *J Nat Prod* **1992**, *55*, 333.
- [301] I. Lagkouvardos, Master thesis, b-it and University of Bonn (Bonn), **2006**.
- [302] P. Z. Gatzeva-Topalova, A. P. May, M. C. Sousa, *Structure* **2005**, *13*, 929.
- [303] J. Piel, I. Höfer, D. Hui, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1280.
- [304] K. A. Datsenko, B. L. Wanner, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 6640.
- [305] D. J. MacNeil, K. M. Gewain, C. L. Ruby, G. Dezeny, P. H. Gibbons, T. MacNeil, *Gene* **1992**, *111*, 61.
- [306] B. Gust, G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, K. F. Chater, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 1541.
- [307] M. S. B. Paget, L. Chamberlin, A. Atrih, S. J. Foster, M. J. Buttner, *J Bacteriol* **1999**, *181*, 204.
- [308] J. M. Jez, J. L. Ferrer, M. E. Bowman, R. A. Dixon, J. P. Noel, *Biochemistry* **2000**, *39*, 890.
- [309] M. Izumikawa, Q. Cheng, B. S. Moore, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 1428.
- [310] J. He, Dissertation thesis, Friedrich-Schiller-Universität Jena (Jena), **2004**.

- [311] T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, D. A. Hopwood, *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation, Norwich, **2000**.
- [312] A. Tauch, O. Kirchner, B. Löffler, S. Götter, A. Pühler, J. Kalinowski, *Curr Microbiol* **2002**, *45*, 362.
- [313] F. Flett, V. Mersinias, C. Smith, P. , *FEMS Microbiol Lett* **1997**, *155*, 223.
- [314] D. Marchuk, M. Drumm, A. Saulino, F. S. Collins, *Nucl Acids Res* **1991**, *19*, 1154.
- [315] Y. Zhang, F. Buchholz, J. P. P. Muyrers, A. F. Stewart, *Nat Genet* **1998**, *20*, 123.
- [316] B. K. Tischer, J. von Einem, B. Kaufer, N. Osterrieder, *Biotechniques* **2006**, *40*, 191.
- [317] J. Cremer, L. Eggeling, H. Sahn, *Mol Gen Genet* **1990**, *220*, 478.
- [318] M. Seidel, L. J. Alderwick, H. L. Birch, H. Sahn, L. Eggeling, G. S. Besra, *J Biol Chem* **2007**, *282*, 14729.
- [319] J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning. A laboratory Manual.*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, **2001**.
- [320] F. C. Dobbs, R. H. Findlay, in *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology* (Eds.: Kemp, Sherr, Sherr, Cole), Lewis Publishers, **1993**, pp. 347.
- [321] D. C. White, D. B. Ringelberg, in *Techniques in Microbial Ecology.*, Vol. pp. 225–272 (Eds.: R. S. Burlage, R. Atlas, D. Stahl, G. Geesey, G. Sayler), Oxford Univ. Press, New York, **1998**.
- [322] H. L. Fredrickson, T. E. Cappenberg, J. W. Leeuw, *FEMS Microbiol Lett* **1986**, *38*, 381.
- [323] L. Zelles, Q. Y. Bai, *Soil Biol Biochem* **1993**, *25*, 495.
- [324] F. Destailats, P. Angers, *J Am Oil Chem Soc* **2002**, *79*, 253.
- [325] R. P. Linstead, M. Whalley, *J Am Chem Soc (Resumed)* **1950**, 2987.
- [326] M. Sasser, *Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids.*, MIDI Technical Note #101, MIDI Inc., Newark, Del., **2001**.
- [327] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucl Acids Res* **1997**, *25*, 3389.
- [328] J. D. Thompson, T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D. G. Higgins, *Nucl Acids Res* **1997**, *25*, 4876.

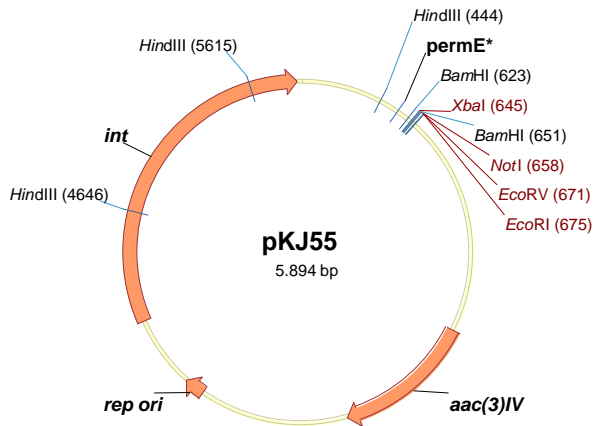


# H ANHANG

## H 1 Anhang Molekularbiologie

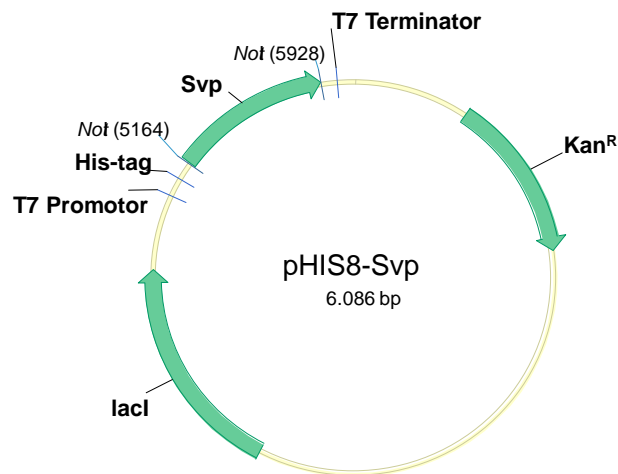
### H 1.1 Vektorkarten

*pKJ55*

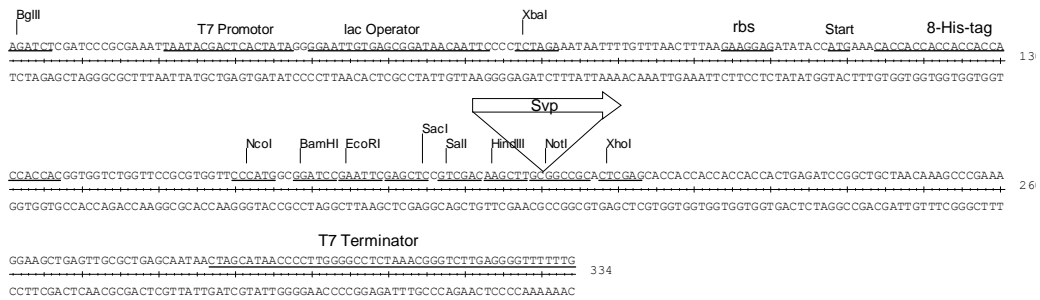


Anhang Abb. 1: pKJ55.

*pHIS8-Svp*

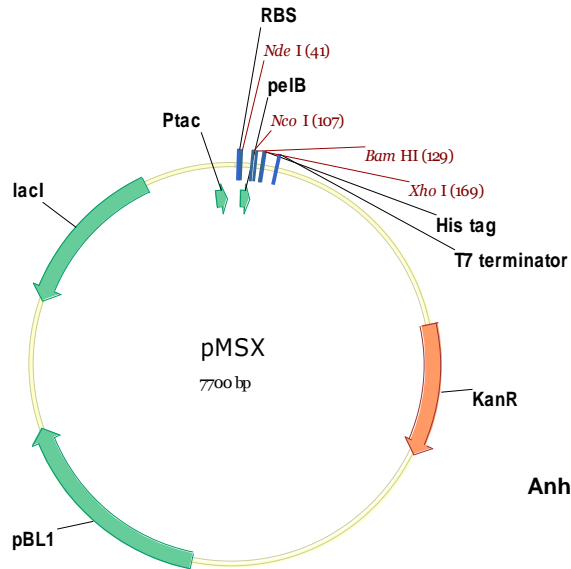


Anhang Abb. 2: pHIS8-Svp.



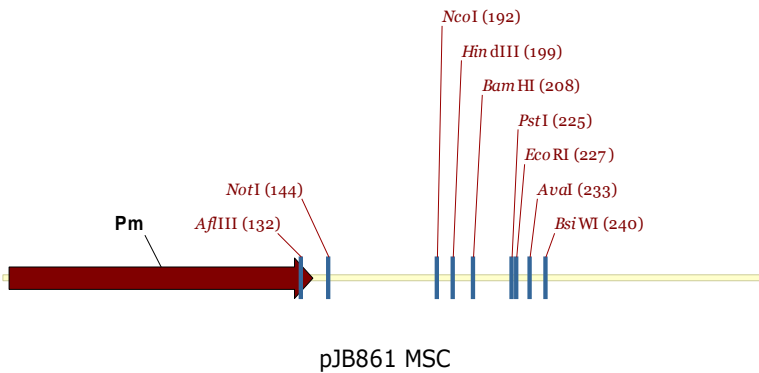
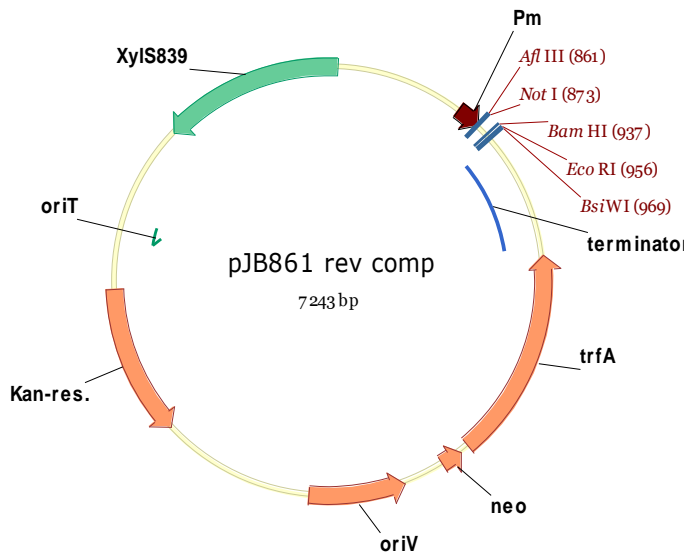
Der Vektor pHIS8-Svp entstand durch Einfügung des *svp*-Gens in die *NotI* Schnittstelle von pHIS8.

*pMSX*



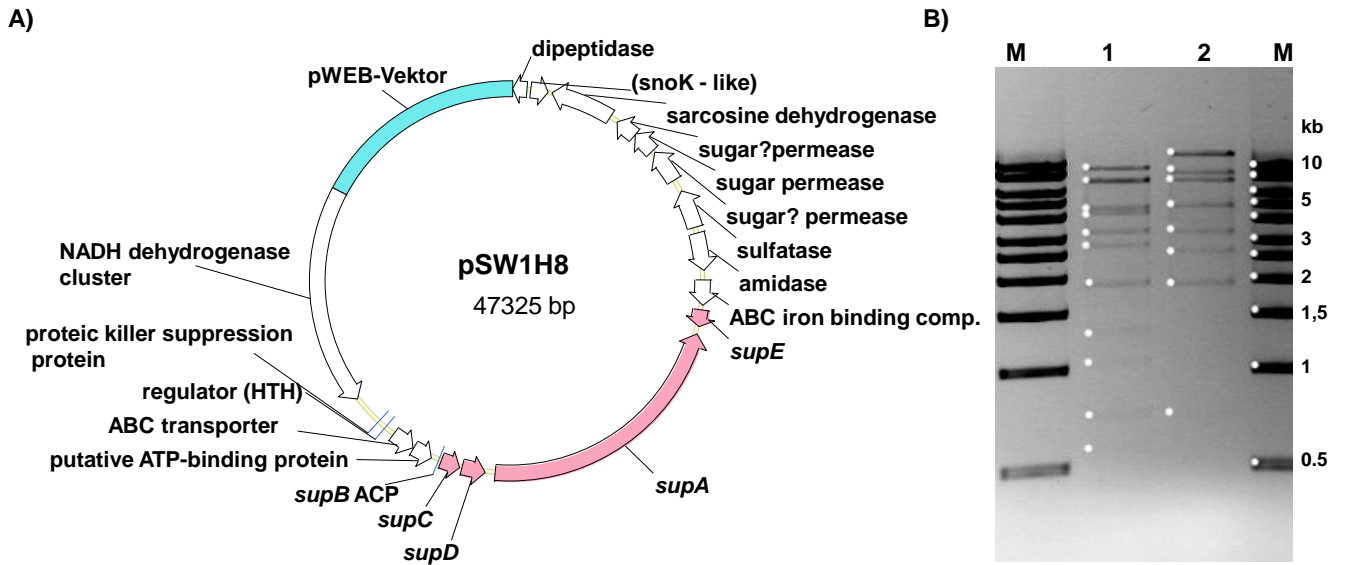
Anhang Abb. 3: pMSX.

*pJB861*

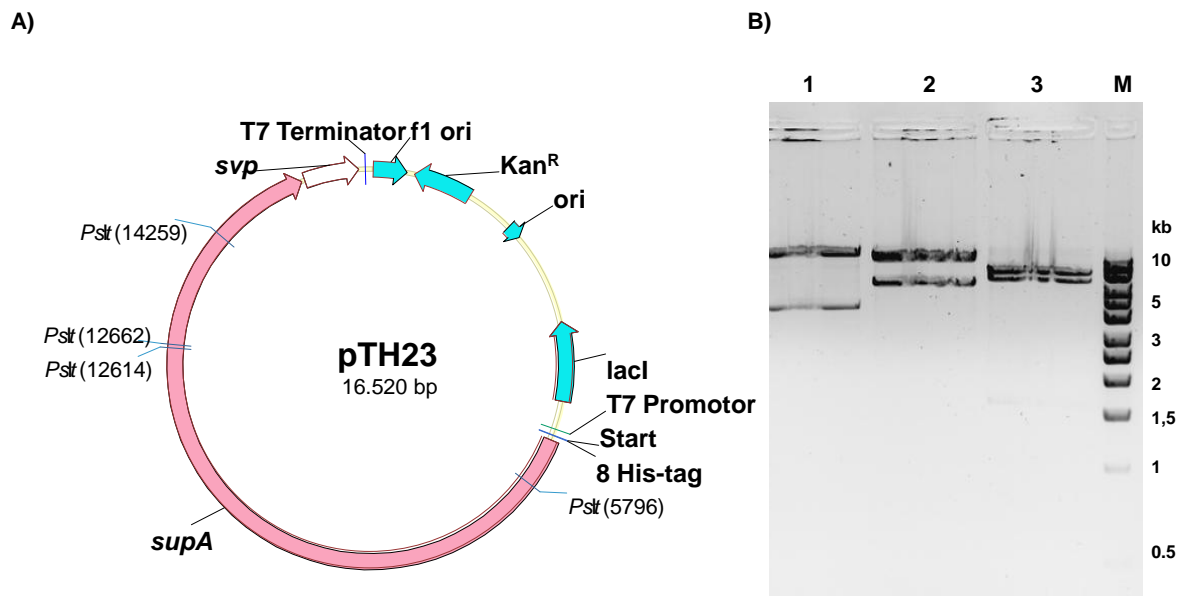


pJB861 MSC  
337 bp

Anhang Abb. 4: pJB861.

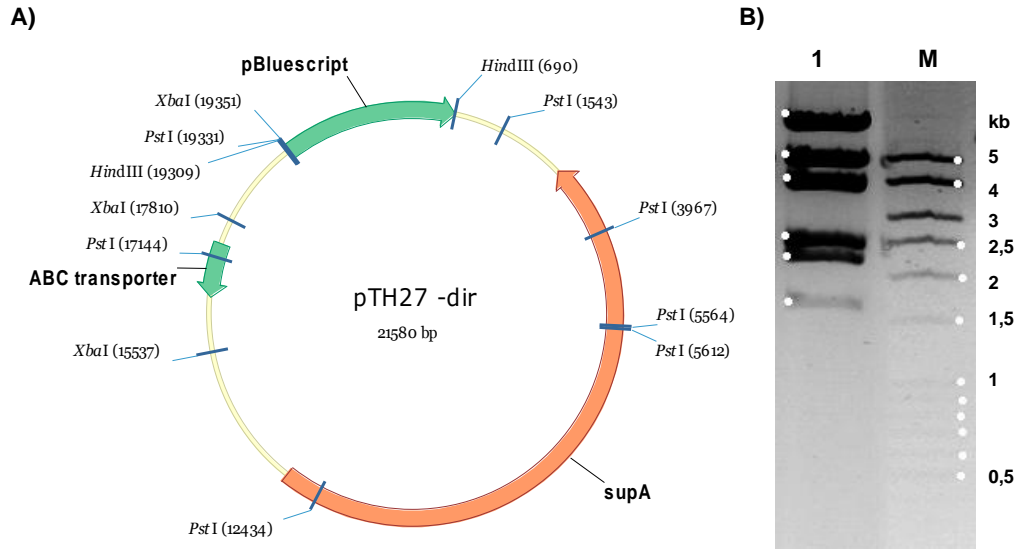
*pSW1H8*

Anhang Abb. 5: pSW1H8. A) Plasmid-Karte. B) Agarosegel. M, 1 kb Marker Roth; 1, Verdau mit *NsiI*, *EcoRI* und *BglII*; 2, Verdau mit *NsiI* und *EcoRI*.

*pTH23*

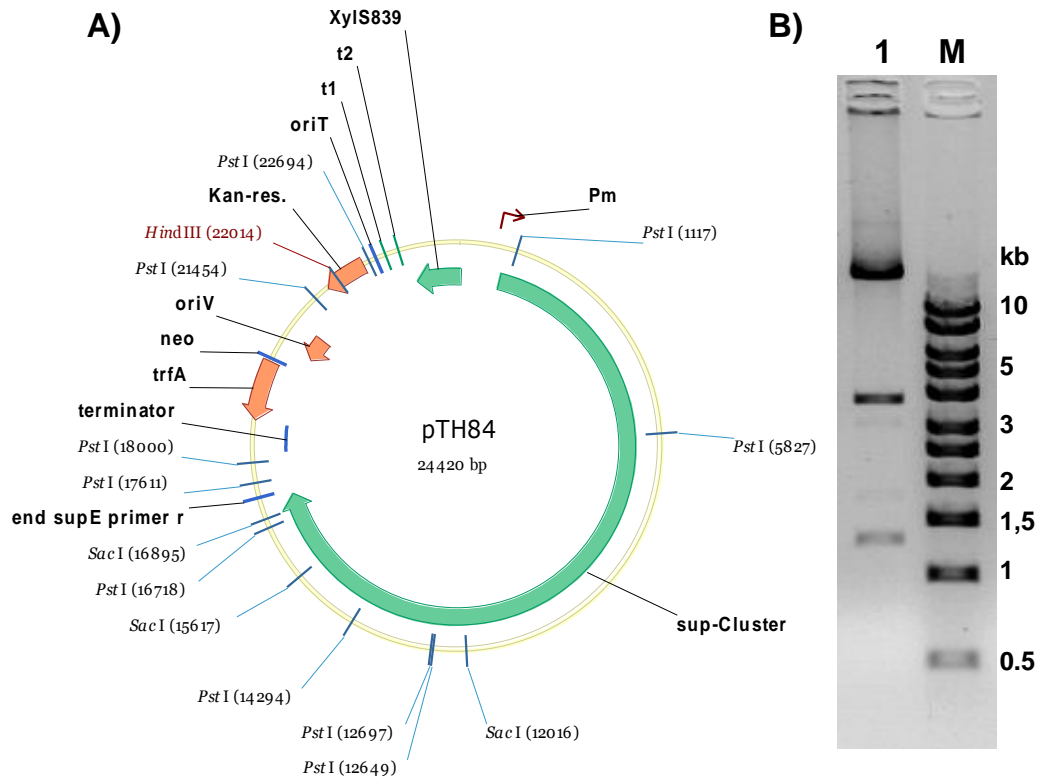
Anhang Abb. 6: pTH23. A) Plasmid-Karte. B) Agarosegel. 1, Verdau mit *ClaI*; 2, Verdau mit *EcoRI*; 3, Verdau mit *PstI*; M, 1 kb Marker Roth.

*pTH27*

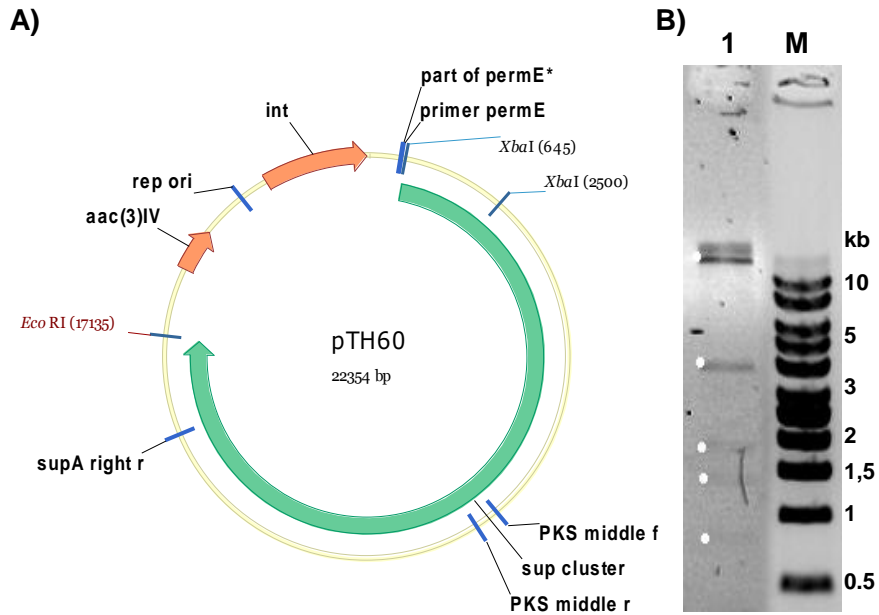


Anhang Abb. 7: *pTH27*. **A)** Plasmid-Karte. **B)** Agarosegel. 1, Verdau mit *PstI*; M, 100 bp extended Marker Roth.

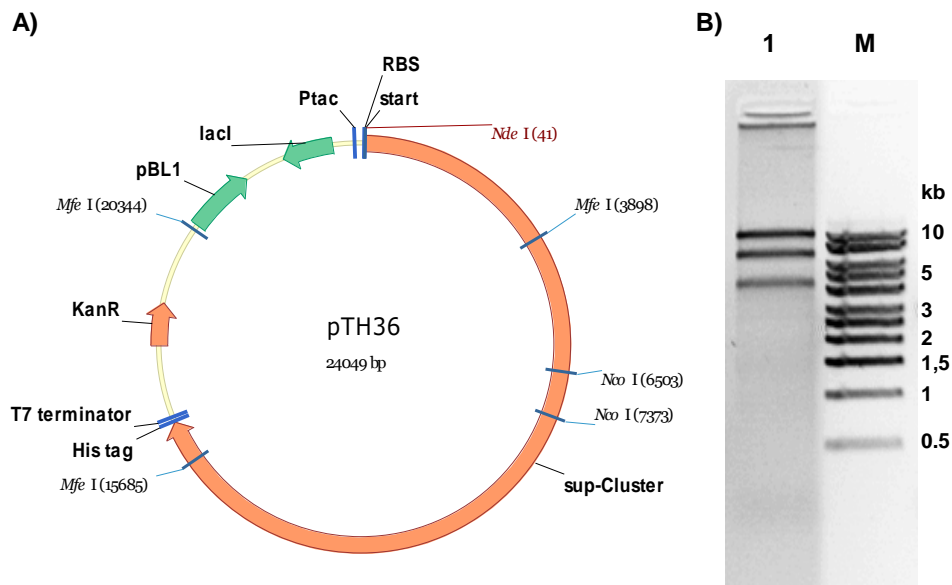
*pTH84*



Anhang Abb. 8: *pTH84*. **A)** Plasmid-Karte. **B)** Agarosegel. 1, Verdau mit *SacI*; M, 1 kb Marker Roth.

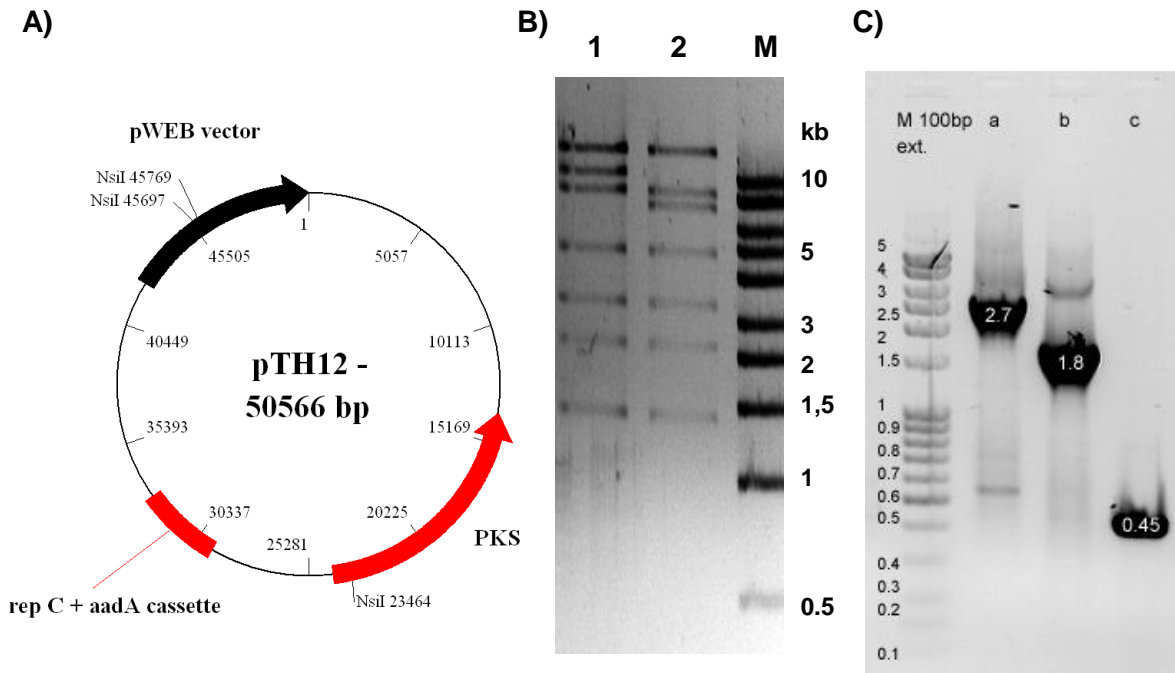
*pTH60*

Anhang Abb. 9: pTH60. **A)** Plasmid-Karte. **B)** Agarosegel. 1, Verdau mit *SacI*; M, 1 kb Marker Roth.

*pTH36*

Anhang Abb. 10: pTH36. **A)** Plasmid-Karte. **B)** Agarosegel. 1, Verdau mit *MfeI*; M, 1 kb Marker Roth.

*pTH12*



**Anhang Abb. 11:** pTH12. **A)** Plasmid-Karte. **B)** Agarosegel. 1, Verdau von pSW1H8 mit *NsiI* und *EcoRI*; 2, Verdau von pTH12 mit *NsiI* und *EcoRI*; M, 1 kb Marker Roth. **C)** PCR-Verifizierung von pTH12. **a**, Primer „Up rep C. glutamicum“/„aadA cassette rev“; **b**, Primer „up rep C. glutamicum“/„low rep C. glutamicum“; **c**, Primer „PKS f“/„PKS r“; Angaben in kb.

## H 1.2 Weitere erstellte Plasmide

**Anhang Tab. 1:** Sonstige erstellte Plasmide der vorliegenden Arbeit.

Plasmid	basiert auf	Resistenz	Insert	Kommentar
pTH83	pBSK II(+)	Amp	<i>sup</i> -Cluster	falschrum orientiert
pJB861 [cat]	pJB861	Kan, Cam	<i>cat</i> -Gen eingefügt	pJB861 mit zusätzlicher Chloramphenicol-Resistenz
pKG32ctRNAm ut-aadA	pKG32ctRNA mut	Kan, Str	<i>aadA</i> aus pIJ778	Streptomycin-Kassette eingefügt



### H 1.3.2 Alinierung der SupA<sub>AT1</sub>

		498		567
AT14 SA1 PKSC Schirmer	(1)	-----		
AT3 (3) debs Khosla	(1)	ERHRETTAHDGRVPV	VVSAE	STALRAQAQIAELLERFADL
supA	(498)	QRARLLPLSGKSETALRELAKRYLSWLDEHEEHASESAAEPL	LADMTAVGRSHFDHRAAVYFHNA	
Consensus	(498)	RE R	L AK A A	D LA MA A RA DHRAAVI
		568		637
AT14 SA1 PKSC Schirmer	(1)	-----		
AT3 (3) debs Khosla	(71)	EEAVRGLREIACATADAVEVE	VTVEVD	RNVVLEFPQGSQWAGMGAILLSSPVFAGKIRACDLSAP
supA	(568)	ESLQERLSAEEAE-----	TERPRRAATKVAFAVTCQGSQWAGMG	EALYREPVAVAVLDRCEEV
Consensus	(568)	E L TA AA	G A	KVAFVLSGQGSQWAGMG DLYESEPV RAVLDRCEEVI
		638		707
AT14 SA1 PKSC Schirmer	(41)	TRGVSLLDVMPDRPGKTGDI	NHTAWAQPILYALESAIAELWGS	GVVPAAVVGHVSGEIAAARACVFGI
AT3 (3) debs Khosla	(141)	MQDWKSDVTRQAPGAPG	DRVDVQVLEAVMVSLAELNR	SYGVEPAAVVGHVSGEIAAARACVFGI
supA	(631)	ERGTSLLDVMFGCS--ESN	NDTAWEQPILYALECALTALWSS	VGVVPSVAVVGHVSGEIAAARACVFGI
Consensus	(638)	RG SLLDVMF PG	LN TAW QP	PALYALE ALAELW SVGVRPAAVVGHVSGELAAA AAGVFSL
		708		777
AT14 SA1 PKSC Schirmer	(111)	EGCRFAAARQELVGSIP	AGARAGAMLAVFAFERL	EALVSAEAGPRISLAVDNGTHQVVS
AT3 (3) debs Khosla	(210)	EGALLVVRSRLNRSLSG	-----	AGMAVVLGAAVRLRFPWODRISVAVNGPRSVVVS
supA	(699)	EDGMRFAAARQTLSETEPG	-----	AMAVFAPSARVASTVEALN
Consensus	(708)	EDGLRFAAARG LM SL AD	AM AVFAPAARLEA VDE A AG	LSIAVDNNGTHQVVS
		778		847
AT14 SA1 PKSC Schirmer	(181)	RVLAEFCIASQGRRAERL	ATSHAFSEFMDELLDL	EALVETWIAAFELAVSNVSGGLVRRNEVLDG
AT3 (3) debs Khosla	(272)	ARLRFEDCAARQVVDVD	ASHSPQIRVRRELELE	TGLAPRPARVPHFTVESRMDGTELDA
supA	(764)	EVETVSKRFESEGVRRRLN	TRAFHSSLVEPALDALEASLDG	VVAISPPSLTVVSNLTGRAVEPDQALDGAYWRRHA
Consensus	(778)	V ALSE ASEGIRVRRLL TSHAFHS	IEPILDDLEASLDGVAISPPSLTVVSNLTGRAVEPDQALDGAYWRRHA	REAVAFARGVRTLAELGVDLVVEIGPRSVLATMAVAAWPESAQRPAVVLSSLYPPSGNASESAGGADFMQAVAEVYQAGLPIRFAALFAGEARRRISLPGYPFQ
		848		917
AT14 SA1 PKSC Schirmer	(251)	RYWRRQAREPVAFADCV	ATLAGGIDLVVIGPRFVLA	PLVEQLNESHQRQSMATQDGREFDGTSRGPV
AT3 (3) debs Khosla	(341)	RYWRRNLRERVFADAV	TRLAESCYDAFENSPHVV	VQAVVEEADGADDAVVCSTLRDGGD
supA	(834)	RYWRRHAREAVAFARGVRT	LAELGVDLVVEIGPRSVLAT	MAVAAWPESAQRPAVVLSSLYPPSGN
Consensus	(848)	AYWRRNARE VAFADAV TLAELGIDLVVEIGPRFVLA	LVE AWPEAA	VVLASLHPDGG
		918		987
AT14 SA1 PKSC Schirmer	(321)	VVASQRSAPQAAALDGPSP	STRVAGTSHNSGFEAAVAEAYAGT	DLRLDGLFAGERRRVSLETPYFPQ
AT3 (3) debs Khosla	(407)	-----	LSAFTSRMATVHVS	CDIRNVALPQAP--FALPTVFPQ
supA	(900)	-----	ASESAGGADFMQAVAEVYQAGLPIRFAALFAGEARRRISLPGYPFQ	
Consensus	(918)	-----	A S AAFL AVAEAY	AGLDIRFDALFAGEARRRISLPTYPFQ
		988		1008
AT14 SA1 PKSC Schirmer	(391)	RRRHWLD	-----	
AT3 (3) debs Khosla	(445)	RKRYVLPQAPAAPAAASDE	LAYR	
supA	(946)	RRRHWLEATRQRRPRAVH	PPLL	
Consensus	(988)	RKRHWLD		

Anhang Abb. 13: Alinierung der SupA<sub>AT1</sub>

Die klonierte Sequenz lautet:

**RQREARLLPLSGKSETALRELAKRYLSWLDEHEEHASESAAEPLLADM  
 AWTAGVGRSHFDHRAGVIFHNAESLQERLSALAEAGTGERPRAATKVAFA  
 AYTGQGSQWAGMGALYEREPVARAVLDRCEEVFRERGTSLLDVMFVG  
 CSESNLNDTAWEQPALYALECALTALWSSVGVVPSVAVVGHVSGELAAAQ  
 AAGVFSLEDGMRFAAARGTLLSETEPGAMAAVFAPSARVASTVEALNSS  
 TAGVGLSISADNGTHQVVS GPVAEVETVSKRFESEGVRRRLNTRAFHS  
 SLVEPALDALEASLDGVAISPPSLTVVSNLTGRAVEPDQALDGAYWRRHA  
 REAVAFARGVRTLAELGVDLVVEIGPRSVLATMAVAAWPESAQRPAVVL  
 LSSLYPPSGNASESAGGADFMQAVAEVYQAGLPIRFAALFAGEARRRISLP  
 GYPFQRRERHWLEATRQRRPRAVHPLL**



### H 1.3.3 Alinierung der SupAMT

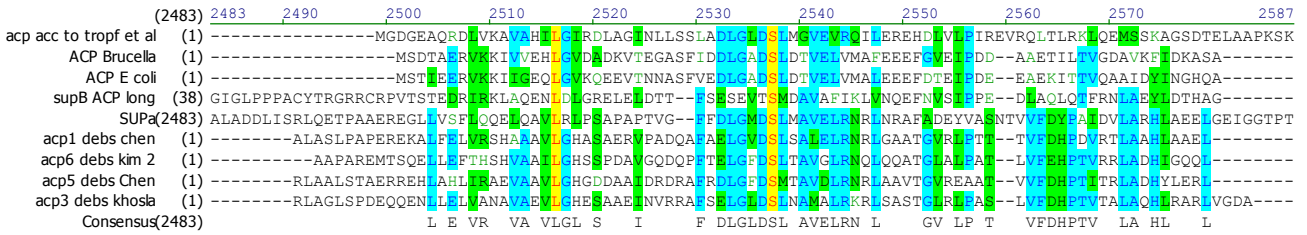
		1	60
MT12 PKSC Schirmer	(1)	-----	-----
MT0 SAL	(1)	-----	-----
MT10 SAL	(1)	-----	-----
MT9 SAL	(1)	----LRVVASHERLLRHLFGMLAEAGVLPARDG---WTVAAASSGLFPDLSPQHLDEQ	
MT8 SAL	(1)	-----	-----
MT5 SAL	(1)	DLRRQLRVVADHEQLFRRLFESLAEAGVLIQVPGGSANWVVDASGDSLPGALKDPEAL	
supA MT	(1)	DLRQRLEVIADHERLFLRMLEMLAKSGVLEEVDGG---FVVKVGAEDPLPEEMPRDPEEF	
Consensus	(1)	-----	-----
		61	120
MT12 PKSC Schirmer	(1)	-----	-----
MT0 SAL	(1)	-----ARCGGALDKVLRGHTDEEELLLSGHFNARLNRESLTRA	
MT10 SAL	(1)	-----LRCEALADVLRGHTDQGLFGHDFPAGARQLPDTSMRAA	
MT9 SAL	(53)	AVSLAKRYPAARIEMA LQRCGALPVIAGRQDFEELFG-SAFGTELVLRDAFTMAA	
MT8 SAL	(1)	-----KRCGSALAEVITGRADFMALFGDGSATVILNRDAFGMRAV	
MT5 SAL	(61)	AGFLRERHPYGAGELDLARCCCTALADLRGRANFTLLYQDKERPLPFGPDLSTLRGV	
supA MT	(58)	ATRMAELYPHGSTEIGL FQRCGALADVLRGHADEFTLLFSSGEP TPGLLKAEVARAA	
Consensus	(61)	L RCG ALADVLRGR DPL LFG P A DLY DAP MRAA	
		121	180
MT12 PKSC Schirmer	(1)	-----PGRFDYTFYTDISAGFLSA	
MT0 SAL	(43)	SKALGGAVVAALVADLPANRRRLRVLEVGA DAGTTEFVLPPLPAGRYDYITDASRAFLSE	
MT10 SAL	(45)	GRMUSRAVEVLTGELPGRRLRVLELGSIIWVVDLVPALPEGRNDYVSSSALFAQ	
MT9 SAL	(112)	NRILGAVVVAAGLPRRRLRVLEVGA GTSAAAANVLAALPEERCDYVETDISEGFFAA	
MT8 SAL	(43)	QRVVSFTVAALASALPEGRRLRVLEVGA GTS TEAVLAALPKQFDYSYTDISAGFFAA	
MT5 SAL	(121)	TSMVCEVVSAAAGLPPGRTLRVLELAADTWSTIGAVLAALPAGRTYVCTHVSQDVAAG	
supA MT	(118)	NEILGETVRALVAGLPGDGRRLRVLEVGA GTSATAAVLPELPAGRFDYMYTDISAGFFAE	
Consensus	(121)	RMLGE VAAL AGLPDGRRLRVLEVGA GTS T AVL ALP GRFDYVYTDISAGFFA	
		181	240
MT12 PKSC Schirmer	(19)	AESRFQGHDSSEYRVLDIIGSLEKIGIDARSYDLLIAANVLHATRDLRHRLSRCELLA	
MT0 SAL	(103)	AEARVAQNDSFVDCRVLNIEKFNENSGFDHAYDLYIAGHALHATRDLEKAFERCLRLLA	
MT10 SAL	(105)	HAARFGNGCAPTEYRLLDIADFPVQGFDAHGYDLYIAANVLSNTRDLAEVLAQRDLLE	
MT9 SAL	(172)	ATFLRNSKNSISYCYLDIRDFAGCFPHGYDLYIAANVLAHATQDLKALGCRSLLA	
MT8 SAL	(103)	AESRSRFATRYVLDIIDPAQGGFDARGYDLYIAANVLAHATRDVGESELANCRLLA	
MT5 SAL	(181)	AAQRLPAHSSTEEYRVLDIADPQEGCFEAGHYDLYIAANVLSAGDLGTSIQCRDLLA	
supA MT	(178)	AEARFGGDEASIAYRALDIERDPVALGFAAHGYDLYIAANVLAHATRYLEETLAHCRQLLA	
Consensus	(181)	AEARFGG DASIEYRVLDIE DP QGFDAHGYDLYIAANVLAHATRD L LAHCR LLA	
		241	300
MT12 PKSC Schirmer	(79)	PSCQL-----	
MT0 SAL	(163)	-----	
MT10 SAL	(165)	PSCQLAWGGFPAQGWLDLTFGLLEGWRRFADCYRDPHPIATEEANRGALADAGEEDVAM	
MT9 SAL	(232)	ASGQLALRGLPQGWLDLTFGLLEGWRRFADYRDPHPIVDFEYVWRRALADAGYGEVAF	
MT8 SAL	(163)	PSCQLVALEMLPQGWLDLTFGLLEGWRRFADYRSEHALASEPANNRRLADAGFCTVVA	
MT5 SAL	(241)	FQELALGPHHRGWLDLTFGLLDGRRNYSGSNSQCEPTGQAELSAALTDAQGFGEVAH	
supA MT	(238)	PSCQLVALENLRQGWMDLTFGQLDGWRRFADYRPHHALVGPVAVWRRALGVDVGFQKVEV	
Consensus	(241)	PSCQLALE R QGWLDLTFGLLDGWRRFAD YR H L WR ALADAGFG V	
		301	355
MT12 PKSC Schirmer	(84)	-----	
MT0 SAL	(163)	-----	
MT10 SAL	(225)	IGAGDTGDGEG-AVQQLVARGP-----	
MT9 SAL	(292)	IEAGHAVDGG--PAQSVVARGP-----	
MT8 SAL	(223)	IGTGAFGG-DG-HAQAVLVAQFAEEVDAPGVVWLAADHGGMAEELSARMAERNQ	
MT5 SAL	(301)	WSTSGETAGVSHPRWNLVARGP-----	
supA MT	(298)	IGVEESDSTEM-PDKGVIVAQGPVEVTERPAVWVLAADSGGAAEELAAELTARNQ	
Consensus	(301)	I VIVA GP	

Anhang Abb. 14: Alinierung der SupAMT.

Die klonierte AS Sequenz der SupAMT lautet:

DLRQRLEVIADHERLFLRMLEMLAKSGVLEEVDGGFVVKVGAEDPLPEE  
MPRDPEEFATRMAELYPHGSTEIGL FQRCGALADVLRGRADPLTLLFSS  
GEPTPGDLYLKAPVARAANRLLGETVRALVAGLPGDGRRLRVIEVGAGTG  
SATAAVLPELPAGRFDYMYTDISAGFFAEAEARFGGDEASIAYRALDIERD  
PVALGFAAHGYDLLIASNVLAHATRYLEETLAHCRQLLAPSGQLVALENLR  
GQGWMDLTFGQLDGWRRFADDYRPHHALVGPVAVWRRALGVDVGFQKVEV  
EVLGVEESDSTEMPDKGVIVAQGPVEVTERPAVWVLAADSGGAAEELAA  
ELTARNQ

### H 1.3.4 Alinierung der SupA<sub>ACP</sub>

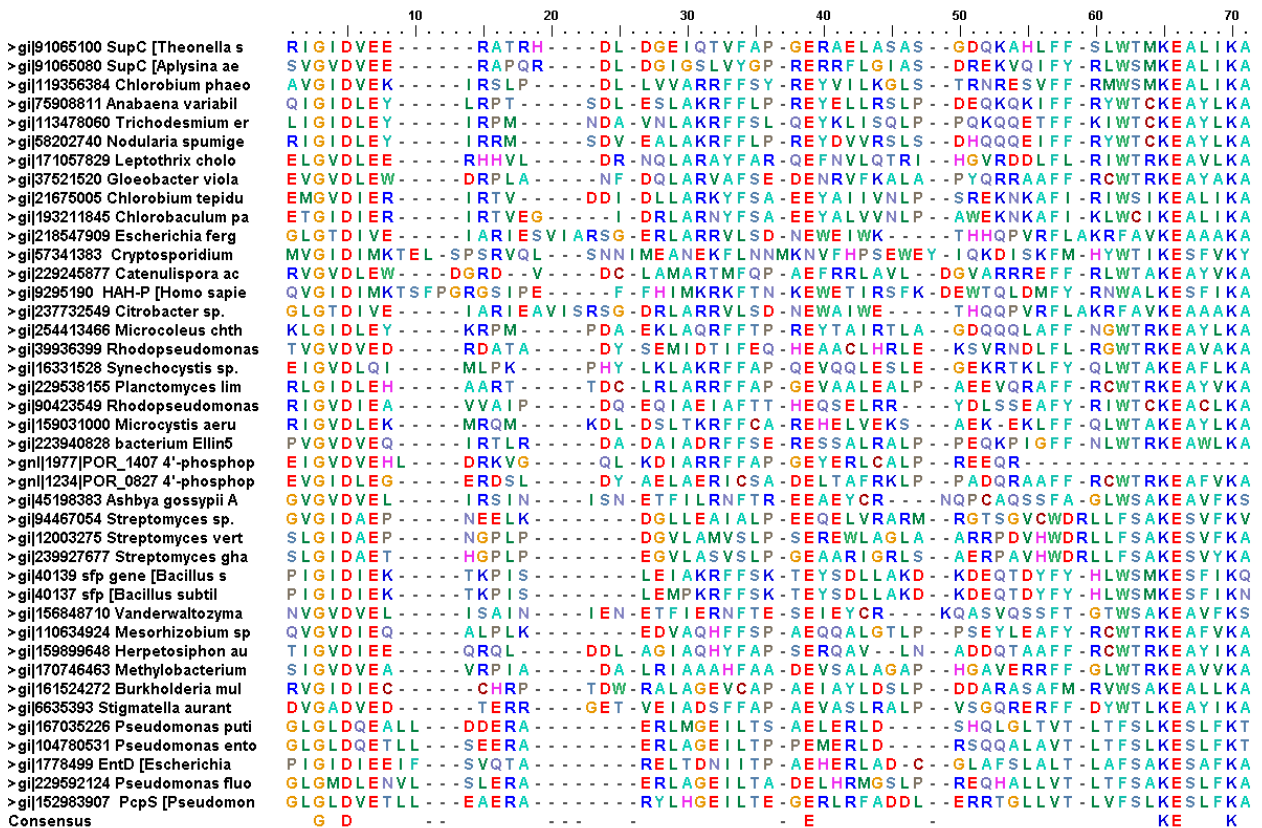


Anhang Abb. 15: Alinierung der SupA<sub>ACP</sub>.

Aus der Alinierung resultiert folgende klonierte Sequenz (pTH97):

RLQETPAAEREGLLVSFLQQELQAVLRLPSAPAPTGVFFDLGMDSLMAVE  
LRNRLNRAFADYVASNTVFDYPAIDVRLARHLAEEL.

### H 1.3.5 Alinierung der PPTase-Sequenzen für den Stammbaum



Anhang Abb. 16: Alinierung der PPTasen für den Stammbaum (Abb. 48).

## H 1.4 Genomanalyse eines Poribakteriums

Anhang Tab. 2: "blastp"-Analyse von SupA-Sequenzen aus dem Poribakteriengenom.

Bezeichnung	Genbanknr.	Organismus	Position/AS	Lücken/AS	Ident/Positiv (%)	E-Wert
Fragment 1 (SupA <sub>KS1</sub> )						
contig01436  frame4	gb ABK01353.1  KS	uncultured bacterium	133-209/210	0/77 (0%)	90/92	6e-33
	gb ACX49735.1  SupA	uncultured marine bacterium 1k6	273-352/3453	0/80 (0%)	85/88	2e-30
	gb ABE03915.1  SupA	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAE27P20	268-347/3248	0/80 (0%)	78/87	1e-28
	gb ABE03935.1  SupA	<i>T. swinhoei</i> bacterial symbiont clone pSW1H8	273-352/3461	0/80 (0%)	67/87	2e-24
Fragment 2 SupA nach KS1 bis ~50 AS von AT1 (AT1 beginnt ab ~28 AS)						
contig01835 frame6	gb ABE03935.1  SupA	<i>T. swinhoei</i> bacterial symbiont clone pSW1H8	575-642 /3461	2/70 (2%)	71/75	3e-19
	gb AAY00026.1 SA1_PKSB	uncultured bacterial symbiont of <i>D. dissoluta</i>	572-629/7533	0/58 (0%)	75/81	2e-18
	gb ACX49735.1  SupA	uncultured marine bacterium 1k6	583-641/3453	0/59 (0%)	69/77	2e-17
	gb ABE03915.1  SupA	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18	562-629/3403	0/68 (0%)	67/75	2e-17
Fragment 3+4 ident. zur AT1(Mitte), somit sind 2 unterschiedliche Kopien von SupA vorhanden, oder es sind mehrere Module vorhanden (wie in SA1_PKSA). Für SupE wurden ja auch 2 Fragmente für die gleiche Sequenz gefunden (3+4).						
contig00839 frame4	gb ABE03935.1  SupA	<i>T. swinhoei</i> bacterial symbiont clone pSW1H8 [bacteria]	745-889/3461	0/145 (0%)	68/82	5e-51
	gb ABB73286.1  PKS	uncultured bacterium 2063G [bacteria]	728-872/3419	0/145 (0%)	62/75	3e-45
	gb AAY00025.1  SA1_PKSA	uncultured bacterial symbiont of <i>D. dissoluta</i> [bacteria]	9727- 9865/25572	0/139 (0%)	59/799	2e-43
	gb ACX49735.1  SupA	uncultured marine bacterium 1k6	748-891/3453	0/144 (0%)	43/66	1e-29
In Position AS 27 der POR_0183 Sequenz ist das GHS Motiv intakt, was eindeutig auf AT1 hinweist. In der AT2 ist das GHS Motiv zu GHG mutiert, auch fehlt das HQVVSG immer in der AT2, in AT1 ist es vorhanden. SupA <sub>AT1</sub> (bis ~157) (hat GHS Motiv und HQVVSG Motiv, beide sind in AT2 nicht vorhanden).						
POR_0183	>gb ABE03935.1  SupA	<i>T. swinhoei</i> bacterial symbiont clone pSW1H8	3227-3450/3461	13/226 (5%)	50/63	2e-49
	siehe oben	siehe oben	796-957	8/162 (4%)	51/66	4e-35
	>gb ACX49735.1	uncultured marine bacterium 1k6	3227-3453/3453	15/228 (6%)	46/60	7e-44
	siehe oben	siehe oben	799-954/3453	8/156 (5%)	46/60	6e-31

Fragment 4 supA <sub>MT</sub>						
contig01240 frame1	>gb ABE03915.1  SupA	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18	1403-1545/3403	0/143 (0%)	81/89	1e-60
	>gb ACX49735.1  SupA	uncultured marine bacterium 1k6	1412-1556/3453	0/145 (0%)	80/88	2e-60
	>gb ABE03895.1  polyketide synthase	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAE27P20	1402-1547/3248	0/146 (0%)	77/85	1e-58
	>gb ABE03935.1  SupA	<i>T. swinhoi</i> bacterial symbiont clone pSW1H8	1410-1555/3461	0/146 (0%)	75/85	3e-57
Fragment 5 SupA, Ende der MT und MT-ER Linker						
contig01036 frame2	gb ABE03935.1  SupA	<i>T. swinhoi</i> bacterial symbiont	1639-1709/3461	0/71 (0%)	76/84	2e-21
	gb ABB73286.1	uncultured bacterium 2063G	1620-1690/3419	0/71 (0%)	70/81	2e-18
	gb ABE03895.1  PKS	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAE27P20	1631-1701/3248	0/71 (0%)	67/85	4e-15
	gb ACX49735.1  SupA	uncultured marine bacterium 1k6	1641-1711/3453	0/71 (0%)	67/77	1e-09
Fragment 6 SupA, MT-ER Linker						
contig01654 frame2	>gb ABE03915.1  SupA	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18	1743-1897/3403	0/155 (0%)	65/78	1e-52
	>gb ABE03895.1  polyketide synthase	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAE27P20	1747-1901/3248	0/155 (0%)	63/74	5e-52
	gb ABB73286.1  PKS	uncultured bacterium 2063G [bacteria]	1718-1870/3419	0/153 (0%)	65/75	2e-50
	>gb ABE03935.1  SupA	[ <i>T. swinhoi</i> bacterial symbiont clone pSW1H8]	1755-1908/3461	0/154 (0%)	66/75	2e-48
	>gb ACX49735.1  SupA	[uncultured marine bacterium 1k6]	1757-1908/3453	2/155 (1%)	62/72	7e-47
Fragment 7 SupA <sub>ER</sub> (bis ~54 AS)						
contig01213 frame6	gb ABE03915.1  SupA	[ <i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18]	2064-2132/3403	0/69 (0%)	88/92	1e-27
	gb ABE03935.1  SupA	<i>T. swinhoi</i> bacterial symbiont clone pSW1H8 [bacteria]	2077-2145/3461	0/69 (0%)	84/89	3e-26
	>gb ACX49735.1  SupA	[uncultured marine bacterium 1k6]	2077-2145/3453	0/70 (0%)	75/84	3e-23
Fragment 8 SupA Ende von ER (bis ~40 AS) –KR (ab ~54 AS)						
contig01512 frame3	gb ABE03935.1  SupA	<i>T. swinhoi</i> bacterial symbiont clone pSW1H8 [bacteria]	2173-2338/3461	0/166 (0%)	78/89	8e-73
	gb ABE03895.1  PKS	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAE27P20 [bacteria]	2165-2330/3248	0/166 (0%)	75/85	1e-68
	>gb ACX49735.1  SupA	[uncultured marine bacterium 1k6]	2173-2338/3453	0/165 (0%)	73/80	5e-64
	>gb ABE03915.1	[ <i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18]	2161-2325/3403	0/165 (0%)	69/81	3e-63
Fragment 9 SupA <sub>ACP</sub> (ab~65 AS)-KS2(ab ~175 AS)						

contig00502 frame6	gb ABE03935.1  SupA	<i>T. swinhoei</i> bacterial symbiont clone pSW1H8 [bacteria]	2428-2783/3461	3/356	68/79	5e-133
	gb ABE03915.1  SupA	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18	2415-2768/3403	5/356	62/75	1e-118
	gb ABB73286.1  PKS	uncultured bacterium 2063G [bacteria]	2390-2742	10/353	60/72	1e-113
	gb ACX49735.1  SupA	[uncultured marine bacterium 1k6]	2428-2778/3453	6/355	60/72	3e-111
Fragment 10 passt bei den 2 ersten Hits eindeutig besser zu KS2 als zu KS1 supA KS2 (bis ~84) -AT2 Linker						
contig00663 frame3	gb ABE03935.1  SupA	<i>T. swinhoei</i> bacterial symbiont clone pSW1H8 [bacteria]	2935-3142/3461	8/209 (3%)	65/77 (60/74 bei KS1)	2e-70
	gb ABE03915.1  SupA	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18 [bacteria]	2929-3119/3403	8/205 (3%)	61/69 (55/65 bei KS1)	1e-59
	>gb ABB73286.1  putative polyketide synthase	uncultured bacterium 2063G [bacteria]	350-553/3419 (entspr. KS1)	5/205 (2%)	57/71 (57/67 KS2 fast gleich)	1e-56
	>gb ABE03895.1  PKS	<i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAE27P20]	2930-3130/3248	4/203 (1%)	57/68 (58/67 KS2 fast gleich)	5e-56
	>gb ACX49735.1  SupA	[uncultured marine bacterium 1k6]	2930-3136/3453	14/211 (6%)	53/64 (55/64 KS2 fast gleich)	4e-51

Anhang Tab. 3: "blastp"-Analyse von SupD- Sequenzen aus dem Poribakteriengenom.

Bezeichnung	Genbanknr.	Organismus	Position/AS	Lücken/AS	Ident/Positive AS (%)	E-Wert
Fragment 1						
contig01777 frame4	gb ABE03934.1  SupD	[ <i>T. swinhoei</i> bacterial symbiont clone pSW1H8]	45-99/307	0/55 (0%)	74/87	6e-20
	gb ABE03916.1  SupD	[ <i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18]	45-99/331	0/55 (0%)	72/83	1e-16
	ref ZP_02146440.1  3-oxoadipate enol-lactone hydrolase	[ <i>Phaeobacter gallaeciensis</i> BS107]	28-82/262	7/58 (12%)	37/53	1.1
Fragment 2						
contig01801 frame3	gb ABE03934.1  SupD	[ <i>T. swinhoei</i> bacterial symbiont clone pSW1H8]	166-304/307	0/139 (0%)	62/76	2e-47
	gb ABE03916.1  SupD	[ <i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18]	155-305/331	3/154 (1%)	54/70	1e-42
	gb ACL51731.1  putative epoxide hydrolase	[ <i>Pinus peuce</i> ]	52-100/102	0/49 (0%)	38/55	0.11

Anhang Tab. 4: "blastp"-Analyse von SupE Sequenzen aus dem Poribakteriengenom.

Bezeichnung	Genbanknr.	Organismus	Position/AS	Lücken/AS	Ident/Positive AS (%)	E-Wert
Fragment 1						
contig00844 frame1	gb ABE03914.1  SupE	[ <i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18]	9-77/583	0/69 (0%)	62/79	4e-19
	gb ABB73287.1  putative xanthine/uracil permease	[uncultured bacterium 2063G]	2-81/518	0/80 (0%)	53/72	4e-17
	gb EAV46769.1  probable transporter	[ <i>Methylophilales bacterium</i> HTCC2181]	7-76/577	0/70 (0%)	52/65	5e-12
Fragment 2						
contig00490 frame5	gb ABE03914.1  SupE	[ <i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18]	142-263/583	0/122 (0%)	61/73	1e-27
	gb ABB73287.1  putative xanthine/uracil permease	[uncultured bacterium 2063G]	145-266/518	0/122 (0%)	51/69	1e-26

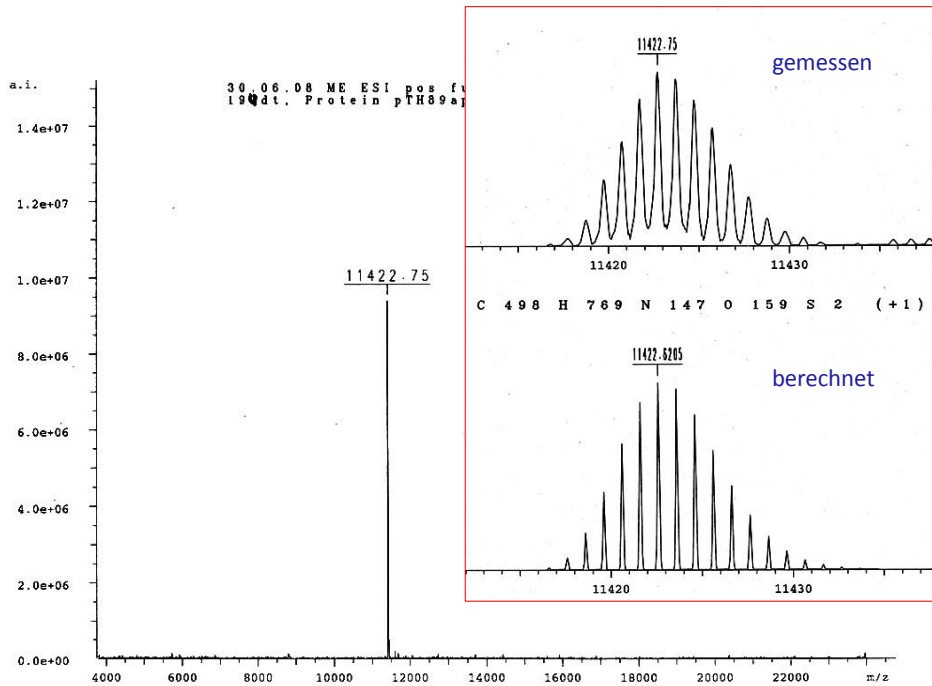
	gb EAV46769.1  probable transporter	[ <i>Methylophilales bacterium</i> HTCC2181]	141-261/577	1/121 (0%)	47/61	8e-20
Fragmente 3+4						
contig00883 frame5	gb ABE03914.1  SupE	[ <i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18]	273-420/583	0/148 (0%)	56/75	3e-42
	gb EEG79530.1  Xanthine/uracil/vitamin C permease	[ <i>Desulfonatronospira thiodismutans</i> ASO3-1]	286-434/586	0/149 (0%)	45/65	3e-33
	gb ABB73287.1  putative xanthine/uracil permease	[uncultured bacterium 2063G]	276-424/518	1/149 (0%)	53/69	6e-33
contig00755 frame1	gb ABE03914.1  SupE	[ <i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18]	337-469/583	1/133 (0%)	66/82	2e-44
	gb ABB73287.1  putative xanthine/uracil permease	[uncultured bacterium 2063G]	345-485/518	1/141 (0%)	62/73	6e-40
	gb EEG79530.1  Xanthine/uracil/vitamin C permease	[ <i>Desulfonatronospira thiodismutans</i> ASO3-1]	350-478/586	3/130 (2%)	40/58	1e-18
Fragment 5						
contig01053 frame3	gb ABE03914.1  SupE	[ <i>A. aerophoba</i> bacterial symbiont clone pAPKS18]	502-578/583	0/77 (0%)	61/71	9e-18
	gb EAV46769.1  probable transporter	[ <i>Methylophilales bacterium</i> HTCC2181]	507-572/577	1/67 (1%)	34/58	0.007
	nur 2 Hits					

Anhang Tab. 5: "blastp"-Analyse von PPTase-Sequenzen aus dem Poribakteriengenom.

Abfrage	Genbanknr./ Bezeichnung	Organismus	Position/AS	Lücken/AS	Ident/Positiv [%]	E-Wert
POR_1407	ref YP_001863782.1  4'-PPTase, HetI	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 [Cyanobacteria]	17-165/239	1/150 (0%)	43/64	2.00E-29
	sp P37695.2 HETI_ANASP 4'-PPTase; hetI	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 [Cyanobacteria]	15-163/237	1/150 (0%)	44/64	6.00E-29
	gb EEG01574.1  4'-PPTase	' <i>Nostoc azollae</i> ' 0708 [Cyanobacteria]	38-187/261	1/151 (0%)	43/62	1.00E-28
POR_0827	ref NP_924897.1  PPTase family protein	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421 [Cyanobacteria]	38-243/255	3/207 (1%)	44/56	4e-37
	ref ZP_03632659.1  4'-PPTase	bacterium Ellin514 [Verrucomicrobia]	45-250/258	2/206 (0%)	40/56	1e-36
	ref YP_001865651.1  4'-PPTase	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 [Cyanobacteria]	44-251/251	3/208 (1%)	38/57	2e-35

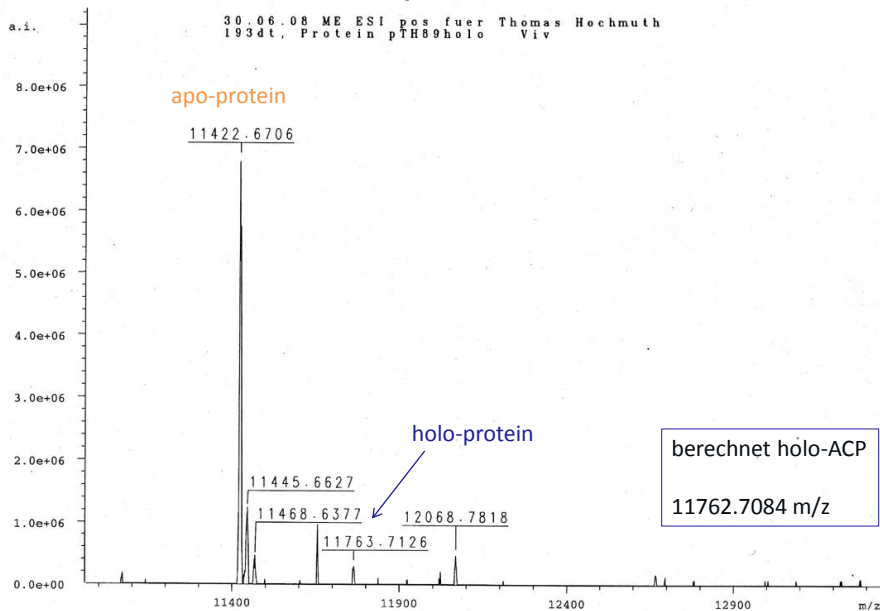
## H 2 Spektren

### H 2.1 ESI-FT-ICR-MS



Anhang Abb. 17: ESI-FT-ICR-MS Spektrum der Elutionsfraktion von pTH89apo.

## supB holo

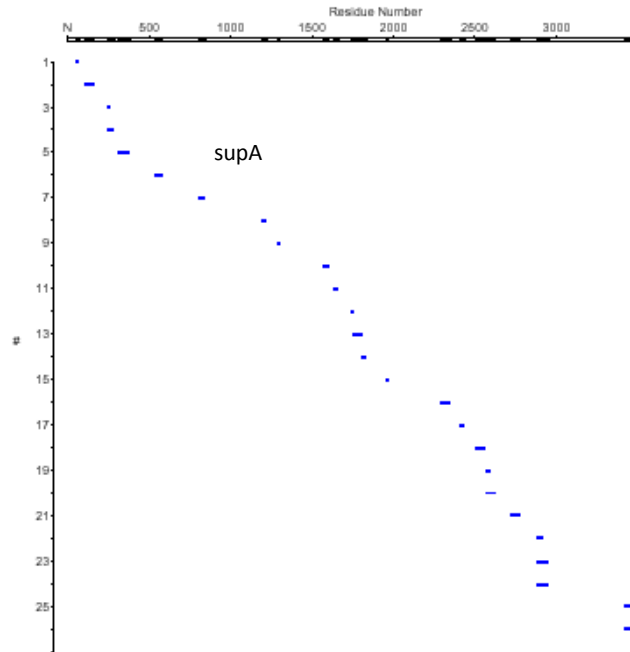


Anhang Abb. 18: Dekonvolviertes ESI-FT-ICR-MS Spektrum der Elutionsfraktion von pTH89holo.



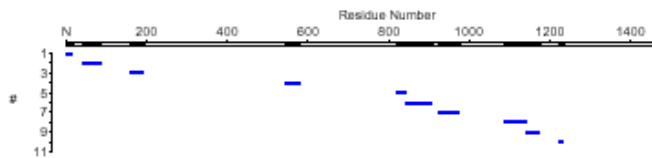
## H 2.2 MALDI-TOF-TOF-MS

### Auswertung der MALDI-TOF Fragmente mit PAWS



1	1335.6	F[64-75]R (+0.95)	R[659-669]R (-1.03)
2	5929.5	F[112-161]R (+0.09)	V[753-809]R (-0.97)
3	1539.7	A[246-261]R (+0.04)	K[1901-1914]R (+1.07)
4	4700.2	A[246-290]R (+1.15)	
5	6522.1	G[318-383]R (+1.09)	A[3028-3091]R (+0.15)

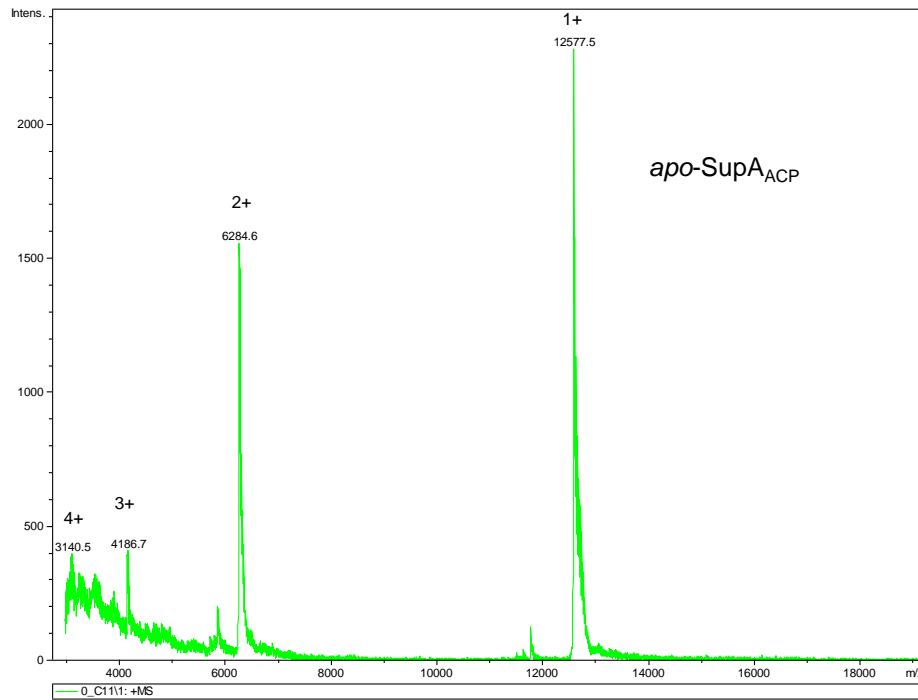
**Anhang Abb. 19:** PAWS-Analyse der Massenfragmente nach tryptischem Verdau von SupA.



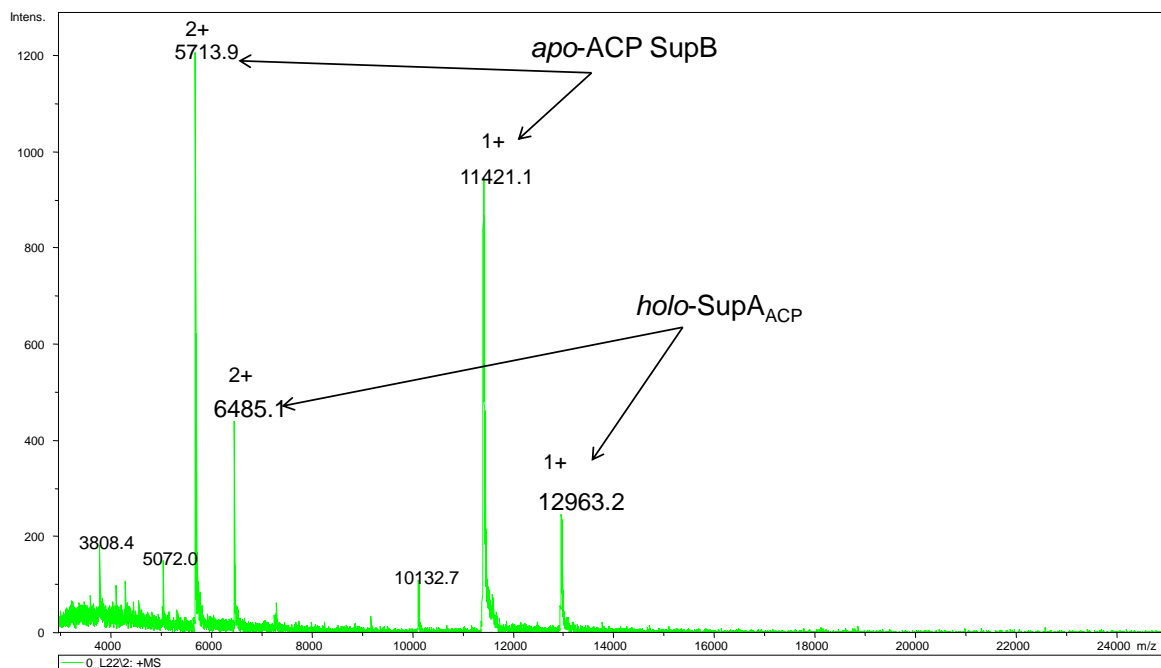
#	Mass	Matching sequence (± error)	
1	1694.7	H[3-16]R (+1.16)	
2	4700.2	L[42-88]R (+3.10)	
3	3838.4	E[161-192]K (-1.09)	
4	3734.7	A[546-578]R (-2.48)	
5	2647.8	K[820-844]R (+1.34)	
6	6591.4	E[846-907]R (+1.00)	H[747-810]R (+3.09)
7	5212.4	A[927-974]R (-1.39)	
8	5929.5	F[1091-1143]R (-0.74)	L[1160-1211]R (+4.44)
9	3319.4	Y[1144-1173]R (-1.60)	
10	1206.6	V[1222-1231]R (+0.90)	
11	1335.6	No matches	
12	1539.7	No matches	
13	1967.6	No matches	
14	2107.5	No matches	
15	2221.5	No matches	
16	2482.1	No matches	
17	2960.9	No matches	
18	3614.5	No matches	
19	4540.7	No matches	
20	4542.1	No matches	
21	5345.4	No matches	
22	5561.7	No matches	
23	5665.4	No matches	
24	5820.7	No matches	
25	6522.1	No matches	
26	6664.1	No matches	

pHN10

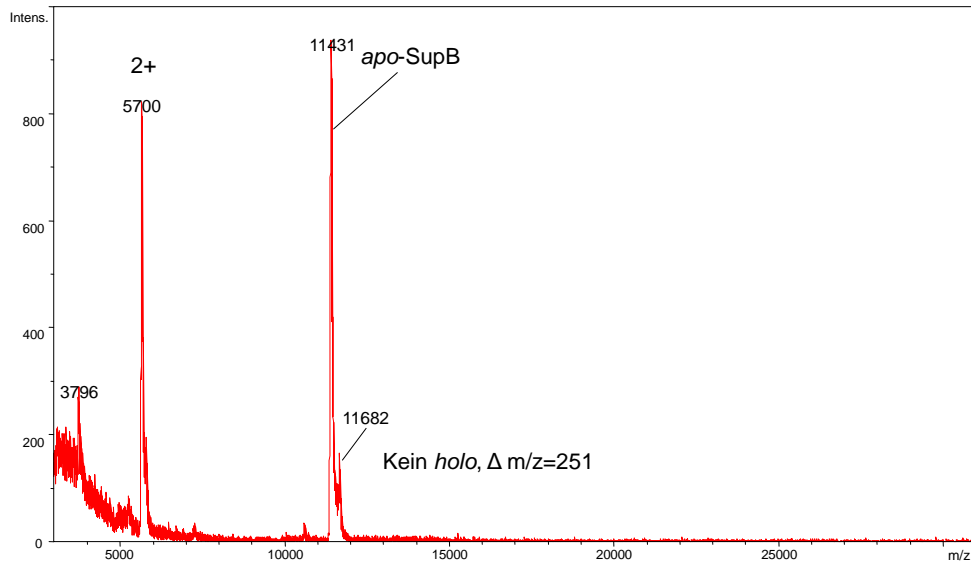
**Anhang Abb. 20:** PAWS Negativkontrolle mit der Sequenz von pHN10 (einer anderen PKS). Nur 10 von 26 Fragmenten für SupA konnte das Programm als Treffer zuordnen.



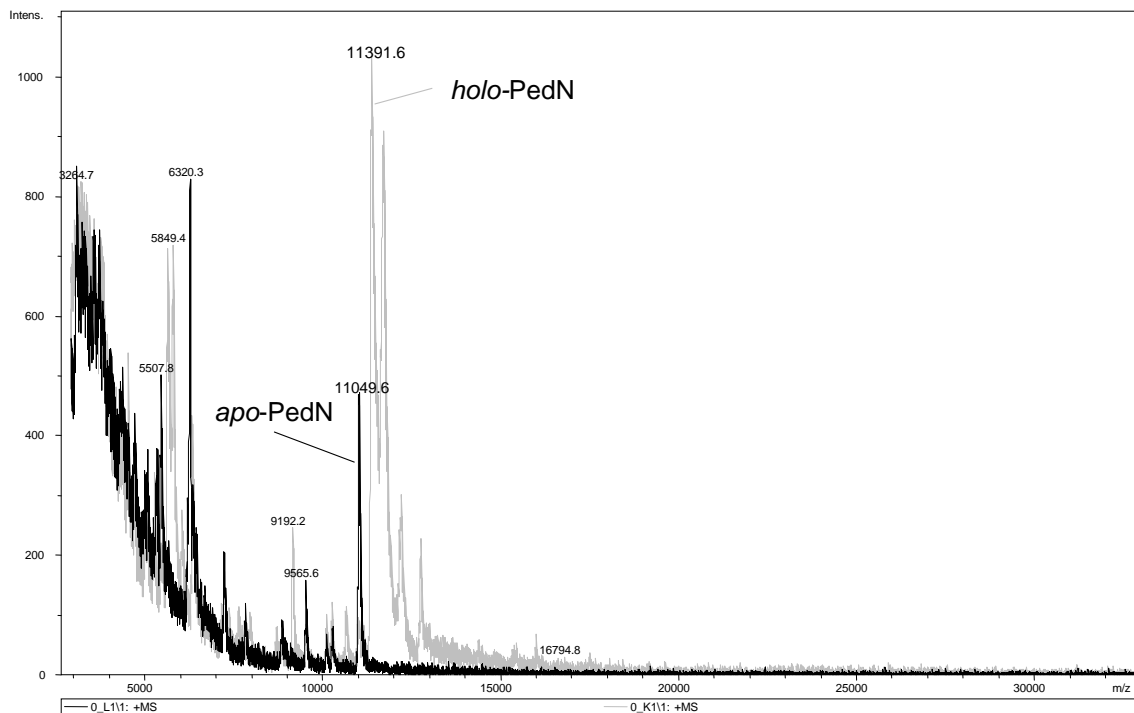
Anhang Abb. 21: *apo-SupA<sub>ACP</sub>*. MALDI/MS.



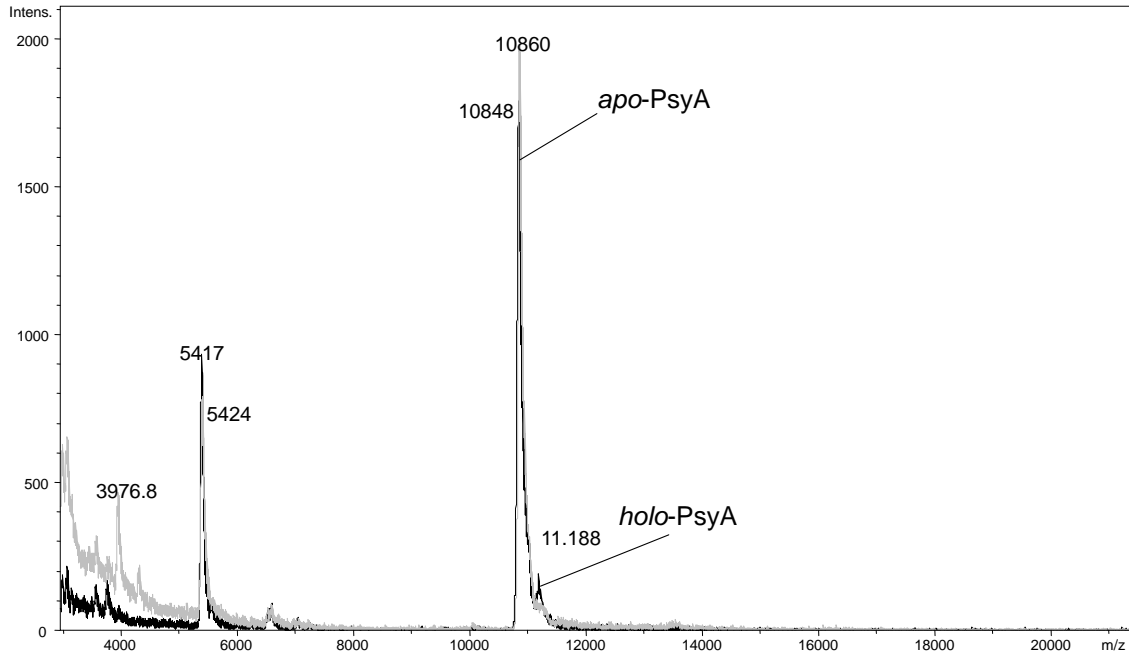
Anhang Abb. 22: *holo-SupA<sub>ACP</sub>*. und *apo-ACP SupB*. MALDI/MS. *In vivo* PPTase Assay mit Svp. Es wurden aus Versehen 2 verschiedene Proben zusammen gemessen.



Anhang Abb. 23: pTH89apo. MALDI/MS.

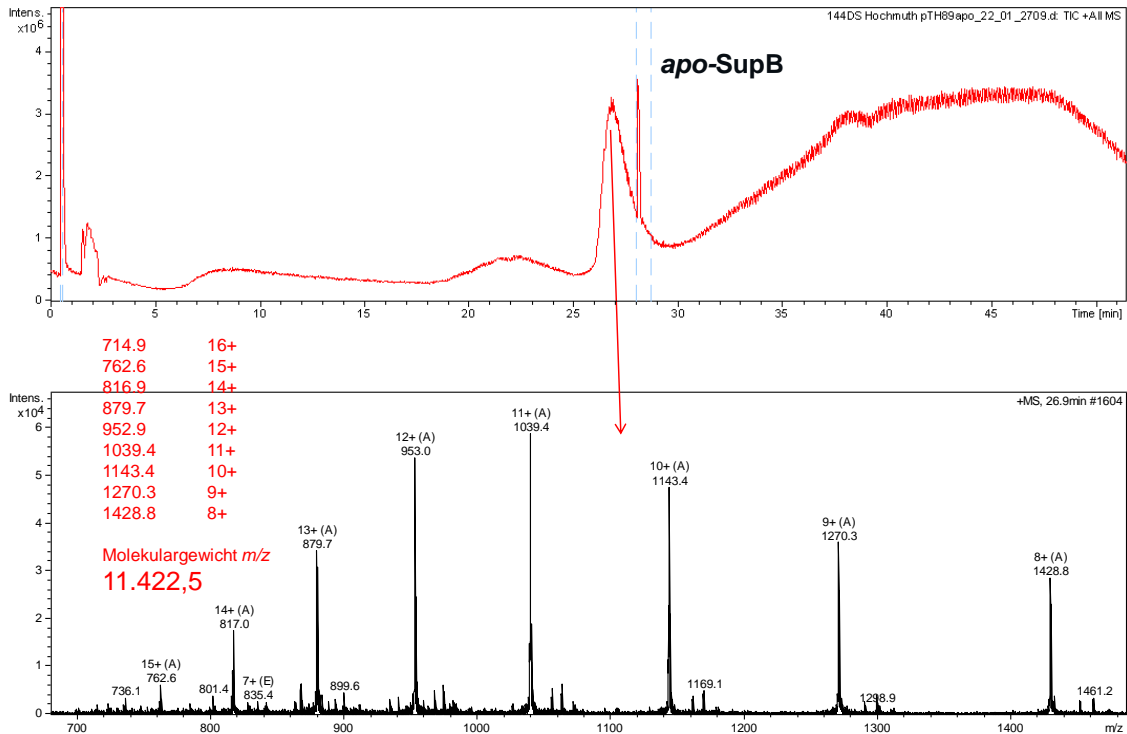


Anhang Abb. 24: PedN MALDI/MS. Overlay zweier Spektren nach *In-vitro*-Phosphopantetheinylierung mit Sfp: schwarz: apo-PedN; grau: holo-PedN.

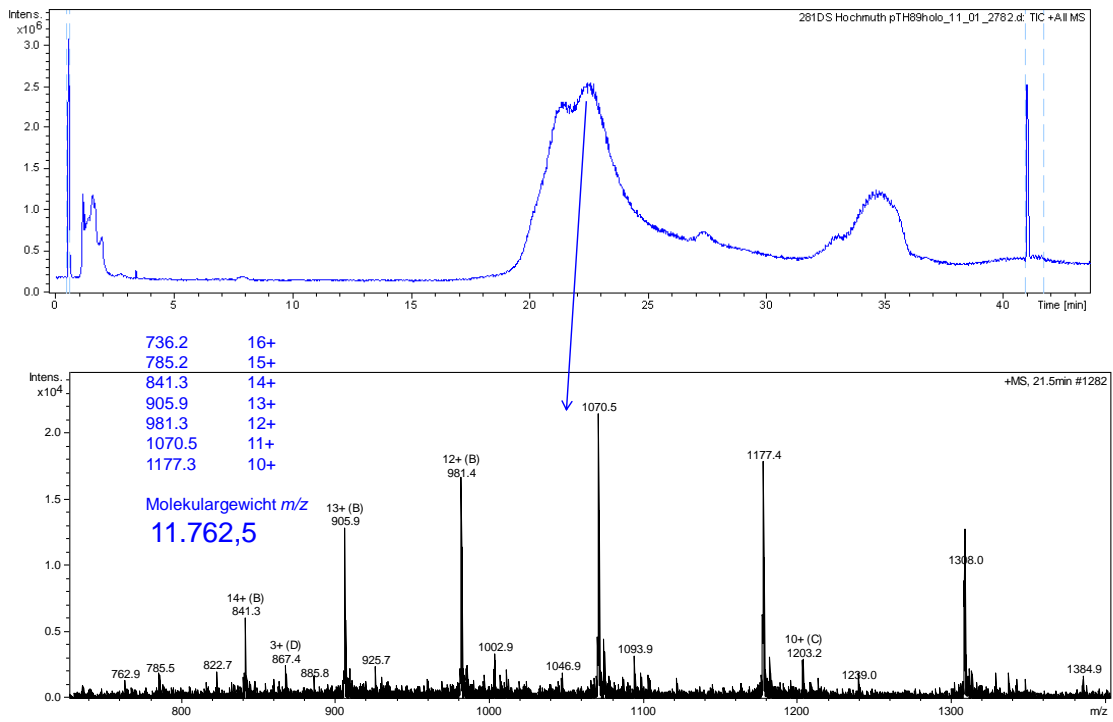


Anhang Abb. 25: PsyA. MALDI/MS. Overlay zweier Spektren nach *in vitro* Phosphopantetheinylierung mit Sfp: schwarz: holo-PsyA; grau: apo-PsyA.

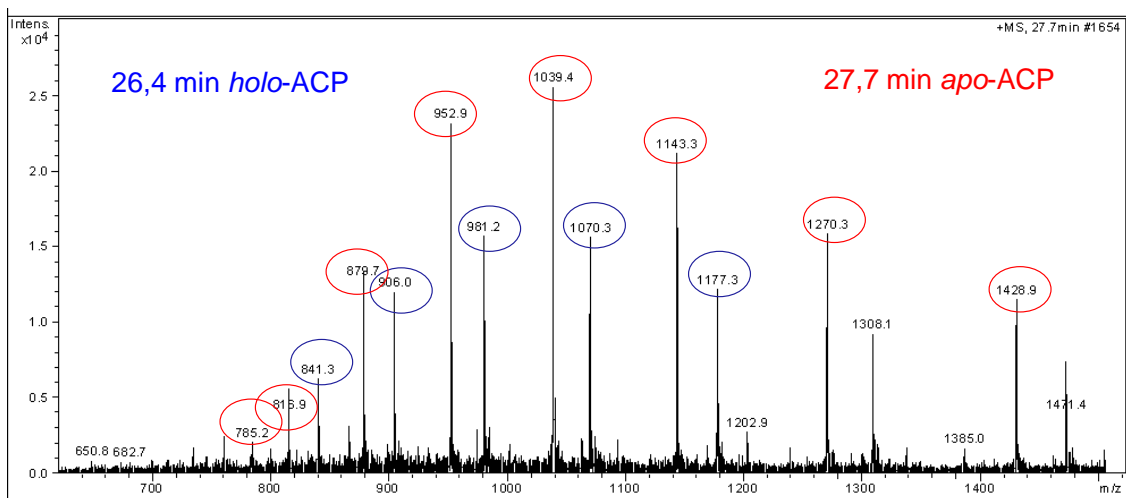
### H 2.3 ESI-micro TOF-Q-MS



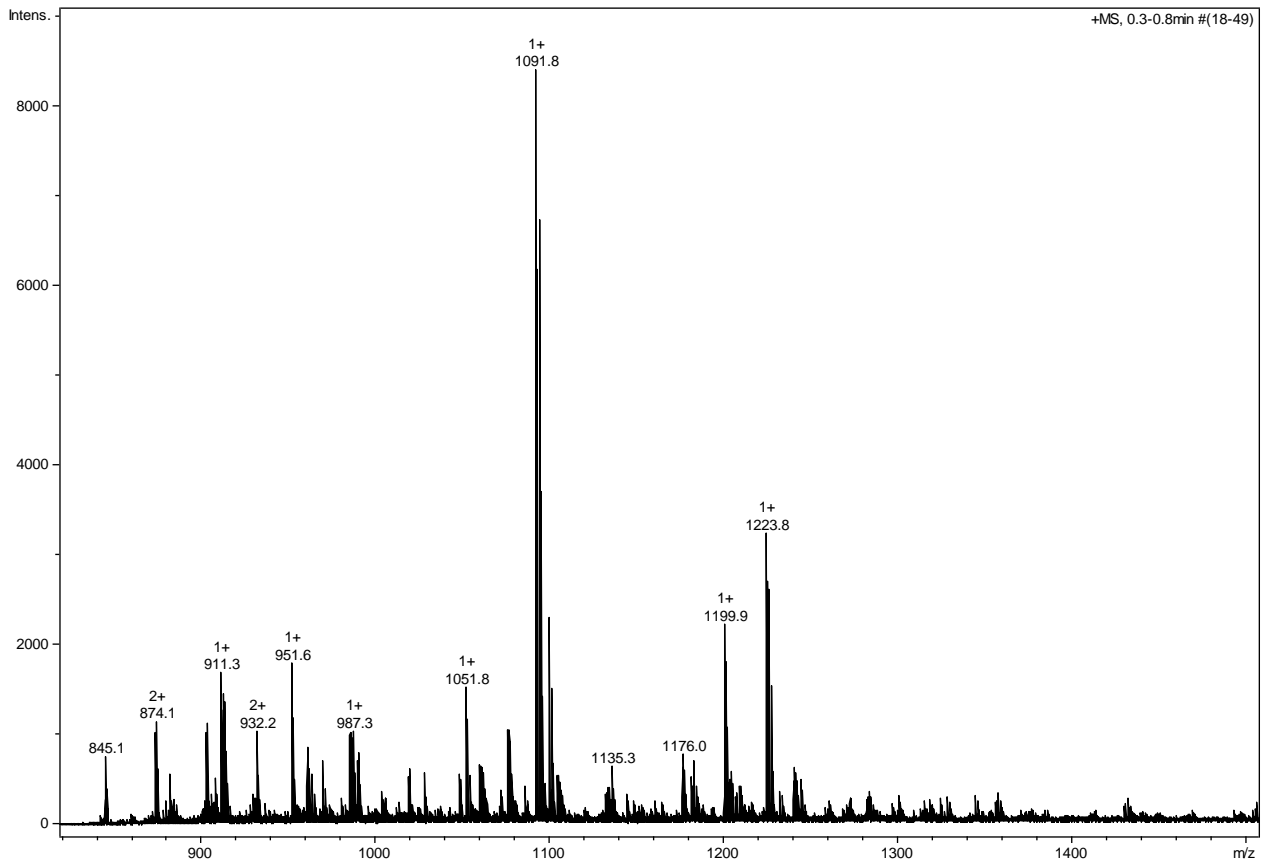
Anhang Abb. 26: apo-SupB. LC/ESI-micro TOF-Q-MS



Anhang Abb. 27: *holo*-SupB. LC/ESI-micro TOF-Q-MS



Anhang Abb. 28: Mischung aus *apo*-SupB und *holo*-SupB. pTH89holo. LC/ESI-micro TOF-Q-MS.

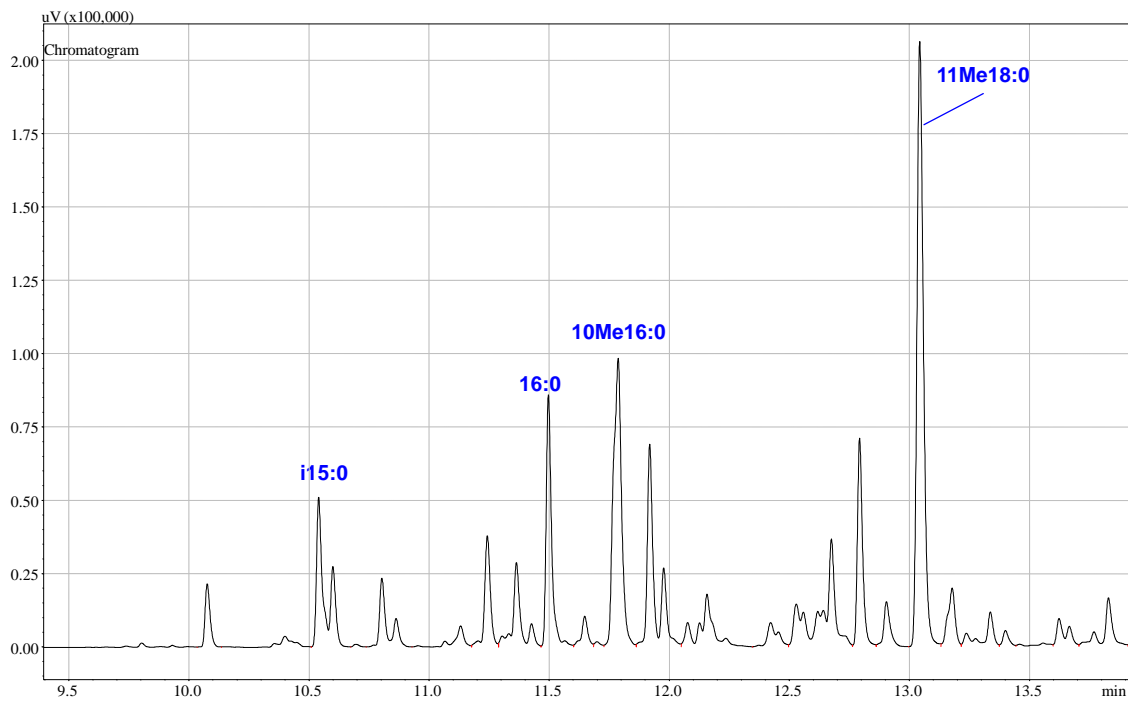
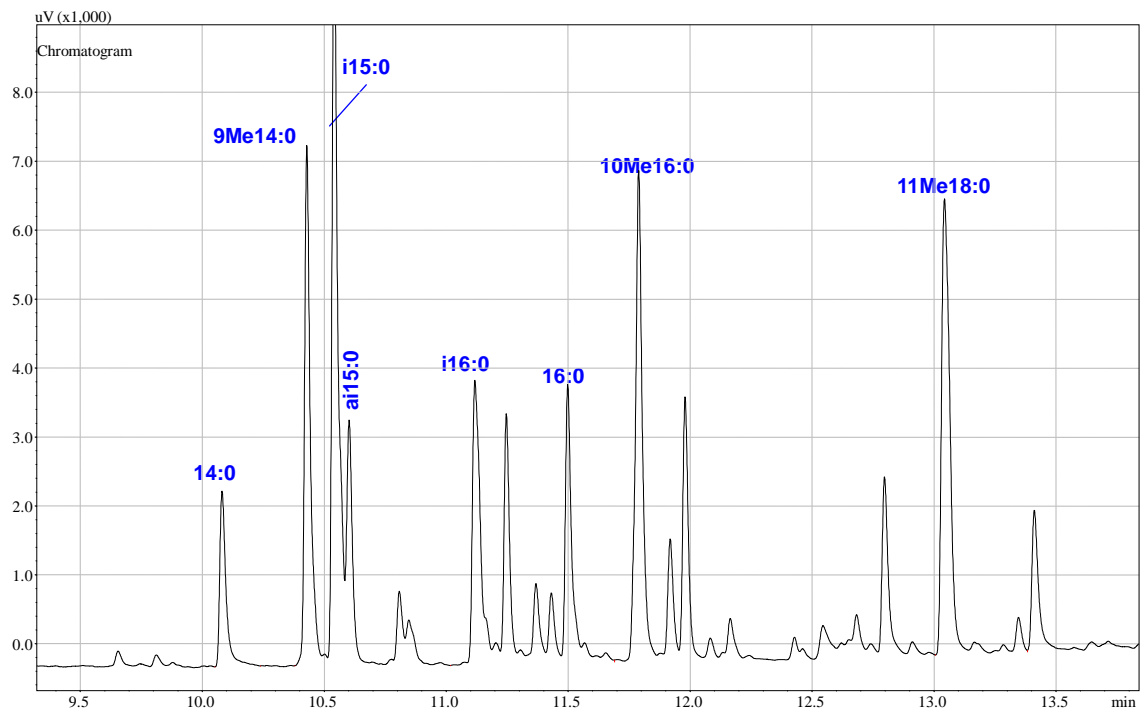


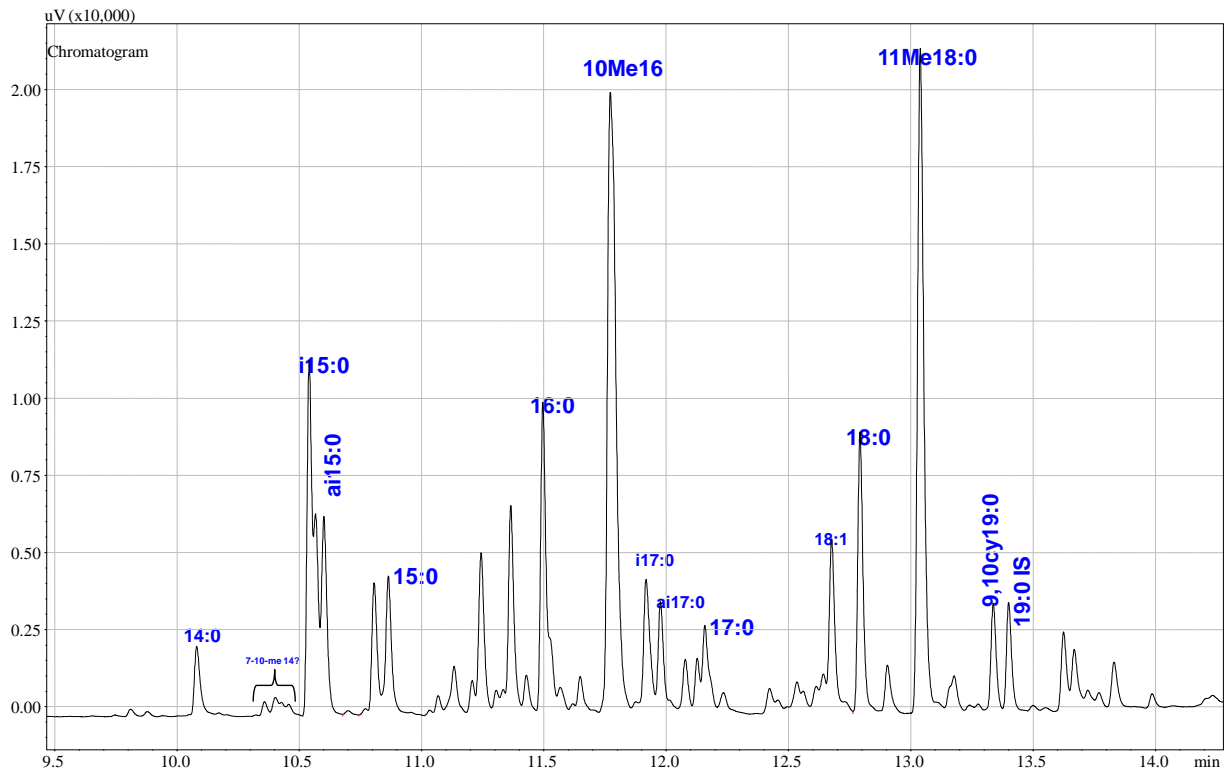
Anhang Abb. 29: SupA .ESI-micro TOF-Q-MS nach tryptischem In-Gel-Verdau. Probe: „SupA all“.

Anhang Tab. 6: Die 50 am meisten abundanten Peaks von „SupA all“.

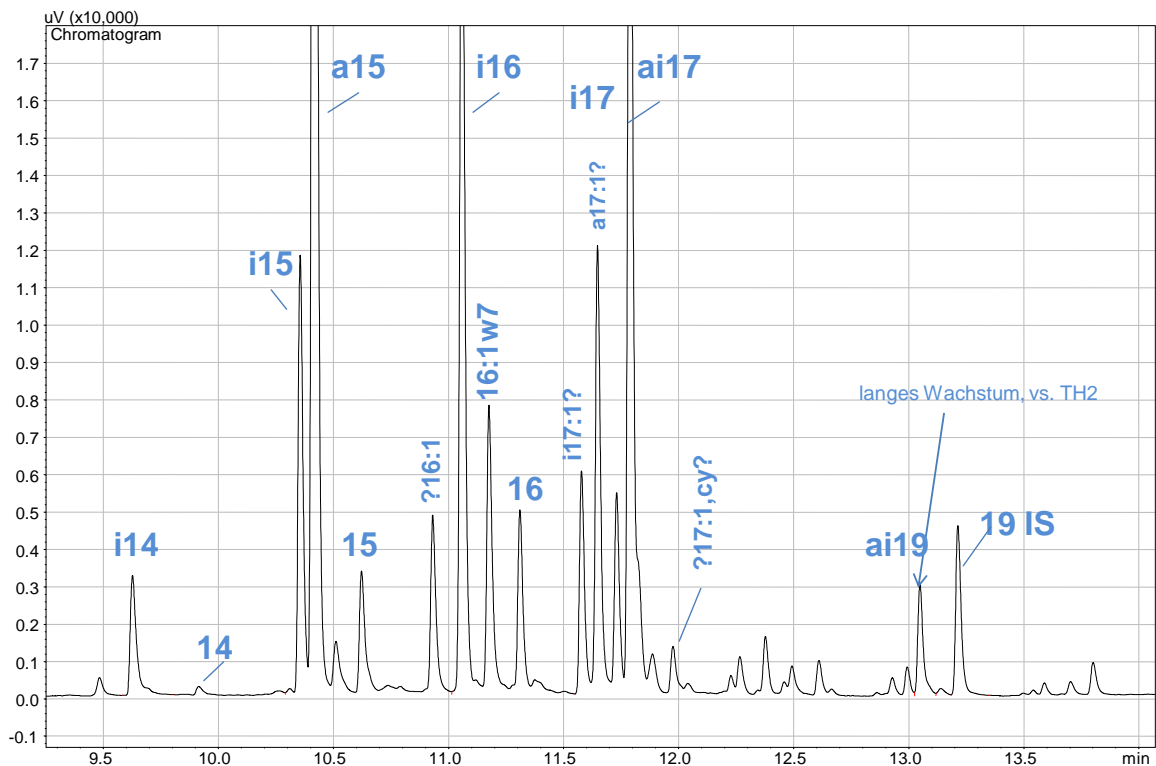
m/z	Intensität	m/z	Intensität	m/z	Intensität
1091.8	8404	913.3	1365	990.2	804
1093.8	6728	952.6	1180	960.7	799
1092.8	6174	1052.8	1176	1176.0	779
1094.8	3710	874.1	1138	845.1	755
1223.8	3245	903.2	1129	844.6	723
1224.8	2714	1201.9	1084	1182.7	712
1225.8	2614	1076.8	1052	969.7	708
1099.7	2311	1075.8	1049	989.7	704
1199.9	2229	987.3	1038	911.7	703
1200.9	1814	932.2	1037	1101.7	676
951.6	1802	873.6	1028	1059.3	662
911.3	1691	902.7	1021	1135.3	656
1226.8	1548	985.3	1016	1060.3	653
1051.8	1527	986.3	970	1061.3	636
1100.7	1513	931.7	968	903.7	636
912.3	1457	961.2	865	1239.8	635
1095.8	1426	914.3	819		

## H 2.4 GC-Spektren

Anhang Abb. 30: *T. swinhoei*, NL-Fraktion. GC-Spektrum der FAME bis N20.Anhang Abb. 31: *T. swinhoei*, GL-Fraktion. GC-Spektrum der FAME bis N20.

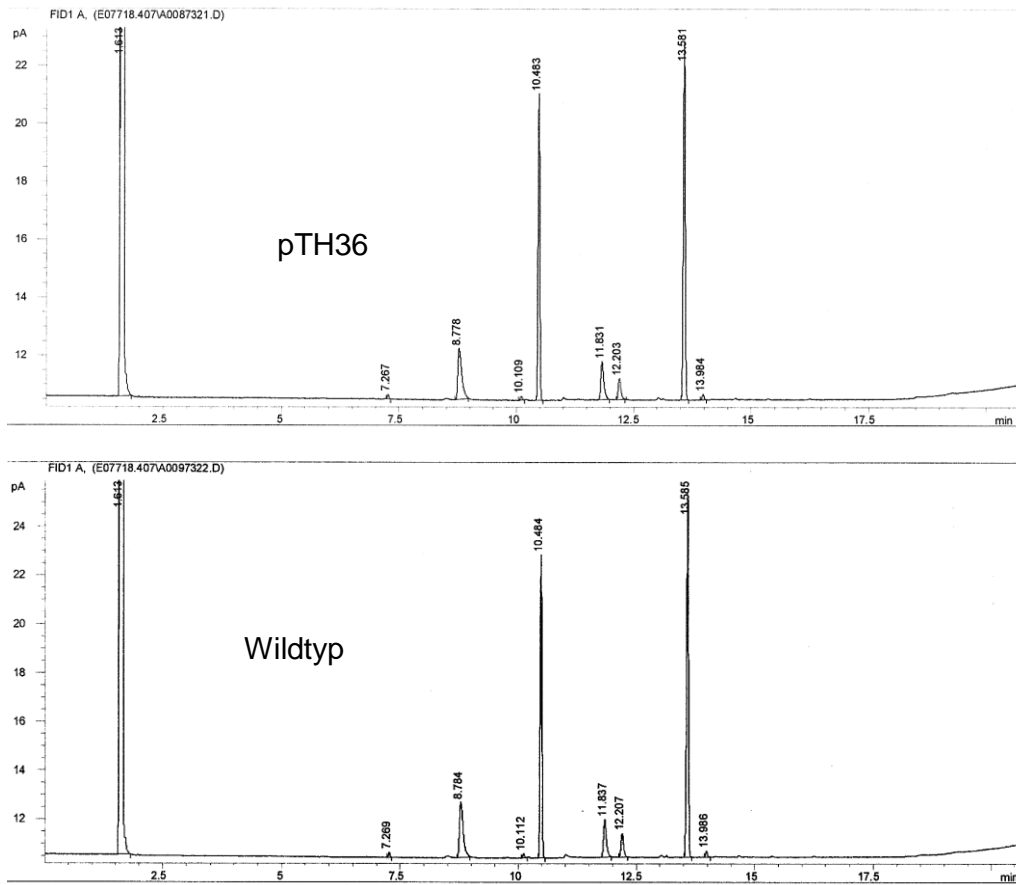


Anhang Abb. 32: *T. swinhoei*, PL-Fraktion. GC-Spektrum der FAME bis N20.



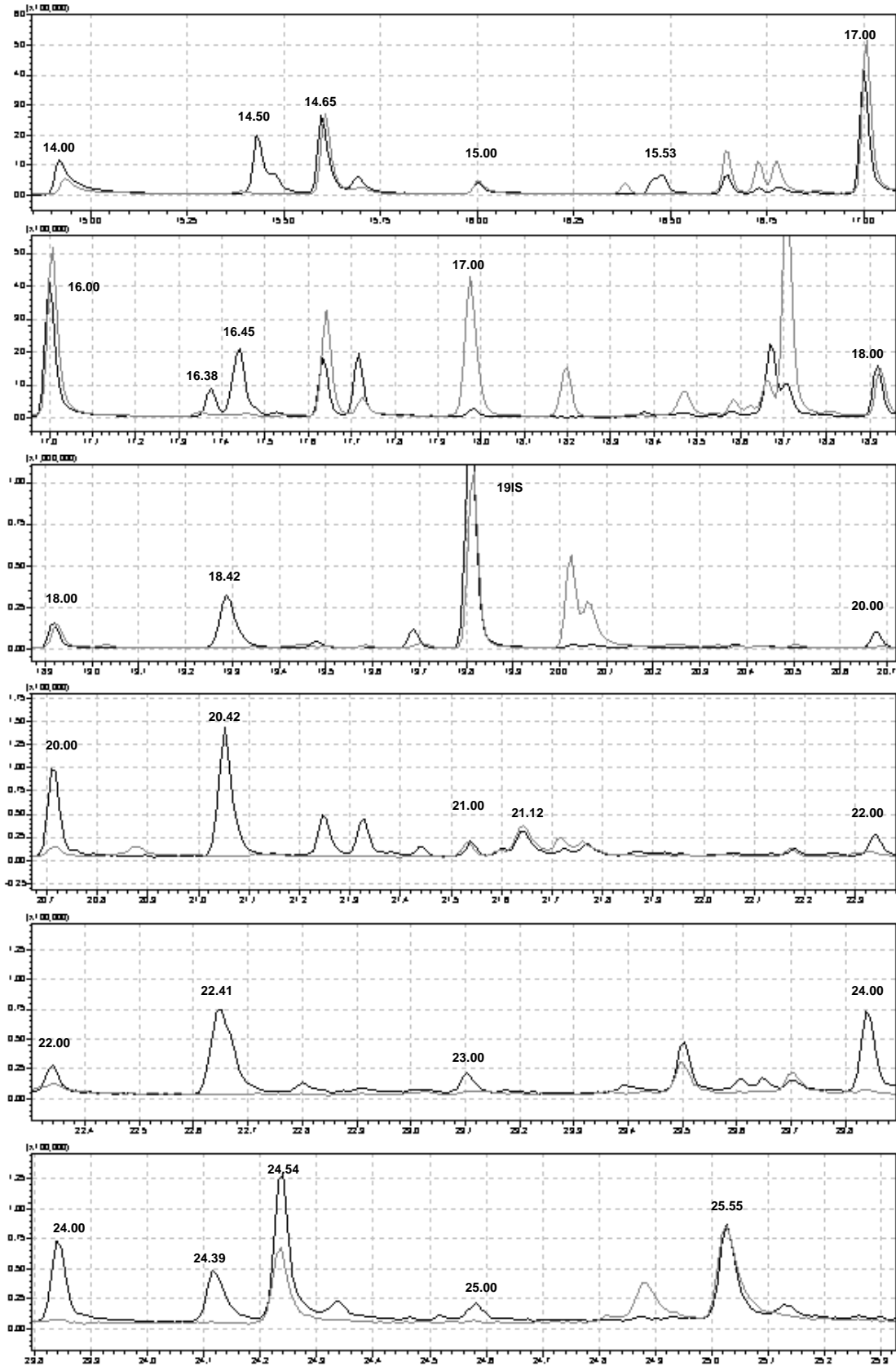
Anhang Abb. 33: *S. albus*. GC der FAME.



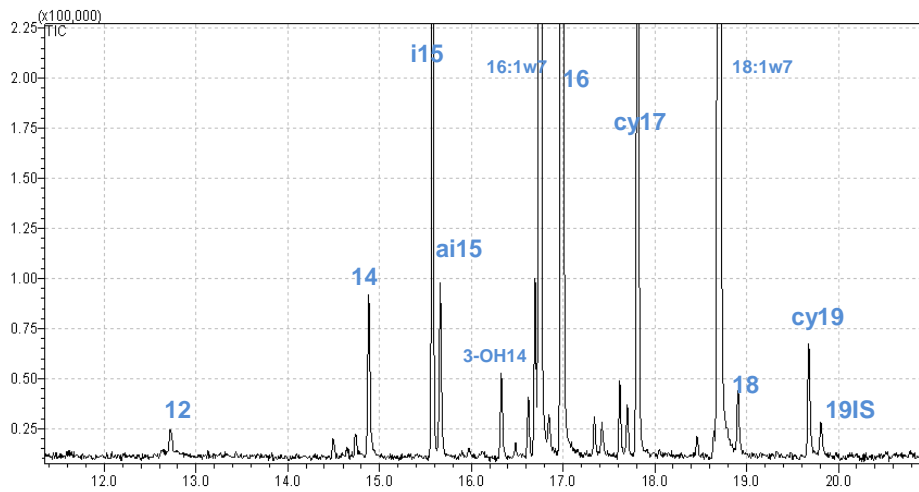


Anhang Abb. 34: *C. glutamicum*. GC-Spektren der FAME. pTH36 enthält den *sup*-Cluster.

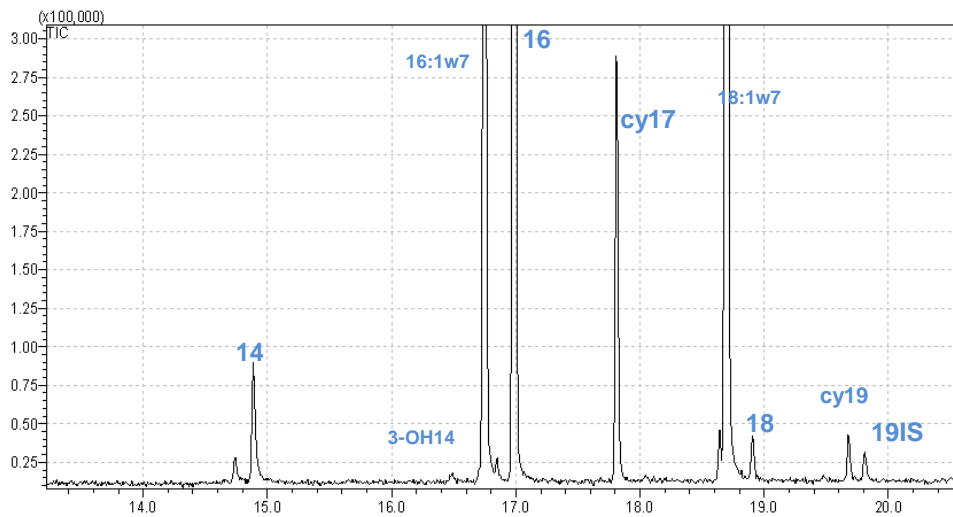
## H 2.5 GC/MS-Spektren



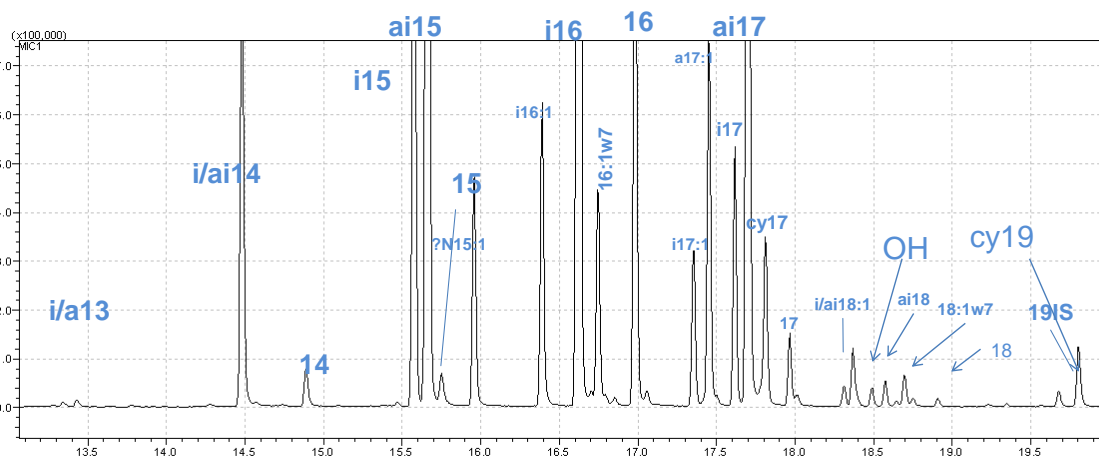
Anhang Abb. 35: HMA LMA GC/MS. MIC  $m/z$  74 und 55; Schwarz: 1707= *A. dilatata* (HMA); grau 1808 *D. etheria* (LMA), beides GL-Fractionen. Zahlenangaben sind ECL-Werte.



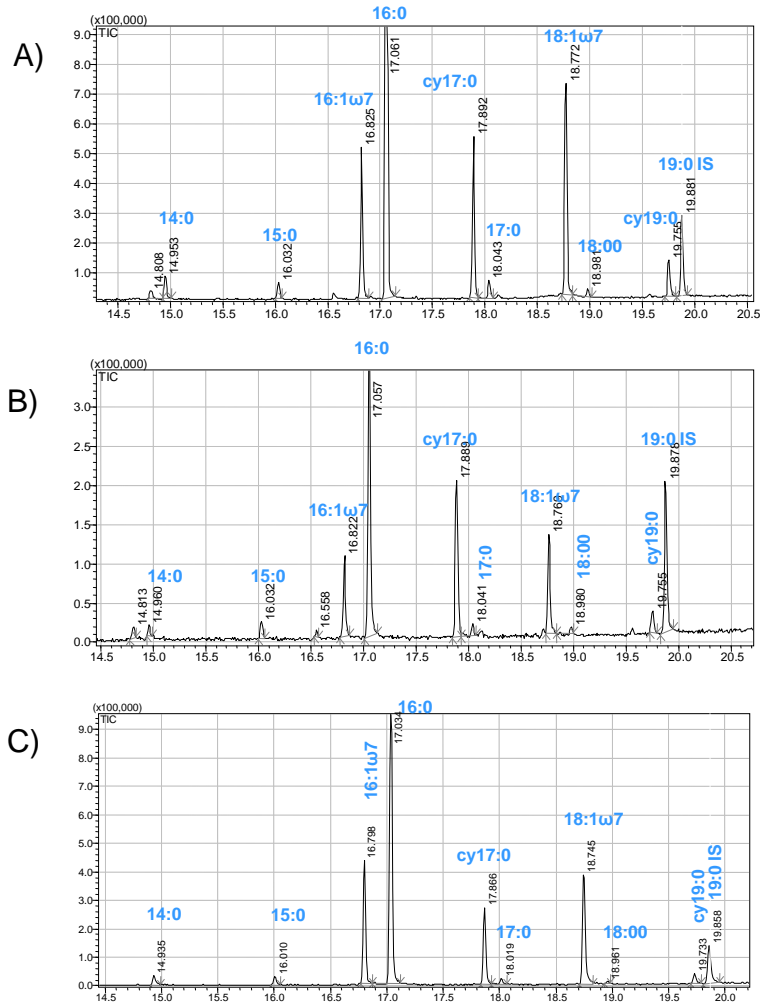
Anhang Abb. 36: *E. coli* BL21(DE3) plus Chaperon-Plasmid pKJE7. GC/MS, TIC. Probe 0718F.



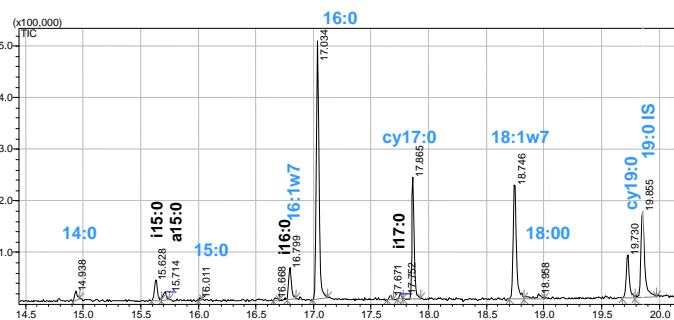
Anhang Abb. 37: SupA in *E. coli* BL21(DE3) mit Chaperon-Plasmid pKJE7. GC/MS, TIC. pTH23*holo*. Probe 0718C.



Anhang Abb. 38: *sup*-Cluster *S. albus* TH2. GC/MS, MIC  $m/z$  74 und 55. Probe1411.



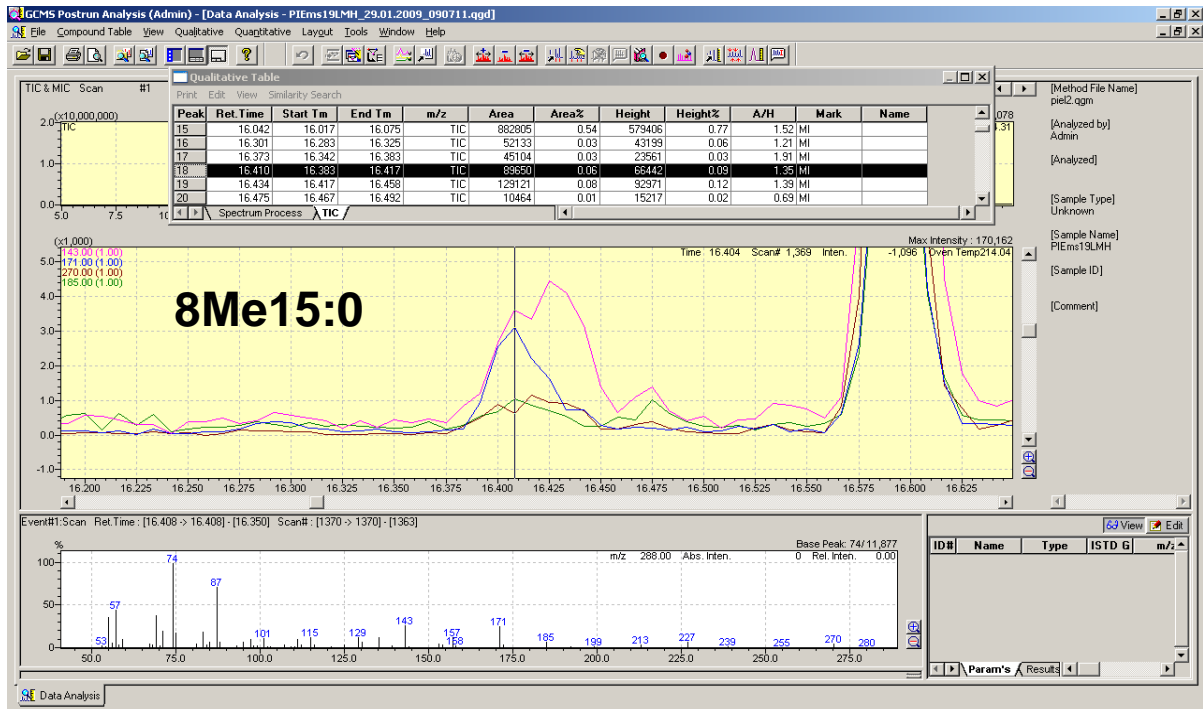
Anhang Abb. 39: GC/MS, TIC, FAME, PLFA von *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup>. **A)** sup-Cluster, pSW1H8. **B)** Negativkontrolle, pPS9F12. **C)** Stamm ohne Plasmid.



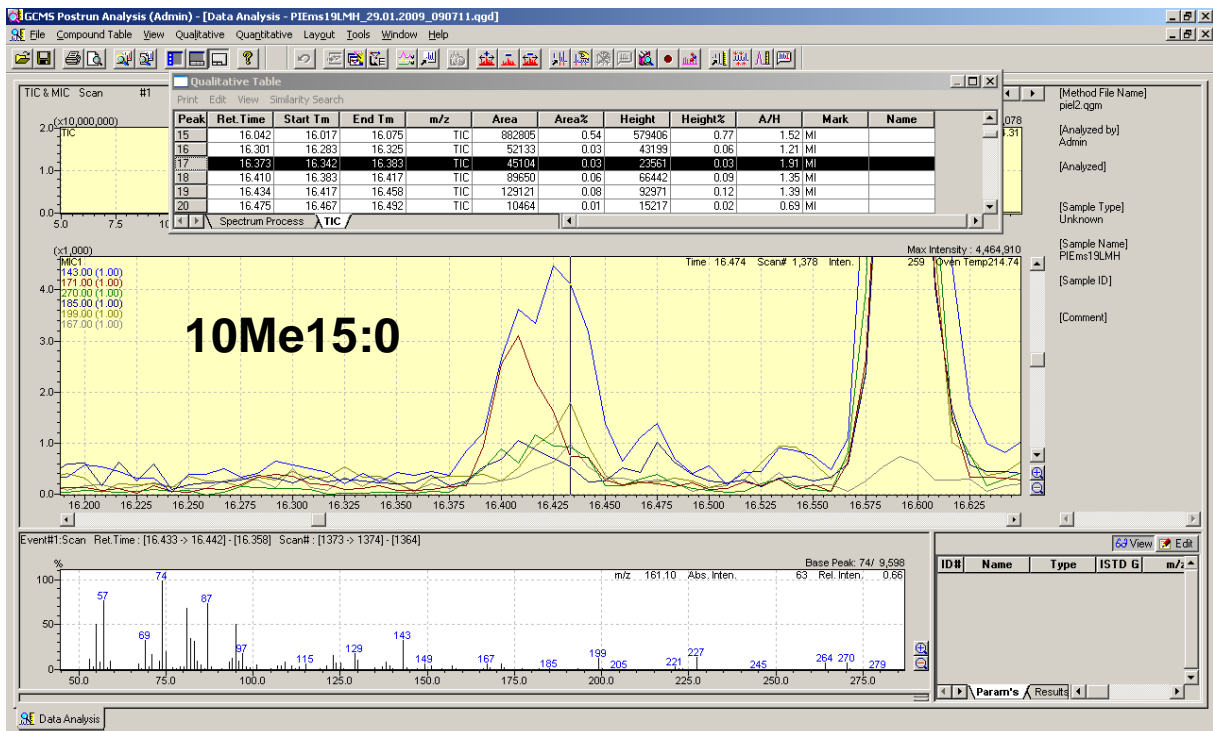
Anhang Abb. 40: GC/MS, TIC, FAME, PLFA von *E. coli* BL21(DE3). Stamm ohne Plasmid.



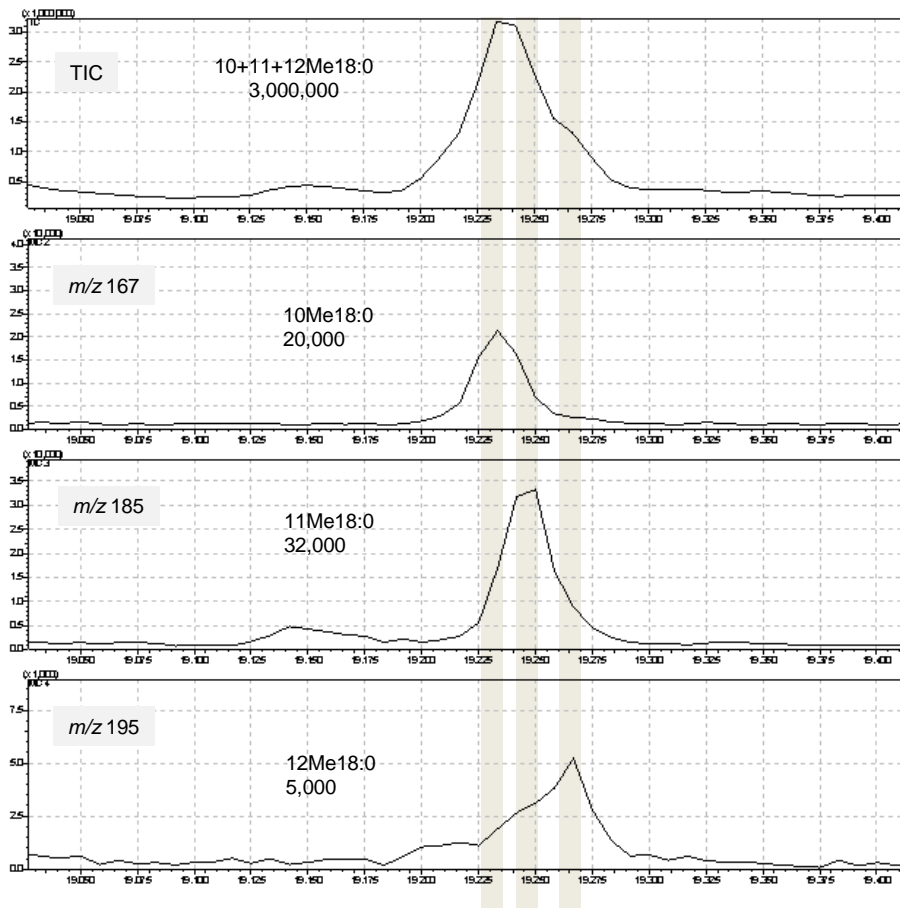
A)



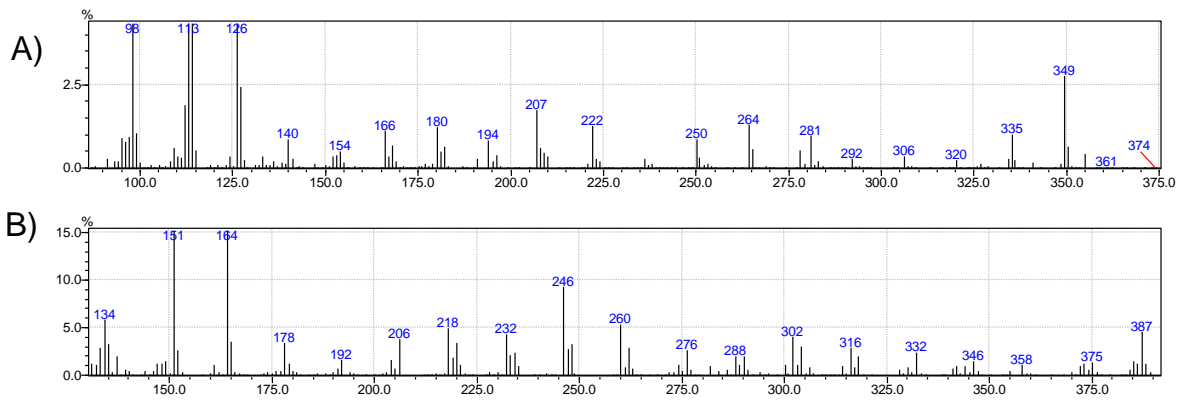
B)



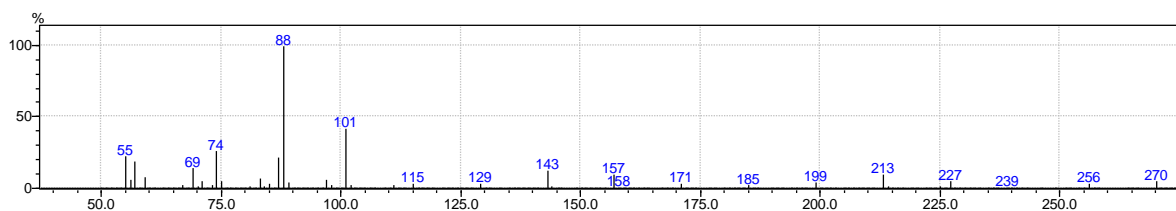
Anhang Abb. 42: 8Me15:0 und 10Me15:0. Overlay mehrerer diagnostischer MICs sowie Massenspektren (FAME). A) 8Me15:0, Probe 19LMH RT 16,408. B) 10Me15:0, Probe 19LMH RT 16,433.



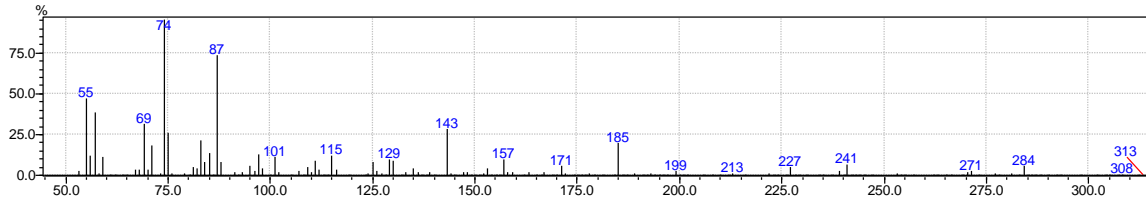
Anhang Abb. 43: Anwendung diagnostischer MICs zur Identifizierung von 11Me18:0 (58) in einem gemischten Peak aus 10+11+12Me18:0.



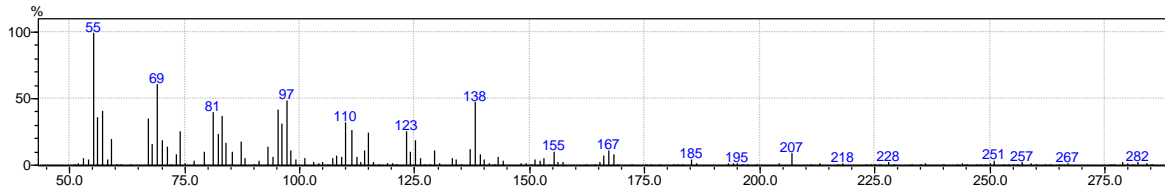
Anhang Abb. 44: EI-MS von 11Me18:1 (70). A) Pyrrolidid:  $m/z$  154/166  $\rightarrow$   $\Delta_6$ , Lücke bei  $m/z$  236  $\rightarrow$  11Me; Probe: 19LMH, RT 23.992. B) Picolinylester:  $m/z$  246  $\rightarrow$  18:1 $\Delta_6$ ,  $m/z$  246 hoch, Lücke bei  $m/z$  274  $\rightarrow$  11Me. Probe: 19NL RT 24,775.



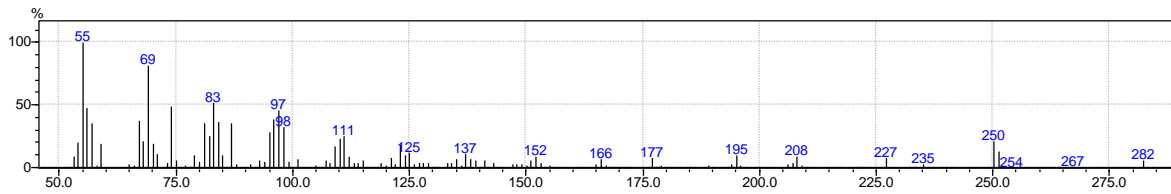
Anhang Abb. 45: EI-MS von 2Me-i15:0 (FAME).



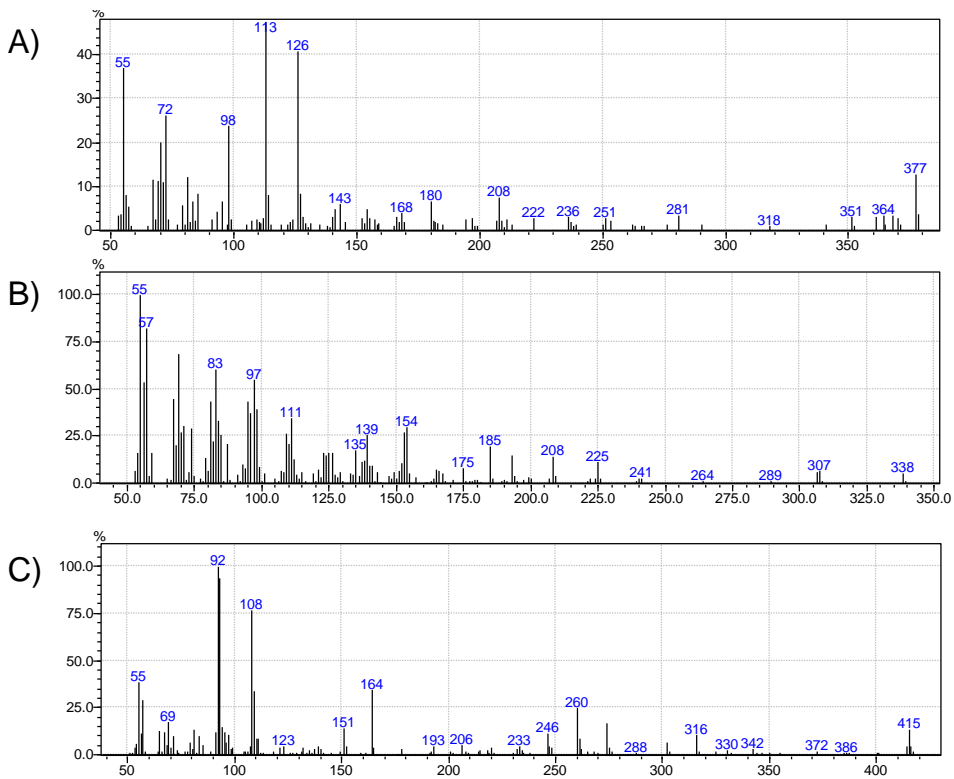
Anhang Abb. 46: EI-MS von 11Me-i16:0 (63) (FAME). *I. felix* NL ECL 16.07, RT 17,025.



Anhang Abb. 47: EI-MS von 7Me16:1 (FAME).



Anhang Abb. 48: EI-MS von i17:1Δ9 (FAME). Charakteristische Peaks:  $m/z$  227,195,177.<sup>[10]</sup> Probe: 083b NL, RT 17,317



Anhang Abb. 49: EI-MS von 8Me20:1Δ7 (69). **A)** Pyrrolidide:  $m/z$  168,180 → x-Me 20:1Δ7,  $m/z$  194 klein und  $m/z$  180, 208 hoch → 8Me; RT 25,292. **B)** FAME:  $m/z$  154 → 8Me; Probe: 19LMH, RT 25,283. **C)** Picolinylester:  $m/z$  260 hoch → x-Me20:1Δ7, Lücke bei  $m/z$  288 → 8Me; Probe: 19NL RT 26,6.

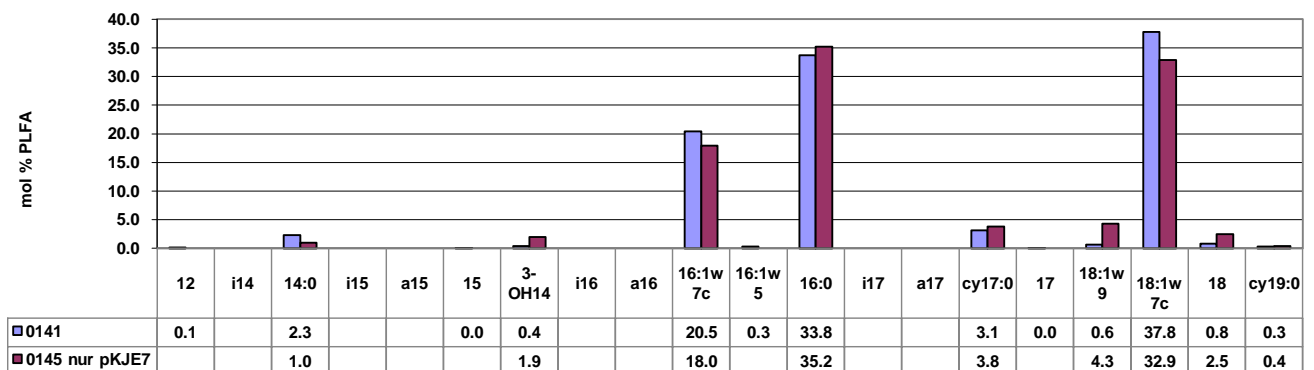


## H 3 Fettsäure- und Lipiddaten

### H 3.1 Fettsäuredaten *E. coli*

Anhang Tab. 7: Fettsäureprofile von *E. coli*, PLFA, kombinierte Fraktionen.

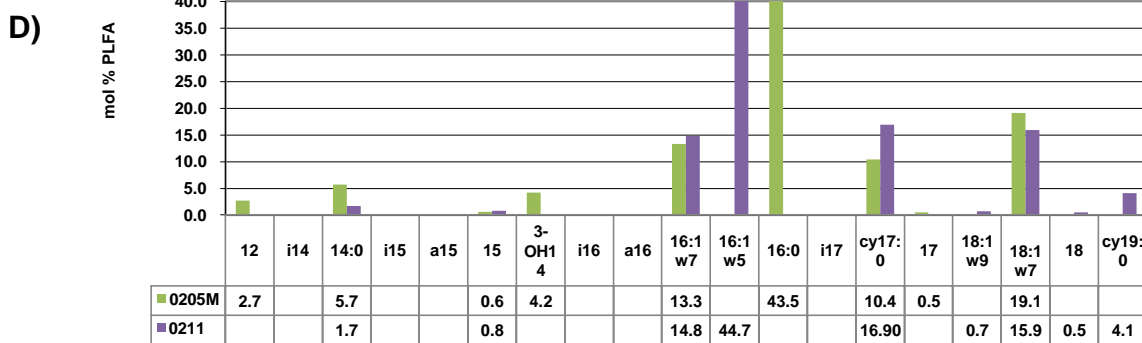
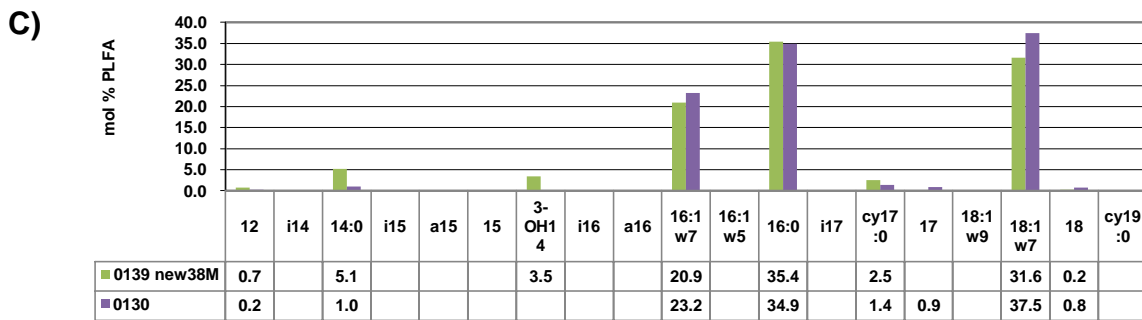
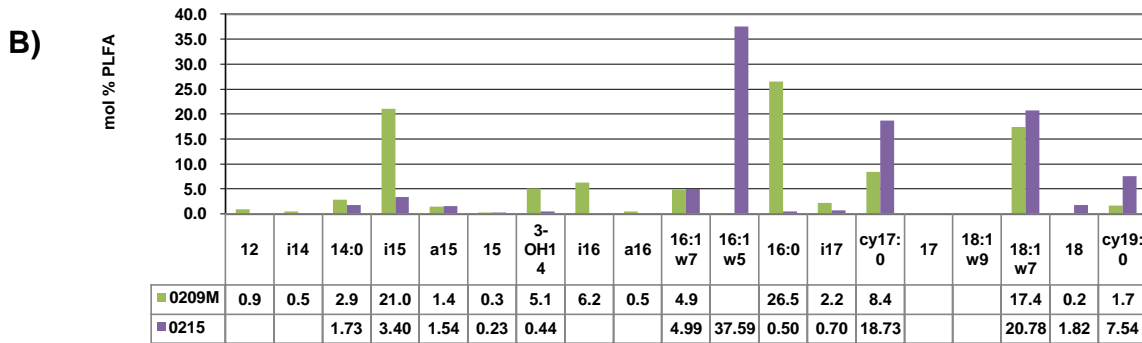
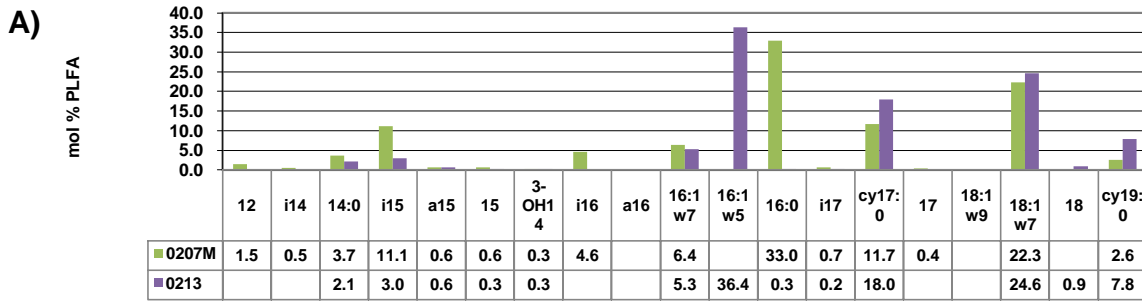
Probe→	0141	0145	0131	0130	014	0215	0213	0214	0211
12:0	0.1			0.2					
14:0	2.3	1.0	1.3	1.0	0.5	1.73	2.1	1.7	1.7
i15:0					1.8	3.40	3.0		
a15:0					0.5	1.54	0.6		
15:0	0.0					0.23	0.3	1.6	0.8
3-OH14:0	0.4	1.9				0.44	0.3		
16:1w7c	20.5	18.0	20.2	23.2	6.9	4.99	5.3	17.7	14.8
16:1w5	0.3								
16:0	33.8	35.2	37.8	34.9	30.6	37.59	36.4	46.8	44.7
i17:0						0.50	0.3		
a17:0						0.70	0.2		
cy17:0	3.1	3.8	4.2	1.4	21.7	18.73	18.0	11.0	16.9
17:0	0.0			0.9					
18:1w9	0.6	4.3	2.0					0.9	0.7
18:1w7c	37.8	32.9	33.1	37.5	34.0	20.78	24.6	18.4	15.9
18:0	0.8	2.5	1.0	0.8	0.4	1.82	0.9	0.3	0.5
cy19:0	0.3	0.4	0.3		3.6	7.54	7.8	1.6	4.1
Stamm	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	XL1-Blue	XL1-Blue
Plasmid	pSW1H8/ pKJE7	pKJE7	pSW1H8/ pKJE7	pTH36/ pKJE7	pTH27	keines	pPD9f12	keines	pPD9F12
Volumen	200 mL	200 mL	200 mL	100 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Temp.	16 + 14°C	16 + 14 °C	16 °C	16 °C	16 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
Zeit	24+16,5 h	24+16,5 h	24 h	24 h	16 h	24 h	24 h	24 h	24 h
IPTG	1 mM	1 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,2 mM	--	--	--	--
Sonstiges	+HCl	+HCl							



Anhang Abb. 50: *E. coli* pSW1H8 *in vivo*.

**Anhang Tab. 8:** Fettsäureprofile von *E. coli*. MIDI-Methode.

Probe→	0118M	0117M	0135M	0134M	0139n38	0209M	0207M	0205M	0218M
12:0					0.7	0.9	1.5	2.7	1.4
i14:0						0.5	0.5		
14:0	5.34	4.5	2.6	5.60	5.1	2.9	3.7	5.7	4.4
i15:0						21.0	11.1		
a15						1.4	0.6		
15:0						0.3	0.6	0.6	
3-OH14:0	0.17	0.4	1.5	3.0	3.5	5.1	0.3	4.2	1.8
i16:0						6.2	4.6		
a16:0						0.5			
16:1ω7c	15.49	15.1	19.30	21.20	20.9	4.9	6.4	13.3	18.2
16:1ω5		0.5							
16:0	36.42	32.3	41.50	38.40	35.4	26.5	33.0	43.5	45.6
i17:0						2.2	0.7		
cy17:0	6.67	7.5	4.00	4.20	2.5	8.4	11.7	10.4	7.6
17:0							0.4	0.5	0.5
18:1ω9	0.25	0.4							
18:1ω7c	27.41	34.1	31.20	27.60	31.6	17.4	22.3	19.1	20.0
18:0	4.44	3.6			0.2	0.2			0.5
cy19:0	1.36	1.6				1.7	2.6		
Stamm	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	XL1-Blue	XL1-Blue
Plasmid	pTH23/ pKJE7	pTH23/ pKJE7	pTH26/ pKJE7	pTH26/ pKJE7	pTH36/ pKJE7	---	pPD9F12	pPD9F12	pPD9F12
Volumen	50mL	50mL	200 mL	200 mL	200 mL	LB Platte	LB Platte	LB Platte	LB Platte
Temp.	16 °C	16 °C	16 °C +14°C	16 C +14 °C	16 °C +14 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
Zeit	64 h	64 h	24 h + 16.5 h	24 h + 16.5 h	24 h + 16.5 h	64 h	64 h	64 h	24 h
IPTG	0.2 mM	0.5 mM	1 mM	0.2 mM	0.2 mM	---	---	---	---
Sonstiges	Hydrolyse	Hydrolyse							



Anhang Abb. 51: Fettsäureprofile von *E. coli*. MIDI- vs. PLFA-Methode.

### H 3.2 *Streptomyces albus*

Anhang Tab. 9: Fettsäuren von *S. albus*.

	SATH2_1	1411	1404	1404w	1412w	1416w	1417w	1418w	1417	1418
ai13:0		0.0								0.1
13:0		0.1								
i14	1.8	3.2	1.6		1.8	3.5	2.3	2.6	1.6	2.6
ai14:0		0.0				1.4	0.3	0.3	0.5	0.5
14:0		0.2	0.2							0.1
i15:0	12.6	5.2	5.3	5.7	5.4	2.0	2.8	1.7	3.8	4.3
ai15:0	15.6	21.9	31.9	22.2	24.8	21.1	15.0	21.5	9.3	30.7
2-OH14:0			0.9						0.9	
N15:1		0.6								0.5
15:0		1.5	1.5		4.0	1.6	0.7	1.3	0.3	0.9
i16:1	1.4	5.0	2.5		1.8	1.0	1.8	0.8	6.1	2.5
i16:0	12.4	22.7	12.9	17.5	23.2	12.2	17.9	13.7	16.0	19.3
ai16:0		0.2							0.4	
16:1w7	12.5	3.4	4.2							1.1
OH15:0		0.1					3.2		2.0	
2-OH15:0						11.3	13.5	5.6	4.4	0.7
16:0	10.1	4.3	2.4	16.7	15.0	18.3	15.2	19.8	1.5	4.6
i17:1	3.1	2.7	2.8						2.4	1.0
ai17:1	5.3	6.1	6.3						4.1	2.8
i17:0	3.1	1.9	2.6	8.8	2.6	3.5	3.6	2.9	1.3	2.5
ai17:0	11.3	14.3	18.2	29.2	17.9	11.5	11.1	15.7	7.5	21.7
cy17:0	6.5	2.7	0.8							0.9
17:0		0.5	0.6		1.4	0.5	0.2	1.8	0.1	0.6
i18:1		0.4	0.2						0.2	0.1
ai18:1		1.4	0.5						0.7	0.5
18:1?/OH17:1?		0.3							0.4	0.2
ai18:0		0.2	0.7						0.1	0.4
18:1w7	4.4	0.5	0.1						0.6	0.8
18:1w5		0.1	0.3							
18:0		0.0	0.4			11.9	12.4	12.4	0.5	0.7
i19:0			0.5							
ai19:0			1.5							
cy19		0.2	0.0							
ai20:0			0.1							
20:1			0.2							
20:0			0.4							
ai21:0			0.2							
Plasmid	pTH60	pTH60	wt	wt	pTH60	pTH60	S. a. TH1	S. a. TH3	S. a. TH1	S. a. TH3
Volumen	1/2 Platte	25 mL	75 mL	75 mL	75 mL	75 mL				
Zeit	64 h	92 h	116 h	116 h	116 h	116 h	160 h	96 h	160 h	96 h
temp	30 °C	29 °C	29 °C	29 °C	29 °C	29 °C	27 °C	30 °C	27 °C	30 °C
	B&D, maa	B&D, maa	B&D, maa	M/H	M/H	M/H	Prot Lysat M/H	Prot Lysat M/H	Prot Lysat B&D, HCL/MeOH	Prot Lysat B&D, HCL/MeOH
	Cluster	Cluster			Cluster	Cluster	Cluster	SupA	Cluster	SupA

### H 3.3 Lipidextraktion

Anhang Tab. 10: Massen und Farbtöne der Schwammlipide

Schwamm	Farbe	Trockenmasse	Lipide	Farbe der Lipide
<i>Cacospongia mycofijiensis</i> #5	fleischfarben	2,795 g	0,224 g (8%)	hellgelb
<i>Dysidea avara</i>	hell-altrosa	0,522 g	0,122 g (23%)	gelb-braun
<i>Ircinia felix</i> 2004	altrosa	1,678 g	0,187 g (11%)	grün
<i>Ircinia felix</i> 2008	hell-altrosa	2,856 g	k.A.	hellgelb
<i>Agelas dilatata</i>	dunkelbraun	2,429 g	0,268 g (11%)	orange
<i>Dysidea etheria</i>	grau	2,885 g	0,260 g (9%)	orange-braun
<i>Theonella swinhoei</i> (weiß)	hellgelb	1,870 g	0,114 g (6%)	hellgelb

### H 3.4 Schwammfettsäuren

Anhang Tab. 11: Fettsäurezusammensetzung von sechs marinen Schwämmen, komplette Tabelle. Angaben in mol %.

ECL	Schwamm →	<i>Theonella swinhoei</i>			<i>Cacospongia mycofijiensis</i>			<i>Agelas dilatata</i>			<i>Ircinia felix</i> 2008			<i>Dysidea etheria</i>			<i>Dysidea avara</i>		
	Probe → milde alkal. Methanolyse	0803b NL	0802b GL	PL1-4	19 NL	19GL	PL1-4	1703 NL	1707 GL	PL1-4	15 NL	15 GL	15 PL1-4	1804 NL	1808 GL	PL1-4	1601 NL	1605 GL	1609 PL
	nmol gesamt	17140	18950	10863	39527	9003	40628	1236	766	961	403	291	171	8723	1469	7198	4385	1430	2810
9.55	i11:0	0.02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.21	---	---	---	---	---	---	---
10.82	ai11:0	0.01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
11.00	11:0	---	---	---	---	---	0.01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12.00	12:0	0.05	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12.65	i13:0	0.09	---	---	0.05	---	---	0.02	---	---	---	0.20	---	---	---	---	---	---	---
12.72	ai13:0	0.04	---	---	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
13.00	13:0	0.02	---	---	---	---	---	0.01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
13.65	i14:0	0.11	0.23	---	0.15	---	0.02	0.92	0.13	---	0.17	0.33	---	0.25	---	---	---	---	---
13.75	14:1	0.20	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
14.00	14:0 <sup>[a]</sup>	2.90	4.08	0.12	2.08	1.80	0.98	7.33	2.86	0.26	3.86	4.87	---	1.83	1.61	0.10	2.07	0.49	1.03
14.36	2Me14:0	0.05	---	---	0.04	---	0.14	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
14.40	3Me14:0	0.09	0.07	0.02	0.16	---	0.07	---	---	---	---	0.78	---	---	---	---	---	---	---
14.46	8Me14:0	0.72	---	0.28	0.05	---	0.07	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
14.50	9Me14:0 <sup>[b]</sup>	0.27	5.74	0.09	0.22	5.22	0.03	0.11	3.97	---	---	0.41	---	---	---	---	---	---	---
14.53	10Me14:0	0.11	0.32	0.05	0.04	---	0.01	0.15	0.90	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
14.59	11Me14:0	---	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
14.65	i15:0	4.00	13.10	1.79	12.21	18.47	8.63	13.14	4.73	2.37	10.84	10.90	5.00	4.80	4.71	1.88	0.94	0.22	1.77
14.72	ai15:0	1.48	8.32	1.03	5.94	7.79	2.72	7.29	1.48	1.58	7.11	6.28	5.09	0.33	0.46	0.09	0.26	0.31	0.29
14.82	15:01a	0.09	0.21	---	---	---	0.02	0.18	---	---	2.26	1.10	---	---	---	---	---	---	---
14.92	15:01b	---	0.15	---	---	---	0.01	---	---	---	0.78	0.37	---	---	---	---	---	---	---
14.99	2Me-i15:0 <sup>[c]</sup>	---	---	---	---	---	0.32	---	---	---	---	---	0.35	---	---	---	---	---	---

15.00	15:0 <sup>[c]</sup>	1.81	1.89	0.29	1.50	0.93	0.57	2.48	0.75	---	1.81	1.77	---	0.55	0.54	0.23	0.32	0.12	0.42
15.03	3Me- <i>i</i> 15:0	0.12	0.17	0.14	1.06	0.44	0.85	---	---	---	---	4.14	1.38	---	---	---	---	---	---
15.09	8Me- <i>i</i> 15:0	---	0.26	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15.11	10Me- <i>i</i> 15:0	1.01	0.66	2.34	0.66	---	0.84	0.58	---	0.85	0.50	0.81	0.54	---	---	---	---	---	---
15.15	MeC16:0 <sup>[d]</sup>	---	---	0.09	---	---	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15.15	PUFA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.09	---	---	---	---	---
15.36	2Me15:0	0.08	---	0.03	0.24	---	0.58	---	---	---	0.13	---	0.12	---	---	---	---	---	---
15.40	3Me15:0	0.04	---	0.02	0.48	---	0.29	---	---	---	0.16	2.01	0.16	---	---	---	---	---	---
15.45	8Me15:0 <sup>[e]</sup>	0.14	2.26	0.12	---	2.36	0.02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15.49	10Me15:0	1.13	0.07	0.23	0.70	1.09	0.24	0.56	1.00	0.06	---	0.56	---	---	---	---	---	---	---
15.53	11Me15:0	---	---	---	---	---	0.03	0.13	1.01	0.13	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15.57	16:2Δ5,9	3.97	1.17	0.87	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15.58	12Me15:0 <sup>[c]</sup>	---	---	0.56	---	---	0.02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15.65	<i>i</i> 16:0	1.93	3.43	0.90	1.59	3.66	0.68	1.78	1.07	0.39	2.51	1.89	0.83	2.32	1.89	1.35	2.07	1.13	4.83
15.73	<i>a</i> 16:0	1.14	0.56	0.85	1.23	0.18	1.85	0.66	0.44	---	1.09	0.10	1.17	1.86	3.21	1.13	0.89	0.38	1.49
15.77	16:1ω7	4.78	2.90	3.28	1.61	0.55	1.10	4.44	0.45	1.65	1.30	---	---	2.63	4.03	0.51	2.85	1.13	1.20
15.87	16:1ω5	1.05	1.54	0.34	0.47	---	0.14	0.17	---	---	---	---	---	---	0.72	0.03	1.00	---	0.39
16.00	16:0	6.97	7.73	2.91	6.47	5.86	3.10	11.13	6.74	4.61	15.73	11.56	3.98	6.46	7.11	3.72	6.77	4.99	13.27
16.03	3Me- <i>i</i> 16:0 <sup>[c]</sup>	---	---	---	0.50	---	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
16.07	11Me- <i>i</i> 15:0	0.18	0.12	1.29	---	---	0.88	---	---	---	2.23	---	0.21	---	---	---	---	---	---
16.10	<i>x</i> -Me16:1	---	0.79	0.27	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
16.15	10Me- <i>a</i> 15:0	---	---	0.13	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
16.17	<i>n</i> 17:2Δ5,9	1.80	0.69	0.84	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
16.38	<i>i</i> 17:1 Δ9 <sup>[e]</sup>	5.44	5.68	8.16	5.73	3.57	5.00	8.59	2.51	12.42	3.49	---	3.14	---	---	---	0.70	0.30	0.91
16.38	3Me16 :0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2.94	---	---	---	---	---	---	---
16.45	10Me16:0	7.85	8.19	6.44	4.74	10.08	2.40	8.79	5.87	10.29	5.12	1.99	3.97	---	---	---	---	---	---
16.48	11Me16:0 <sup>[c]</sup>	---	0.64	0.46	0.27	---	0.28	---	---	0.90	---	---	---	---	---	---	---	---	---
16.45	<i>a</i> ?17:1 oder trimethyl?	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.32	---	0.34
16.54	7Me16:1Δ9? <sup>[f]</sup>	---	0.12	0.33	---	---	---	0.74	0.52	1.18	---	---	---	---	---	---	0.38	0.14	---

## H Anhang

16.60	13Me16:0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.02	0.03	0.20
16.65	<i>i</i> 17:0	4.31	2.97	1.84	2.13	3.14	1.06	2.93	2.82	5.46	1.52	1.48	1.35	4.13	6.06	3.82	2.26	2.61	3.57	
16.73	<i>ai</i> 17:0	2.30	2.11	1.87	1.86	4.37	1.62	2.57	3.54	1.07	1.35	1.33	1.20	1.12	1.40	1.14	1.44	1.84	2.74	
16.85	17:1	1.07	1.06	0.62	0.58	---	0.24	0.55	0.10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.24	
16.92	9,10cy17:0	0.81	0.38	0.60	0.34	---	0.26	---	---	---	---	0.37	---	---	---	---	---	---	---	
17.00	17:0	0.78	0.78	0.92	0.58	---	0.14	0.73	0.33	0.11	0.54	0.25	---	0.15	---	0.88	0.27	0.21	0.78	
17.07	10Me- <i>i</i> 17:0	0.15	0.12	0.63	0.06	---	0.16	---	---	---	---	0.25	---	---	---	---	---	---	---	
17.12	12Me- <i>i</i> 17:0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.06	---	---	---	---	---	---	---	
17.13	10Me- <i>ai</i> 17:0	0.01	0.01	0.33	0.08	---	0.30	---	---	---	---	0.25	---	---	---	---	---	---	---	
17.18	2-OH16:0	0.16	---	0.03	0.05	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.06	---	0.37	
17.34	PUFA 18:5?	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.65	---	---	
17.43	10Me17:0	0.22	0.16	0.23	0.35	---	0.11	0.22	0.41	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
17.50	18:4	1.07	0.31	---	---	---	---	0.70	0.32	---	---	---	---	0.21	---	---	7.65	1.55	0.13	
17.53	N18:2	0.46	---	---	0.88	---	0.49	---	---	---	---	---	---	1.94	3.33	0.58	---	---	---	
17.54	N18:2Δ5,9 <sup>[g]</sup>	---	0.21	0.90	---	---	---	---	---	0.27	---	---	---	---	---	---	---	---	0.05	
17.60	14Me17:0	---	---	---	---	---	0.03	---	0.07	---	---	---	---	0.28	0.37	0.09	0.51	0.38	0.71	
17.65	18:2ω6	---	---	0.49	0.07	---	---	0.52	0.45	---	---	---	---	0.79	1.15	---	3.28	---	0.59	
17.65	<i>i</i> 18:0 <sup>[h]</sup>	0.75	0.19	0.18	---	---	0.04	---	---	---	0.29	0.23	---	---	---	0.23	---	1.74	---	
17.68	18:3	0.12	0.02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.30	0.25	---	3.44	0.22	---	
17.73	18:1ω9	1.08	---	0.70	0.72	---	0.40	---	---	0.50	0.49	0.66	---	1.55	---	1.05	2.72	---	---	
17.73	<i>ai</i> 18:0	---	0.59	0.54	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.84	
17.75	3,7,11,15tetra Me16:0 = Phytansäure	---	---	---	---	---	---	2.83	5.00	0.47	---	---	---	---	---	0.27	0.07	6.98	---	
17.78	18:1ω7	2.26	2.09	2.45	2.38	---	2.27	3.35	2.93	3.86	---	0.71	1.53	17.58	2---	18.07	4.87	10.11	3.77	
17.85	18:1ω5?	0.05	---	0.05	0.23	---	0.08	---	---	---	---	---	---	0.31	---	---	---	---	---	
17.89	18:1	0.10	---	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.31	
18.00	18:0	1.74	1.87	2.08	3.88	2.47	0.47	1.96	2.36	1.38	8.38	3.61	2.75	1.82	2.71	2.38	2.34	5.60	1.91	
18.06	10Me- <i>i</i> 18:0	---	---	---	---	---	0.06	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
18.11	2-OH17:0	0.58	---	0.38	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	



18.13	11Me18:1Δ6	---	---	---	2.10	---	3.21	---	---	---	---	---	1.83	---	---	---	---	---	---
18.16	MeN19:1 (m/z 139/140)	0.79	---	0.75	0.71	---	---	0.18	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
18.42	10+11+(12) Me18:0 <sup>II</sup>	6.13	4.80	3.81	12.23	3.85	6.61	7.22	10.87	3.97	8.54	4.12	10.51	---	---	---	---	---	---
18.44	12Me18:0 allein	---	---	---	---	0.19	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
18.50	19:2	---	---	---	---	---	0.09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
18.61	15Me18:0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.19	0.39	0.18	0.42	1.28	0.04
18.66	i19:0	0.81	0.43	0.40	0.70	---	0.70	0.44	1.35	---	1.29	0.31	1.06	0.04	0.50	0.12	0.22	0.19	0.20
18.74	a19:0	---	0.06	0.07	0.15	---	0.23	---	0.35	---	---	0.09	---	0.44	0.77	0.28	0.13	1.35	0.07
18.80	19:1 <sup>III</sup>	---	---	---	0.24	---	0.89	---	---	---	---	---	0.57	---	---	---	---	---	---
18.86	11,12cy19:0	0.65	2.81	1.25	1.23	4.77	0.65	1.50	3.22	1.95	1.19	0.21	0.67	0.60	---	0.30	---	---	0.06
19.26	20:4ω6	1.36	0.41	1.32	0.47	---	0.32	1.39	0.67	1.84	---	---	---	12.52	15.92	7.12	3.21	1.82	9.03
19.31	20:5ω3?	1.31	0.44	1.33	0.26	---	0.01	1.30	0.76	1.66	---	---	---	6.95	11.05	1.73	5.35	1.71	8.16
19.41	10Me19:0	---	---	---	0.16	---	0.14	0.21	0.47	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
19.42	PUFA	---	---	0.12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
19.45	PUFA oder 20:2?	0.17	---	0.19	---	---	---	0.16	---	---	---	---	---	---	---	---	0.27	0.02	1.14
19.49	N20:2 + 20:2Δ5,9	---	---	0.09	---	---	---	---	---	0.42	---	---	---	0.17	---	0.07	2.09	---	4.48
19.50	14Me19:0	---	---	---	---	---	0.05	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
19.50	PUFA	---	0.11	0.30	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.80	---
19.52	N20:2Δ5,9	---	---	---	0.24	---	0.29	---	---	---	---	---	---	0.35	---	0.15	---	---	---
19.60	16Me19:0	---	---	---	0.02	---	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.27	0.54	---
19.65	i20:0	---	0.08	0.01	0.20	---	0.13	---	0.51	---	0.18	0.16	---	---	---	---	---	---	---
19.71	PUFA N20	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.39	---	0.08
19.72	20:1	---	---	0.22	---	---	0.18	---	---	---	---	---	---	0.17	---	---	---	---	---
19.74	a20:0?	0.27	0.40	0.20	0.31	---	0.20	---	0.14	---	0.42	0.17	---	---	---	---	---	---	---
19.80	20:1a (m/z 135,292)	---	---	---	---	---	---	---	0.11	---	---	---	---	0.34	0.58	0.29	0.54	2.12	0.06
19.83	20:1b	---	---	---	---	---	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
19.89	20:1c	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.05	0.19	---

## H Anhang

20.00	20:0	---	---	0.10	---	---	0.13	0.08	1.68	0.09	1.29	0.04	0.18	0.15	0.17	0.05	0.11	0.64	---
20.06	11Me-i20:0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
20.13	8Me20:1Δ7	---	---	0.06	1.85	---	7.37	---	---	---	0.11	---	3.90	---	---	---	---	---	---
20.19	PUFA N21a	---	---	---	---	---	0.01	---	---	---	---	---	---	1.00	---	---	---	---	---
20.21	PUFA N21b	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.16	---	---	0.20
20.27	PUFA N21c	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.05	---	---	---	---	0.11
20.32	PUFA N21d	---	---	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.24
20.41	12Me20:0 <sup>[e]</sup>	0.17	0.20	---	0.20	---	0.48	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
20.42	14Me20:0 <sup>[k]</sup>	---	---	0.01	---	---	0.22	---	3.83	0.13	1.25	0.86	---	---	---	---	---	---	---
20.43	15Me20:0 <sup>[c]</sup>	---	---	---	0.02	---	0.01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
20.65	i21:0	---	0.20	0.08	---	---	0.04	---	1.29	---	0.98	---	---	---	---	---	---	---	---
20.75	a21:0	---	0.26	0.05	0.05	---	0.12	---	0.87	---	0.05	---	---	---	---	---	---	---	---
20.81	21:1 <sup>[l]</sup>	---	---	---	---	---	0.11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
20.88	21:1 oder cy <sup>[l]</sup> (m/z 306)	---	---	---	---	---	0.05	---	0.47	---	---	---	---	---	---	---	---	0.12	---
21.00	21:0	---	---	0.04	---	---	0.03	---	0.24	---	0.14	---	---	0.22	0.15	0.06	0.06	0.41	---
21.08	22:5	---	---	0.38	0.86	---	1.30	---	0.23	1.57	---	---	---	0.36	0.35	0.13	---	0.36	2.17
21.12	22:6	5.13	---	2.38	1.21	---	1.38	---	1.18	6.32	---	---	---	1.61	2.12	0.39	12.70	2.57	18.13
21.23	22:4Δ7	---	---	0.55	1.33	---	1.75	---	0.25	1.72	---	---	---	1.22	0.82	0.38	1.13	0.10	2.28
21.27	22:5	---	---	0.28	0.36	---	0.33	---	0.51	4.16	---	---	---	0.90	0.75	0.27	2.88	---	5.71
21.51	PUFA N22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.10	---	---
21.52	22:2Δ5,9	---	---	0.13	---	---	0.02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
21.65	i22:0	0.19	0.17	0.27	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
21.74	a22:0	---	0.04	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
21.80	22:01ω7	---	---	---	---	---	0.01	---	0.28	---	---	---	---	0.50	0.21	0.18	0.43	2.10	0.15
22.00	22:0	---	0.14	0.11	---	---	0.04	---	0.67	---	1.70	1.06	---	0.07	---	0.07	---	---	---
22.17	23:6?	---	---	---	---	---	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
22.31	PUFA N23	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.04
22.41	15Me22:0	0.53	0.44	0.40	---	---	---	0.03	3.18	0.26	---	---	3.28	---	---	---	---	---	---
22.43	16Me 22:0	0.12	---	0.20	0.55	---	1.16	---	---	---	1.18	---	---	---	---	---	---	---	---

22.47	17Me 22:0	0.14	---	0.05	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
22.53	23:2Δ5,9	---	---	0.02	---	---	0.09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
22.65	i23:0	2.09	0.06	0.16	0.02	---	0.11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
22.75	ai23:0	0.12	0.09	0.19	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
22.77	23:1 oder cy	---	---	---	---	---	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
22.83	23:1?	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.42	---	---	---	---
23.00	23:0	0.32	0.16	0.13	---	---	0.01	---	0.40	---	0.42	---	---	---	0.05	0.03	---	---	---
23.00	PUFA N24a	---	---	---	0.30	---	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
23.04	16Me-i23:0	---	---	---	---	---	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
23.12	PUFA N24b	---	---	---	---	---	0.01	---	---	---	---	---	---	---	0.48	0.15	0.89	---	---
23.17	i24:2Δ5,9	---	---	0.19	---	---	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
23.27	2-OH22:0	---	---	---	---	---	---	---	---	0.66	28.78	---	---	---	---	---	---	---	---
23.35	24:3 Δ5,9,x	---	---	---	---	---	0.03	---	---	---	---	---	---	---	0.03	0.37	---	0.24	---
23.41	16Me23:0	---	---	0.06	---	---	0.04	---	0.31	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
23.54	24:2Δ5,9	0.05	---	0.50	1.74	2.62	4.14	0.23	1.25	1.89	1.42	---	4.29	1.45	0.56	2.70	0.71	2.74	0.26
23.65	i24:0	0.30	0.06	0.20	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
23.68	ai24:0	---	---	---	---	---	0.01	---	0.60	---	---	---	---	---	---	---	0.29	---	---
23.74	24:1a	---	---	---	---	---	0.02	---	0.53	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
23.81	24:1b	---	---	0.19	---	---	0.03	---	0.10	---	---	---	---	1.43	0.41	1.06	2.09	5.34	0.27
23.93	N24:2Δ5,9	---	---	---	0.58	3.76	0.82	---	---	---	---	---	2.80	---	---	---	---	---	---
24.00	24:0	---	0.02	---	---	---	0.01	---	1.39	---	1.52	---	---	0.06	---	0.11	---	---	---
24.18	i25:2Δ5,9	1.89	0.17	1.28	6.28	12.82	19.51	---	---	---	4.23	1.79	19.50	---	---	---	---	---	---
24.28	ai25:2Δ5,9	---	---	0.62	---	---	0.53	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
24.31	i?25:1 (m/z 362)	---	---	---	---	---	0.14	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
24.39	17Me24:0 [m]	1.82	0.62	2.45	1.32	---	0.74	---	1.75	---	1.78	---	6.35	---	---	---	---	---	---
24.54	25:2Δ5,9	0.24	0.43	2.04	0.63	---	1.58	1.02	4.55	11.15	---	---	5.55	4.99	1.83	12.71	2.76	4.02	0.98
24.64	i25:0	0.76	---	---	0.14	---	0.17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
24.74	ai25:0	---	---	---	---	---	0.05	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
24.92	25:1	0.68	---	0.71	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

H Anhang

25.00	25:0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.59	---
25.19	i26:2Δ5,9	2.50	1.36	10.53	0.77	---	1.89	---	---	---	---	---	6.75	---	---	0.26	---	---	---
25.30	a26:2 Δ5,9	---	0.28	1.79	---	---	0.65	---	---	---	---	---	---	0.28	---	1.12	0.61	1.33	---
25.37	26:3 Δ5,9,x	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2.28	0.84	8.47	8.18	17.19	1.03
25.55	26:2Δ5,9	0.72	0.29	2.57	0.12	---	0.37	0.69	3.27	13.07	---	---	---	10.41	3.03	23.18	6.28	11.54	0.86
25.75	26:1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
26.28	iN27:2Δ5,9	1.61	0.71	4.94	0.12	---	0.35	---	---	---	---	---	---	---	---	0.03	---	---	---
26.42	aN27:2Δ5,9	1.40	0.75	5.78	0.12	---	0.46	---	---	---	---	---	---	---	---	0.08	---	---	---
26.74	N27:2Δ5,9	---	---	0.14	---	---	0.02	---	---	---	---	---	---	---	---	0.31	---	---	---
26.97	27:3?	---	---	---	---	---	0.02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
27.79	a?N28:2Δ5,9	---	---	1.12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MBFA <sup>[n]</sup>		21.89	25.75	21.30	28.79	23.23	27.81	18.93	34.08	17.77	21.00	19.17	32.60	---	---	---	0.38	0.14	---
i-FS <sup>[n]</sup>		20.80	26.60	14.00	22.91	28.84	16.71	27.81	14.41	20.63	21.27	15.71	11.38	11.54	13.15	7.41	6.20	6.19	11.27
ai-FS <sup>[n]</sup>		5.37	12.43	4.85	9.56	12.35	6.79	10.53	7.42	2.65	10.02	7.98	7.46	3.74	5.83	2.64	3.04	4.17	6.77
aa-FS		---	0.04	0.56	0.02	0	0.09	---	0.07	---	---	---	---	0.47	0.76	0.27	1.22	2.24	0.95
2-fach ungesättigt, methylenunterbrochen		0.46	---	0.57	0.95	0	0.58	0.52	0.45	0.42	---	---	---	2.90	4.48	0.65	5.37	---	5.07
Demospongien-FS		14.17	6.06	34.26	10.60	19.20	30.78	1.94	9.07	26.37	5.65	1.79	38.89	19.76	6.26	49.04	18.90	36.83	3.41
cycloFS		1.46	3.19	1.85	1.57	4.77	0.91	1.50	3.22	1.95	1.19	0.58	0.67	0.60	---	0.30	---	---	0.06
MUFA (ohne MBFA, i, ai, cy)		11.35	7.96	8.60	6.24	0.54	5.64	8.68	4.96	6.01	4.83	2.84	2.09	24.49	25.94	21.60	14.55	21.11	6.39
PUFA (>2 Db)		9.16	1.28	6.89	4.80	0	5.20	3.55	3.92	17.27	---	---	---	25.20	31.27	10.18	38.25	9.30	48.30
SAFA unverzweigt		14.60	16.68	6.72	14.51	11.05	5.49	23.71	17.41	6.45	35.38	23.15	6.91	11.30	12.30	7.65	11.97	13.04	17.41
OH		0.75	---	0.40	0.05	0	---	---	---	---	0.66	28.78	---	---	---	---	0.06	---	0.37
terpenoid		---	---	---	---	0	---	2.83	5.00	0.47	---	---	---	---	---	0.27	0.07	6.98	---

<sup>[a]</sup> manchmal gemischt mit 2,xdMeN15; <sup>[b]</sup> größter Peak von 8+9+10Me; <sup>[c]</sup> manchmal rechte Schulter des Vorgängerpeaks; <sup>[d]</sup> 6Me-a15?; <sup>[e]</sup> manchmal linke Schulter des nächsten Peaks; <sup>[f]</sup> m/z 138, in *T.swinhoei* und *I.felix* nicht sauber; <sup>[g]</sup> gemischt mit 18:4; <sup>[h]</sup> manchmal gemischt mit 18:2; <sup>[i]</sup> manchmal gemischt mit N19:1; <sup>[j]</sup> m/z 312 anstelle von M<sup>+</sup> m/z 310; <sup>[k]</sup> mittlerer Peak; <sup>[l]</sup> kein M<sup>+</sup> vorhanden; <sup>[m]</sup> in *A. dilatata* 16Me; <sup>[n]</sup> ohne Demospongien-FS.

Anhang Tab. 12: Verteilung der Fettsäuren der PL-Fractionen aus vier marinen Schwämmen auf die 4 Unterfraktionen PL1, PL2, PL3 und PL4 (Angaben in mol %).

Schwamm →		<i>Theonella swinhoei</i>				<i>Cacospongia mycofijiensis</i>				<i>Agelas dilatata</i>				<i>Dysidea etheria</i>			
ECL	Probe → milde alkal. Methanolyse	0801 PL1	0801 PL2	0801 PL3	0801 PL4	19 PL1	19 PL2	19 PL3	19 PL4	17 PL1	17 PL2	17 PL3	17 PL4	18 PL1	vth18 PL2	18 PL3	18 PL4
11.00	11:0	---	---	---	---	---	---	---	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---
13.65	<i>i</i> 14:0	---	---	---	---	0.01	---	0.02	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---
14.00	14:0 <sup>[a]</sup>	0.12	0.10	0.22	0.06	0.08	0.07	1.23	1.75	0.91	---	---	---	---	---	0.14	0.21
14.36	2Me14:0	---	---	---	---	---	---	0.18	0.26	---	---	---	---	---	---	---	---
14.40	3Me14:0	---	0.02	0.03	0.05	---	---	0.09	0.15	---	---	---	---	---	---	---	---
14.46	8Me14:0	0.14	0.15	0.36	0.49	---	---	0.06	0.15	---	---	---	---	---	---	---	---
14.50	9Me14:0 <sup>[b]</sup>	0.10	0.17	0.05	0.02	---	---	0.06	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---
14.53	10Me14:0	0.09	---	0.06	0.05	---	---	0.02	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---
14.65	<i>i</i> 15:0	1.54	1.88	2.16	1.49	1.72	1.78	11.07	13.84	3.72	2.87	1.88	1.02	0.26	---	2.44	4.34
14.72	<i>a</i> <i>i</i> 15:0	0.77	0.49	1.37	1.61	0.90	0.84	3.28	4.23	1.78	3.32	1.76	---	---	0.35	0.08	---
14.82	15:01a	---	---	---	---	---	---	---	0.07	---	---	---	---	---	---	---	---
14.92	15:01b	---	---	---	---	---	---	---	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---
14.99	2Me- <i>i</i> 15:0 <sup>[e]</sup>	---	---	---	---	---	---	---	1.07	---	---	---	---	---	---	---	---
15.00	15:0 <sup>[c]</sup>	0.18	0.16	0.39	0.45	0.14	0.14	1.33	0.17	---	---	---	---	---	---	0.31	0.54
15.03	3Me- <i>i</i> 15:0	---	0.03	0.24	0.32	0.02	0.12	1.14	1.41	---	---	---	---	---	---	---	---
15.09	8Me- <i>i</i> 15:0	---	---	---	---	0.01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15.11	10Me- <i>i</i> 15:0	1.31	2.87	2.23	2.63	0.20	0.59	1.04	1.15	0.93	2.15	0.66	---	---	---	---	---
15.15	MeC16:0 <sup>[d]</sup>	---	---	0.10	0.27	---	---	0.04	0.07	---	---	---	---	---	---	---	---
15.36	2Me15:0	---	---	0.05	0.05	0.01	0.06	0.79	0.99	---	---	---	---	---	---	---	---
15.40	3Me15:0	---	---	0.03	0.07	0.01	0.01	0.39	0.50	---	---	---	---	---	---	---	---
15.45	8Me15:0 <sup>[e]</sup>	---	---	0.22	0.26	---	---	---	0.07	---	---	---	---	---	---	---	---
15.49	10Me15:0	0.02	0.61	0.07	0.05	0.14	0.24	0.32	0.19	---	---	---	0.20	---	---	---	---
15.53	11Me15:0	---	---	---	---	---	---	0.04	0.06	---	---	---	0.45	---	---	---	---
15.57	16:2Δ5,9	0.42	0.30	1.17	1.74	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15.58	12Me15:0 <sup>[c]</sup>	---	0.05	0.86	1.43	---	---	---	0.05	---	---	---	---	---	---	---	---

## H Anhang

15.65	<i>i</i> 16:0	0.69	0.53	1.05	1.44	0.27	0.45	0.79	0.94	0.65	0.48	0.46	---	0.25	0.38	1.65	2.98
15.73	<i>ai</i> 16:0	0.26	0.27	1.16	1.82	0.12	0.25	2.44	3.12	---	---	---	---	0.40	0.17	1.35	2.47
15.77	16:1 $\omega$ 7	1.12	1.79	4.37	5.99	0.52	0.96	1.27	1.31	2.08	2.46	0.99	1.16	0.09	---	0.69	1.04
15.87	16:1 $\omega$ 5	0.17	0.30	0.35	0.55	0.09	0.26	---	0.28	---	---	---	---	---	---	0.06	---
16.00	16:0	2.68	2.08	3.24	3.92	1.12	1.61	3.73	4.41	7.76	5.43	3.05	2.05	1.41	1.22	4.26	7.88
16.03	3Me- <i>i</i> 16:0	---	---	---	---	---	---	---	0.13	---	---	---	---	---	---	---	---
16.07	11Me- <i>i</i> 15:0	0.28	0.35	1.71	2.99	---	---	0.96	1.81	---	---	---	---	---	---	---	---
16.10	x-me16:1	0.45	0.56	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
16.15	10Me- <i>ai</i> 15:0	---	---	0.08	0.48	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
16.17	<i>n</i> 17:2 $\Delta$ 5,9	0.23	0.31	1.20	1.72	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
16.38	<i>i</i> 17:1 $\Delta$ 9 <sup>[e]</sup>	3.46	6.84	9.95	12.07	2.58	4.14	5.87	5.92	13.04	11.85	10.94	13.36	---	---	---	---
16.38	3Me16:0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
16.45	10Me16:0	7.14	6.59	5.92	6.20	1.86	1.70	3.12	2.26	14.19	13.11	10.29	4.25	---	---	---	---
16.48	11Me16:0 <sup>[c]</sup>	---	---	0.51	1.45	0.08	0.05	0.39	0.38	---	---	---	3.18	---	---	---	---
16.54	7Me16:1 $\Delta$ 9? <sup>[f]</sup>	---	---	0.49	0.89	---	---	---	---	---	---	1.30	3.13	---	---	---	---
16.65	<i>i</i> 17:0	1.55	1.21	2.02	2.77	0.65	0.44	1.32	1.35	13.31	2.16	2.44	2.16	1.21	0.99	4.67	7.77
16.73	<i>ai</i> 17:0	1.00	0.85	2.36	3.50	0.38	0.36	2.09	2.53	2.43	0.45	0.54	0.53	0.34	0.20	1.36	2.53
16.85	17:1	0.59	0.71	0.57	0.61	0.23	0.28	0.25	0.23	---	---	---	---	---	---	---	---
16.92	9,10cy17:0	0.45	0.57	0.61	0.74	0.08	0.11	0.30	0.41	---	---	---	---	---	---	---	---
17.00	17:0	0.49	0.51	1.22	1.55	0.15	0.19	0.13	0.10	---	---	0.47	---	0.46	0.28	1.05	1.56
17.07	10Me- <i>i</i> 17:0	0.12	0.36	0.55	1.53	---	---	0.21	0.29	---	---	---	---	---	---	---	---
17.13	10Me- <i>ai</i> 17:0	---	0.03	0.38	0.97	---	---	0.37	0.56	---	---	---	---	---	---	---	---
17.18	2-OH16:0	---	0.08	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
17.43	10Me17:0	0.13	0.13	0.30	0.39	0.04	0.03	0.26	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---
17.53	N18:2	---	---	---	---	---	---	0.67	0.85	---	---	---	---	---	---	0.81	1.25
17.54	N18:2 $\Delta$ 5,9 <sup>[g]</sup>	0.16	0.15	1.29	2.15	---	---	---	---	---	---	---	0.95	---	---	---	---
17.60	14Me17:0	---	---	---	---	---	---	0.04	0.06	---	---	---	---	---	---	0.13	0.18
17.65	18:2 $\omega$ 6	---	---	0.82	1.22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
17.65	<i>i</i> 18:0 <sup>[h]</sup>	0.37	0.33	---	---	---	---	0.06	0.08	---	---	---	---	0.10	---	0.26	0.52

17.73	18:1ω9	---	0.18	---	2.79	---	---	0.56	0.69	---	---	---	1.78	---	---	1.50	2.17
17.73	ai18:0	0.34	---	1.89	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
17.75	3,7,11,15tetra Me16:0	---	---	---	---	---	---	---	---	0.53	0.39	1.04	---	0.78	0.68	---	---
17.78	18:1ω7	1.68	2.11	2.88	3.13	1.16	1.54	2.75	2.78	2.13	3.49	4.06	5.74	5.22	3.47	21.78	39.63
17.85	18:1ω5?	0.02	---	---	0.22	---	---	0.13	0.13	---	---	---	---	---	---	---	---
17.89	18:1	---	---	---	0.14	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
18.00	18:0	1.61	1.21	2.80	2.91	0.51	0.47	0.50	0.40	1.36	1.27	1.67	1.26	1.09	1.59	2.27	5.48
18.06	10Me-i18:0	---	---	---	---	---	---	0.10	0.10	---	---	---	---	---	---	---	---
18.11	2-OH17:0	0.37	0.44	0.34	0.34	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
18.13	11Me18:1Δ6	---	---	---	---	0.28	0.37	4.41	5.18	---	---	---	---	---	---	---	---
18.16	MeN19:1 (m/z 139/140)	0.39	0.21	1.04	1.50	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
18.42	10+11+(12) Me18:0 <sup>[i]</sup>	5.28	3.42	4.35	2.48	1.96	1.45	8.65	9.98	3.00	3.82	5.24	4.06	---	---	---	---
18.50	19:2	---	---	---	---	---	---	0.11	0.17	---	---	---	---	---	---	---	---
18.61	15Me18:0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.23	0.15	0.14	0.25
18.66	i19:0	0.43	0.30	0.45	0.44	0.24	0.23	0.91	1.00	---	---	---	---	0.13	0.15	0.12	0.10
18.74	ai19:0	0.02	---	0.11	0.17	0.04	0.02	0.33	0.35	---	---	---	---	0.24	0.17	0.27	0.46
18.80	19:1 <sup>[i]</sup>	---	---	---	---	---	0.04	1.21	1.55	---	---	---	---	---	---	---	---
18.86	11,12cy19:0	1.49	2.01	0.86	0.42	0.44	0.42	0.75	0.80	1.78	4.43	1.35	0.82	0.49	0.42	0.19	0.23
19.26	20:4ω6?	0.47	0.63	1.94	2.32	0.03	0.02	0.47	0.49	0.64	---	---	5.87	1.28	1.00	10.13	12.10
19.31	20:5ω3?	0.31	0.47	2.08	2.59	---	---	0.02	---	---	---	1.18	4.93	0.48	---	2.62	2.43
19.41	10Me19:0	---	---	---	---	0.01	---	0.20	0.24	---	---	---	---	---	---	---	---
19.42	PUFA	---	---	0.23	0.28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
19.45	PUFA oder 20:2	---	---	0.49	0.26	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
19.49	N20:2 + 5,9 20:2Δ5,9	0.09	0.21	---	---	0.01	---	---	---	---	---	---	1.48	---	---	0.14	---
19.50	14Me19:0	---	---	---	---	---	---	0.07	0.08	---	---	---	---	---	---	---	---
19.50	PUFA	---	---	0.49	0.77	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
19.52	N20:2Δ5,9	---	---	---	---	0.02	---	0.42	0.46	---	---	---	---	---	---	0.31	---
19.60	16Me19:0	---	---	---	---	---	---	0.07	0.06	---	---	---	---	---	---	---	---

## H Anhang

19.65	i20:0	0.04	0.02	---	---	0.06	0.07	0.16	0.16	---	---	---	---	---	---	---	---
19.72	20:1	---	---	0.44	0.46	---	---	0.26	0.28	---	---	---	---	---	---	---	---
19.74	a $\hat{z}$ 20:0?	0.08	0.08	0.32	0.35	0.14	0.10	0.26	0.20	---	---	---	---	---	---	---	---
19.80	20:1a (m/z 135, 292)	---	---	---	---	---	---	0.01	---	---	---	---	---	0.27	---	0.34	0.43
19.83	20:1b	---	---	---	---	---	---	0.06	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---
20.00	20:0	0.14	0.06	0.12	0.10	0.14	0.14	0.12	0.12	---	---	---	0.31	0.15	---	0.03	---
20.06	11Me-i20:0	---	---	---	---	0.02	0.02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
20.13	8Me20:1 $\Delta$ 7	---	0.09	0.12	---	0.49	0.44	10.86	11.35	---	---	---	---	---	---	---	---
20.19	PUFA N21a	---	---	---	---	---	---	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---	---
20.21	PUFA N21b	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.33	---
20.32	PUFA N21d	---	---	0.09	0.10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
20.41	12Me20:0 <sup>[e]</sup>	---	---	---	---	0.31	0.72	0.46	0.46	---	---	---	---	---	---	---	---
20.42	14Me20:0 <sup>[k]</sup>	---	---	---	0.04	0.81	---	0.13	0.11	0.46	---	---	---	---	---	---	---
20.43	15Me20:0 <sup>[c]</sup>	---	---	---	---	0.05	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
20.65	i21:0	0.14	0.05	0.14	---	0.07	0.14	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
20.75	a $\hat{z}$ 21:0	---	0.11	---	0.08	0.19	0.18	0.08	0.08	---	---	---	---	---	---	---	---
20.81	21:1 <sup>[l]</sup>	---	---	---	---	---	---	0.15	0.19	---	---	---	---	---	---	---	---
20.88	21:1 oder cy <sup>[l]</sup>	---	---	---	---	0.09	---	0.05	0.05	---	---	---	---	---	---	---	---
21.00	21:0	0.05	0.02	0.06	0.05	0.08	0.03	0.01	0.01	---	---	---	---	0.16	---	0.04	---
21.08	22:5	0.14	0.11	0.56	0.77	0.22	0.23	1.97	1.76	---	---	1.15	4.64	---	---	0.26	---
21.12	22:6	---	0.77	4.10	4.79	0.22	0.20	2.08	1.90	1.20	---	3.10	18.71	0.24	---	0.68	0.04
21.23	22:4 $\Delta$ 7	0.05	0.19	0.95	1.02	0.55	0.43	2.40	2.44	---	---	---	6.11	0.35	---	0.52	0.30
21.27	22:5	---	0.08	0.51	0.54	0.11	0.07	0.37	0.58	---	---	3.61	11.85	0.25	---	0.36	0.29
21.52	22:2 $\Delta$ 5,9	0.09	0.10	0.12	0.20	0.07	0.05	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
21.65	i22:0	0.47	0.31	0.21	0.10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
21.80	22:1 $\omega$ 7	---	---	---	---	0.06	0.03	---	---	---	---	---	---	0.41	0.45	0.05	---
22.00	22:0	0.29	0.11	0.08	0.01	0.18	0.06	---	---	---	---	---	---	0.16	0.23	---	---
22.17	PUFA 23:6?	---	---	---	---	---	---	0.08	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---
22.41	15Me22:0	1.29	0.46	---	---	---	---	---	---	0.90	---	---	---	---	---	---	---



22.43	16Me22:0	---	0.25	0.28	0.21	3.75	2.20	0.22	0.13	---	---	---	---	---	---	---	---
22.47	17Me22:0	0.11	0.09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
22.53	23:2Δ5,9	---	0.06	---	---	0.19	0.23	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---	---
22.65	i23:0	0.24	0.28	0.11	---	0.36	0.22	0.02	---	---	---	---	---	---	---	---	---
22.75	ai23:0	0.33	0.30	0.12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
22.77	23:1 oder cy	---	---	---	---	0.24	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
22.83	23:1?	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.87	---	---	---	---
23.00	23:0	0.26	0.15	0.12	---	0.07	0.01	---	---	---	---	---	0.24	---	---	---	---
23.00	PUFA N24a	---	---	---	---	---	---	0.02	0.06	---	---	---	---	---	---	---	---
23.04	16Me-i23:0	---	---	---	---	0.11	0.08	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
23.12	PUFA N24b	---	---	---	---	---	---	---	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---
23.17	i24:2Δ5,9	0.36	0.26	0.13	---	0.07	0.09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
23.35	24:3Δ5,9,x	---	---	---	---	0.12	---	0.03	---	---	---	---	---	---	0.06	---	---
23.41	16Me23:0	---	---	0.23	---	0.20	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
23.54	24:2Δ5,9	1.01	0.72	0.27	---	9.45	9.84	1.88	0.34	2.45	1.89	3.52	---	4.18	4.10	2.36	0.20
23.65	i24:0	0.31	0.30	0.17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
23.68	ai24:0	---	---	---	---	0.05	0.03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
23.74	24:1a	---	---	---	---	0.13	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
23.81	24:1b	0.33	0.23	0.20	---	0.16	---	---	---	---	---	---	2.50	2.57	0.27	---	---
23.93	N24:2Δ5,9	---	---	---	---	0.55	2.43	0.69	0.21	---	---	---	---	---	---	---	---
24.00	24:0	---	---	---	---	0.07	---	---	---	---	---	---	0.25	0.40	---	---	---
24.18	i25:2Δ5,9	2.07	1.94	0.76	0.24	46.77	46.86	7.87	1.13	---	---	---	---	---	---	---	---
24.28	ai25:2Δ5,9	0.77	1.15	0.42	---	1.47	1.53	0.02	---	---	---	---	---	---	---	---	---
24.31	i?25:1 (m/z 362)	---	---	---	---	---	---	0.29	0.12	---	---	---	---	---	---	---	---
24.39	17Me24:0 <sup>[m]</sup>	3.72	3.72	1.61	0.50	2.25	1.28	0.29	0.08	---	---	---	---	---	---	---	---
24.54	25:2Δ5,9	3.13	3.13	1.35	0.34	3.90	3.66	0.64	0.10	12.53	18.26	16.95	---	20.80	21.43	10.03	0.70
24.64	i25:0	---	---	---	---	0.57	0.37	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
24.74	ai25:0	---	---	---	---	0.20	0.09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
24.92	25:1	0.95	1.30	0.45	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

H Anhang

25.19	i26:2Δ5,9	16.93	16.43	6.38	1.37	4.66	4.43	0.74	0.11	---	---	---	---	0.15	0.25	0.38	---
25.30	ai26:2Δ5,9	2.76	3.12	0.97	---	1.64	1.55	0.23	0.03	---	---	---	---	1.91	0.67	1.23	---
25.37	26:3Δ5,9,x	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	11.63	12.94	8.11	0.51
25.55	26:2Δ5,9	4.42	3.58	1.82	0.40	0.86	1.00	0.12	---	12.22	22.17	22.33	---	39.26	45.75	15.66	1.41
26.28	iN27:2Δ5,9	8.77	7.06	3.08	0.71	0.90	0.85	0.14	---	---	---	---	---	---	---	0.07	---
26.42	aiN27:2Δ5,9	10.04	8.63	3.29	0.90	1.18	1.13	0.17	---	---	---	---	---	---	---	0.17	---
26.74	N27:2Δ5,9	---	0.45	---	---	0.12	---	---	---	---	---	---	---	0.77	---	0.28	---
26.97	27:3?	---	---	---	---	---	---	0.07	---	---	---	---	---	---	---	---	---
27.79	ai?N28:2Δ5,9	2.10	1.64	0.73	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MBFA <sup>[n]</sup>		20.57	20.12	21.00	23.88	12.60	9.35	34.86	39.28	19.48	19.08	17.49	15.27	---	---	---	---
i-FS <sup>[n]</sup>		9.23	12.04	16.26	18.32	6.54	7.82	20.50	23.46	30.72	17.35	15.72	16.54	1.96	1.51	9.14	15.71
ai-FS <sup>[n]</sup>		2.90	2.16	7.32	7.54	2.02	1.87	8.47	10.51	4.21	3.77	2.30	0.53	0.98	0.88	3.07	5.47
aaI FS		---	0.05	0.86	1.43	0.00	---	0.12	0.17	---	---	---	---	0.23	0.15	0.28	0.43
2-fach ungesättigt, methylenunterbrochen		0.09	0.21	0.82	1.22	0.01	---	0.78	1.01	---	---	---	1.48	---	---	0.96	1.25
Demospongien-FS		53.26	49.04	22.98	9.76	71.97	73.66	12.98	2.38	27.20	42.32	42.79	0.95	78.69	85.13	38.67	2.83
cycloFS		1.94	2.58	1.47	1.17	0.51	0.53	1.05	1.22	1.78	4.43	1.35	0.82	0.49	0.42	0.19	0.23
MUFA (ohne MBFA, i, ai, cy)		4.86	6.61	9.25	13.88	2.67	3.11	6.68	7.65	4.22	5.95	5.05	8.68	10.36	6.49	24.69	43.27
PUFA (>2 Db)		0.98	2.25	11.44	13.43	1.14	0.95	7.52	7.32	1.83	---	9.05	52.10	2.60	1.00	14.91	15.15
SAFA unverzweigt		5.81	4.40	8.25	9.04	2.54	2.71	7.05	7.00	10.02	6.70	5.19	3.62	3.91	3.73	8.09	15.67
OH		0.37	0.52	0.34	0.34	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
terpenoid		---	---	---	---	---	---	---	---	0.53	0.39	1.04	---	0.78	0.68	---	---

<sup>[a]</sup> manchmal gemischt mit 2,xdMeN15; <sup>[b]</sup> größter Peak von 8+9+10Me; <sup>[c]</sup> manchmal rechte Schulter des Vorgängerpeaks; <sup>[d]</sup> 6Me-a15?; <sup>[e]</sup> manchmal linke Schulter des nächsten Peaks; <sup>[f]</sup> m/z 138, in *T.swinhoei* und *I.felix* nicht sauber; <sup>[g]</sup> mixed with 18:4; <sup>[h]</sup> manchmal gemischt mit 18:2; <sup>[i]</sup> manchmal gemischt mit N19:1; <sup>[j]</sup> m/z 312 anstelle von M<sup>+</sup> m/z 310; <sup>[k]</sup> mittlerer Peak; <sup>[l]</sup> kein M<sup>+</sup> vorhanden; <sup>[m]</sup> in *A. dilatata* 16Me; <sup>[n]</sup> ohne Demospongien-FS.

PL1→DPG/PA; PL2→PE/PS; PL3→PI/PC; PL4→IyPC/SM

**Anhang Tab. 13:** Diagnostische Fragmente von FAME.

$M^+ [m/z]-1$	N	Methyl- Verzweigung	d = c-18; d+1 [m/z]	c = b-32; c+1 [m/z]	meist am höchsten [m/z]	a (Ester-Seite der Verzweigung); a+1, a+2	b = a+28
87	3				73 +n x 14	Lücke nach:	
101	4	4Me	65	83	87	88/89	115
115	5	5Me	79	97	101	102/103	129
129	6	6Me	93	111	115	116/117	143
143	7	7Me	107	125	129	130/131	157
157	8	8Me	121	139	143	144/145	171
171	9	9Me	135	153	157	158/159	185
185	10	10Me	149	167	171	172/173 hohe 185?	199
199	11	11Me	163	181	185	186/187	213
213	12	12Me	177	195	199	200/201	227
227	13	13Me	191	209	213	214/215	241
241	14	14Me	205	223	227	228/229	255
255	15	15Me	219	237	241	242/243	269
269	16	16Me	233	251	255	256/257	283
283	17	17Me	247	265	269	270/271	297
297	18	18Me	261	279	283	284/285	311
311	19	19Me	275	293	297	298/299	325
325	20	20Me	289	307	311	312/313	339
339	21	21Me	303	321	325	326/327	353
353	22	22Me	317	335	339	340/341	367
367	23	23Me	331	349	353		381

**Anhang Tab. 14:** Fettsäuren von *Ircinia felix* 2004. Milde alkalische Methanolyse vs. saure Methylierung. Angaben in mol %.

	Probe →	Gesamtlipide		Neutrallipide (NL)		Glycolipide (GL)		Polarlipide (PL)	
		1546/1555	1552	1547	1549	1545	1551	1544	1550
		alkalisch	sauer	alkalisch	sauer	alkalisch	sauer	alkalisch	sauer
<b>ECL</b>	nmol gesamt →	7284	15915	9863	13303	3506	13386	1382	19844
13.65	<i>i</i> 14:0	0.06	0.05	0.10	0.10	0.03	0.06	0.05	0.07
13.75	14:1	---	---	---	---	0.09	0.05	---	---
14.00	14:0 <sup>[a]</sup>	0.51	0.51	0.49	0.51	0.74	0.78	0.37	0.41
14.50	9Me14:0 <sup>[b]</sup>	0.14	0.12	---	0.04	0.68	0.52	---	---
14.53	10Me14:0	0.03	---	---	0.01	---	---	---	---
14.65	<i>i</i> 15:0	4.02	3.28	4.20	3.67	3.46	3.03	3.66	3.14
14.72	<i>a</i> <i>i</i> 15:0	2.04	1.74	2.25	2.03	1.41	1.24	2.38	1.85
14.82	15:1a	0.04	---	---	0.02	---	---	---	---
14.92	15:1b	---	0.12	0.08	0.10	---	0.04	---	---
15.00	15:0 <sup>[c]</sup>	0.52	0.43	0.49	0.51	0.38	0.40	0.39	0.43
15.11	10Me- <i>i</i> 15:0	0.27	0.28	0.23	0.23	0.11	0.33	0.56	0.45
15.45	8Me15:0	0.06	---	---	---	0.39	0.32	---	---
15.49	10Me15:0	0.11	0.17	0.10	0.12	0.20	0.16	0.26	0.25
15.53	11Me15:0	0.01	---	---	---	0.08	---	0.01	---
15.65	<i>i</i> 16:0	1.29	1.22	1.30	1.42	1.51	1.62	1.09	1.15

## H Anhang

15.73	a $\bar{1}$ 16:0	0.33	0.34	0.39	0.38	0.34	0.54	0.30	0.26
15.77	16:1 $\omega$ 7	2.19	1.91	1.50	1.34	6.42	5.07	1.55	1.28
15.87	16:1 $\omega$ 5	0.43	0.42	0.44	0.44	0.69	0.70	0.29	0.25
16.00	16:0	9.05	7.75	8.11	7.16	13.79	12.31	7.16	5.66
16.07	11Me- $\bar{1}$ 15:0	0.11	0.52	0.08	0.10	---	---	0.23	0.35
16.17	N17:2 $\Delta$ 5,9	0.15	---	0.18	0.29	0.14	---	0.06	0.29
16.38	$\bar{1}$ 17:1 $\Delta$ 9 <sup>[e]</sup>	1.66	1.92	1.82	1.75	0.96	2.78	1.52	1.24
16.45	10Me16:0	2.21	1.46	2.23	2.08	1.81	3.48	2.24	2.02
16.48	11Me16:0 <sup>[c]</sup>	---	0.17	---	---	---	---	0.37	---
16.54	7Me16:1 $\Delta$ 9? <sup>[f]</sup>	0.02	---	---	---	0.04	---	---	---
16.65	$\bar{1}$ 17:0	1.33	1.17	1.31	1.34	1.18	1.71	0.96	0.82
16.73	a $\bar{1}$ 17:0	1.55	1.47	1.50	1.39	1.63	1.74	0.97	0.84
16.85	17:1	---	0.23	---	0.21	---	0.41	---	0.16
16.92	9,10cy17:0	0.17	0.10	0.27	0.15	0.04	0.05	0.18	---
17.00	17:0	0.38	0.45	0.37	0.43	0.52	0.58	0.39	---
17.07	10Me- $\bar{1}$ 17:0	0.07	0.08	0.07	0.06	---	---	0.10	0.18
17.13	10Me-a $\bar{1}$ 17:0	0.06	0.04	0.05	0.03	---	---	0.10	0.06
17.43	10Me17:0	0.13	0.15	0.20	0.17	0.11	0.08	0.17	0.16
17.53	N18:2	0.61	0.64	0.67	0.64	0.55	0.54	0.30	0.36
17.65	$\bar{1}$ 18:0 <sup>[h]</sup>	0.14	0.13	0.10	0.09	0.26	0.21	0.06	0.14
17.73	18:1 $\omega$ 9	0.92	0.96	0.72	0.91	1.28	1.25	0.71	0.66
17.78	18:1 $\omega$ 7	2.14	1.94	2.46	1.96	1.61	1.93	2.30	1.89
17.85	18:1 $\omega$ 5?	0.05	0.15	---	0.13	---	---	---	---
18.00	18:0	2.96	2.47	2.67	2.35	5.02	3.01	1.38	1.57
18.06	10Me- $\bar{1}$ 18:0	---	0.27	---	0.10	---	---	---	0.12
18.13	11Me18:1 $\Delta$ 6	0.23	---	0.27	0.27	0.14	0.06	---	0.13
18.16	MeN19:1 ( <i>m/z</i> 139/140)	---	0.25	0.28	0.31	---	---	---	0.14
18.42	10+11+(12) Me18:0 <sup>[i]</sup>	5.88	5.04	6.17	5.43	6.39	5.94	2.43	2.44
18.50	19:2	0.21	0.31	0.20	0.43	0.09	0.15	0.17	---
18.66	$\bar{1}$ 19:0	0.66	0.70	0.70	0.56	1.51	1.08	0.18	---
18.74	a $\bar{1}$ 19:0	0.41	0.40	0.35	0.23	1.32	0.82	0.11	0.06
18.80	19:1 <sup>[j]</sup>	0.45	0.35	0.59	0.41	0.30	0.33	0.23	0.21
18.86	11,12 cy19:0	1.50	0.87	1.55	0.83	1.28	0.98	3.06	1.12
19.26	20:4 $\omega$ 6?	0.10	0.18	0.17	0.21	0.09	0.22	0.24	0.36
19.31	20:5 $\omega$ 3?	0.03	0.05	---	---	0.05	0.06	0.03	0.07
19.42	PUFA	0.07	---	---	---	0.10	0.08	0.02	0.06
19.49	N20:2 + N20:2 $\Delta$ 5,9	1.45	0.93	1.61	1.57	0.66	0.50	1.02	0.78
19.52	N20:2 $\Delta$ 5,9	---	0.23	0.22	---	0.18	---	0.12	0.16
19.60	16Me19:0	0.20	0.30	0.10	0.24	0.55	0.47	---	0.12
19.65	$\bar{2}$ 20:0	0.04	0.01	0.04	0.60	0.10	0.03	---	---
19.72	20:1	0.52	---	0.53	---	0.58	---	0.47	0.29
19.74	a $\bar{2}$ 20:0?	---	0.11	---	---	---	0.24	---	---
19.80	20:1a ( <i>m/z</i> 135, 292)	0.08	0.18	0.10	---	0.18	0.18	---	0.03

19.89	20:1b	0.05	---	---	---	---	0.05	---	---
20.00	20:0	0.81	0.89	0.66	---	1.44	0.96	0.18	0.24
20.13	8Me20:1Δ7	0.06	---	0.09	---	---	---	---	0.11
20.41	12Me20:0 <sup>[e]</sup>	---	0.40	0.25	0.26	0.87	---	0.13	0.41
20.42	14Me20:0 <sup>[e]</sup>	0.93	0.30	0.60	0.15	0.34	0.73	0.08	---
20.65	i21:0	0.21	0.24	0.15	0.19	0.31	0.35	---	0.04
20.81	21:1 <sup>[f]</sup>	---	---	0.06	---	---	---	0.11	0.15
20.88	21:1 oder cy <sup>[f]</sup> (m/z 306)	0.24	0.09	0.17	0.13	0.38	0.22	0.08	0.02
21.00	21:0	0.38	1.74	0.27	1.59	0.69	1.27	0.19	0.94
21.08	22:5	0.22	0.26	0.31	0.35	0.10	0.03	0.13	0.27
21.12	22:6	---	0.59	1.03	0.78	0.47	0.38	---	0.39
21.23	22:4Δ7	2.51	2.09	3.22	2.60	1.08	0.97	2.01	1.96
21.27	22:5	0.72	0.67	0.70	0.81	0.27	0.33	0.45	0.62
21.52	22:2Δ5,9	0.26	0.36	0.26	0.30	0.28	---	0.38	0.47
21.65	i22:0	---	---	---	---	---	0.32	---	---
21.80	22:1ω7	1.84	2.07	1.32	1.43	2.38	2.02	2.07	3.53
21.89	22:1	0.05	---	0.04	---	0.07	0.05	0.11	0.20
22.00	22:0	1.44	8.65	1.35	7.92	1.91	5.55	2.01	4.60
22.43	16Me22:0	1.39	1.36	0.91	0.99	1.39	1.20	1.42	2.06
22.53	23:2Δ5,9	0.90	0.76	0.76	0.74	1.20	0.68	1.35	1.44
22.65	i23:0	0.21	0.39	0.43	0.40	0.26	0.20	0.06	0.40
22.77	23:1? oder cy	0.37	---	0.06	---	0.13	---	0.24	---
22.83	23:1?	0.16	0.23	0.68	---	0.72	0.17	3.72	1.84
23.00	23:0	---	0.69	---	0.68	---	0.47	0.45	0.78
23.17	i24:2Δ5,9	0.20	0.15	0.14	0.16	0.17	0.13	0.19	---
23.27	2-OH22:0	---	0.33	---	0.40	---	0.27	---	0.18
23.35	24:3Δ5,9,x	0.52	0.75	0.35	0.47	0.76	0.91	0.63	0.84
23.54	24:2Δ5,9	11.98	10.65	13.45	10.85	9.57	8.22	18.04	16.02
23.68	a24:0	1.01	0.19	0.69	0.16	1.49	1.48	0.09	0.89
23.74	24:1a	0.86	1.10	0.70	0.94	0.92	1.29	0.63	1.77
23.81	24:1b	1.37	1.99	1.11	2.17	0.79	1.54	1.43	2.40
23.93	N24:2Δ5,9	0.18	---	0.09	0.38	---	0.91	---	0.50
24.00	24:0	0.21	0.43	0.12	0.42	---	0.48	0.09	0.54
24.18	i25:2Δ5,9	17.32	14.93	18.18	15.20	9.50	7.60	21.17	17.73
24.28	a25:2Δ5,9	1.46	---	1.00	1.64	---	---	1.31	1.68
24.31	i25:1 (m/z 362)	---	0.77	---	---	0.84	1.18	---	---
24.41	a25:1 (m/z 362)	0.86	0.93	0.38	0.74	---	0.98	0.45	0.22
24.54	25:2Δ5,9	1.88	1.48	1.69	2.02	1.03	1.30	1.96	2.57
24.64	i25:0	0.95	0.36	0.28	0.41	0.44	0.77	---	0.56
24.92	25:1	---	---	---	---	---	---	---	0.24
25.19	i26:2Δ5,9	0.11	0.11	0.21	0.13	---	0.31	---	0.27
25.30	a26:2Δ5,9	0.18	0.40	0.47	0.32	---	---	0.29	0.32
25.37	26:3Δ5,9,x	---	0.18	---	0.15	---	---	---	0.22
25.55	26:2Δ5,9	0.38	0.52	0.43	0.50	---	0.61	0.38	0.49

25.70	26:2	---	---	0.04	---	---	---	---	---
25.75	26:1	0.11	0.41	0.11	0.27	---	---	---	0.08
26.00	26:0	0.06	---	---	---	1.24	---	---	---
MBFA minus Demosp.		11.71	10.60	11.52	10.36	12.54	12.80	8.10	8.89
i-FS minus Demosp.		10.53	10.24	10.38	10.53	10.74	13.33	7.57	7.55
ai-FS minus Demosp.		6.21	5.19	5.57	4.92	6.20	7.04	4.30	4.12
aa-FS		0.20	0.30	0.10	0.24	0.55	0.47	---	0.12
zweifach ungesättigt, methylenunterbrochen		2.32	1.88	2.57	2.64	1.39	1.19	1.48	1.14
Demospongien-FS		35.52	30.51	37.43	33.15	22.83	20.68	45.88	42.98
cycloFS		1.67	0.97	1.82	0.99	1.32	1.04	3.24	1.12
MUFA (minus MBFA, minus i/ai, minus cy)		11.87	12.16	10.67	10.47	16.54	15.30	13.94	15.00
PUFA (>2 Db)		3.66	3.83	5.42	4.74	2.16	2.07	2.89	3.72
SAFA unverzweigt		16.31	24.01	14.52	21.57	25.73	25.82	12.60	15.18
OH		---	0.33	---	0.40	---	0.27	---	0.18
terpenoid		---	---	---	---	---	---	---	---

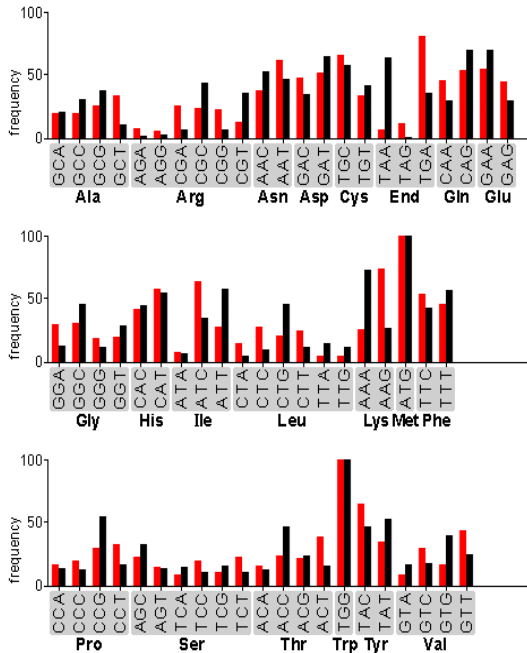
[<sup>a</sup>] manchmal gemischt mit 2,xdiMeN15; [<sup>b</sup>] größter Peak von 8+9+10Me; [<sup>c</sup>] manchmal rechte Schulter des Vorgängerpeaks; [<sup>d</sup>] 6Me-a15?; [<sup>e</sup>] manchmal linke Schulter des nächsten Peaks; [<sup>f</sup>] m/z 138, in *T.swinhoei* und *I.felix* nicht sauber; [<sup>g</sup>] gemischt mit 18:4; [<sup>h</sup>] manchmal gemischt mit 18:2; [<sup>i</sup>] manchmal gemischt mit N19:1; [<sup>j</sup>] m/z 312 anstelle von M<sup>+</sup> m/z 310; [<sup>k</sup>] mittlerer Peak; [<sup>l</sup>] kein M<sup>+</sup> vorhanden; [<sup>m</sup>] in *A.dilatata* 16Me; [<sup>n</sup>] ohne Demospongien-FS.

## H 4 Codongebrauch

**A)**

Codontable (black):  
Escherichia\_coli\_K12

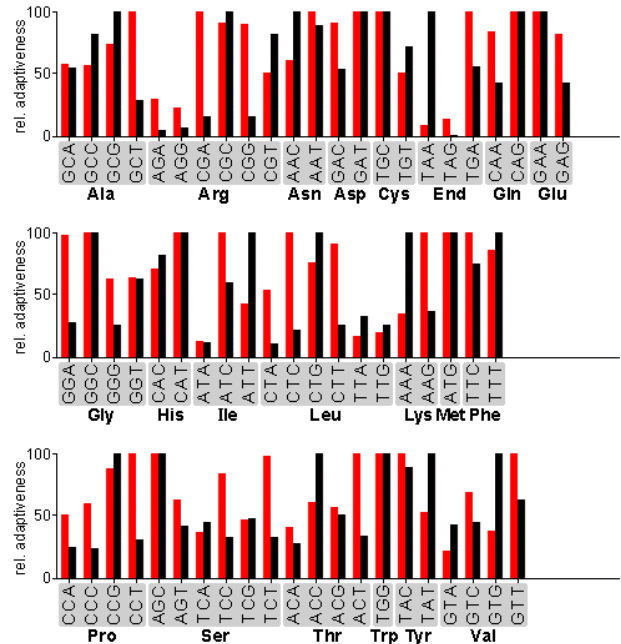
Mean difference: 14.66 %



**B)**

Codontable (black):  
Escherichia\_coli\_K12

Mean difference: 30.19 %



Anhang Abb. 52: Codongebrauch von *E. coli* K12 (schwarz) im Vergleich mit den Codons von SupA (rot). **A)** Häufigkeit [%]. **B)** relative Anpasstheit. Erstellt mit einem Online-Tool (<http://gcua.schoedl.de>).

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2 x	2-fach (z. B. doppelt konzentrierte Stammlösung)
16S	16 Svedberg Einheiten (meist im Zusammenhang mit rRNA)
AA	20:4 $\omega$ 6, Arachidonsäure
AcCN	Acetonitril
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AG	Arbeitsgemeinschaft
AK	Arbeitskreis
Amp <sup>100</sup>	Ampicillin in der Endkonzentration 100 $\mu$ g/mL
Amp <sup>R</sup>	Resistenz gegen Ampicillin
Apr <sup>50</sup>	Apramycin in der Endkonzentration 50 $\mu$ g/mL
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
AT	Acyltransferase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
B	Belgien
B&D	Bligh & Dyer
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CFB-Phylum	Cytophaga, Flavobacterium, Bacteroides-Phylum
CH	Schweiz
CLF	„Chain-length factor“ entspricht der Ketosynthase $\beta$ (KS $\beta$ )
Cam <sup>25</sup>	Chloramphenicol in der Endkonzentration 25 $\mu$ g/mL
CMN-Gruppe	Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia-Gruppe
CoA	Coenzym A
Cys	Cystein
Da	Dalton (= g/mol)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
Db	Doppelbindung
DC	Dünnschichtchromatographie
DEBS	6-Desoxy-erythronolid B Synthase
dest.	destilliert
DH	Dehydrogenase
DHA	22:6 $\omega$ 3, Docosahexaensäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotid
DPG	Diphosphatidylglycerol
DSGM	double strength germination medium
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dTTP	Desoxythymintriphosphat
EB	Elutionspuffer
ECL	äquivalenter Kettenlängenwert, "equivalent chain length",
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure (ethylene diamine tetracetic acid)
EIC	Extracted Ion Chromatogram

EM	Erlenmeyer(kolben)
EPA	20:5 $\omega$ 3, Eicosapentaensäure
ER	Enoylreduktase
Ery/ery	Protein bzw. Gen des Erythromycin A Genclusters
ESI	Elektrosprayionisation
ESI-FT-ICR	electrospray ionization- fourier transformation- ion cyclotron resonance
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FACS	Fluss-Sortierer ( <b>f</b> luorescence <b>a</b> ctivated <b>c</b> ell <b>s</b> orting)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAME	Fatty Acid Methyl Ester, Fettsäure Methylester
FAS	Fettsäuresynthase (fatty acid synthase)
FFA	Free Fatty Acids, Freie Fettsäuren
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FMN	Flavin-Mononukleotid
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FS	Fettsäure(n)
ft	Durchfluss, flow through
FZ	Forschungszentrum
GL	Glycolipide
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GNAT	GCN5-verwandte N-Acetyltransferase
GT	Glycosyltransferase
HMA	High Microbial Abundance
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	destilliertes ( <i>hier</i> : deionisiertes) Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (high performance liquid chromatography)
i	Induktion, induziert
inkl.	inklusive
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	kilo-Dalton (1 kDa = 1.000 g/mol)
Kan <sup>50</sup>	Kanamycin in der Endkonzentration 50 $\mu$ g/mL
Konz.	Konzentration
konz.	konzentriert
KS	Ketosynthase (auch: Ketoacylsynthase)
k.A.	keine Angabe
KR	Ketoreduktase
l	Lysat
LB Medium	Luria-Bertani Medium
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
LC-PUFA	langkettige polyungesättigte Fettsäuren ("long chain PUFA")
LMA	Low Microbial Abundance
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin
lyPC	LysoPC



MBFA	mittkettig (methyl)verzweigte Fettsäure ("mid-chain branched fatty acid")
MAT	Malonyl-CoA: ACP Transferase
MCS	Multiple Cloning Site
MeOH	Methanol
M/H-Phase	Methanol/Wasser-Phase
MIC	Massenspur, "monitored ion chromatogram"
MIDI	Microbial Identification System
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butyl-ether
MWCO	Molecular weight cut off
min	Minute(n)
maa	"mild alkaline methanolysis", milde alkalische Methanolyse
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
MT	Methyltransferase
MUFA	einfach ungesättigte Fettsäure ("monounsaturated fatty acid")
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid-Phosphat
Nal	Nalidixinsäure
NaOAc	Natriumacetat
NDP	Nukleosid-Diphosphat
NEB	New England Biolabs
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NL	Neutrallipide oder Niederlande
NMR	Kernresonanz (nuclear magnetic resonance)
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
<i>ori</i>	"origin of replication"
OTU	taxonomische Einheit (operational taxonomic unit)
p	Pellet
PA	"Phosphatidic acid", Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
Ped	Pederin
PI	Phosphatidylinositol
PKS	Polyketidsynthase
PL	Polarlipide, oder auch Phospholipide
PLFA	Phospholipid Fatty Acid Analysis, oder Polar Lipid Fatty acid Analysis
PMX B	Polymyxin B
PPTase	4'-Phosphopantetheinyltransferase
PPant	phosphopantetheinyl
Prot.	Protein
PS	Phosphatidylserin
PUFA	polyungesättigte Fettsäure ("polyunsaturated fatty acid")

rbs	ribosomale Bindestelle
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus, "restriction fragment length polymorphism"
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RP	Umkehrphase, "reverse phase"
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur oder Retentionszeit ("retention time")
rRNA	ribosomale RNA
SAFA	gesättigte Fettsäure ("saturated fatty acid")
SAM	S-Adenosylmethionin
SCUBA	Self Contained Underwater Breathing Apparatus
SDR	Kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (short-chain dehydrogenases/reductases)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulphate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
SM	Sphingomyelin
sn	supernatant (Überstand)
Str <sup>50</sup>	Streptomycin in der Endkonzentration 50 µg/mL
Sup	Sponge symbiont ubiquitous polyketide synthase
TAG	Tri-Acyl-Glyceride
TCA	Trichloressigsäure
TE	Thioesterase
TEM	Transmissions-Elektronen Mikroskopie
TE-Puffer	„Tris EDTA“-Puffer
TES-Puffer	„Tris EDTA Salt“, Puffer aus Tris, EDTA und NaCl
Tet <sup>12,5</sup>	Tetracyclin in der Endkonzentration 12,5 µg/mL
TFA	Trifluoressigsäure (trifluoric acid)
THF	Tetrahydrofuran
TIC	"total ion chromatogram"
Tsr <sup>5/25</sup>	Thistrepton in der Endkonzentration 5 bzw. 25 µg/mL
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, pH-Wert eingestellt mit Salzsäure (HCl)
T-Vektor	linearisierter Klonierungsvektor mit 3'-Thymidin-Überhängen
Tyr	Tyrosin
U	Units (Einheiten)
ui	uninduziert
ü/N	über Nacht (~ 16 h)
US	Ultraschall
vgl.	vergleiche
v/v	volume/volume
WGA	Gesamtgenomamplifizierung ("whole genome amplification")
wt	Wildtyp
w/v	weight/volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
ZVE	Zentrale Versorgung Eнденich, Bonn

## PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE

## Publikationen

2010 Hochmuth, T., Niederkrüger, H., Gernert, C., Siegl, A., Taudien, S., Platzer, M., Crews, P., Hentschel, U., Piel, J., 2010. Linking chemical and microbial diversity in marine sponges: possible role for Poribacteria as producers of methyl-branched fatty acids. *ChemBioChem*. 11 (18), 2572-8



**The cover picture shows** the marine sponge *Cacospongia mycofijiensis* and some of its microbial and lipid constituents. Sponges are one of the richest sources of natural products, and many of these animals harbor massive consortia of diverse symbiotic bacteria. These symbionts are increasingly being recognized as the true source of many sponge-derived primary and secondary metabolites. In addition to cytotoxic polyketides, such as fijianolides (laulimalides), latrunculin and mycothiazol, *C. mycofijiensis* contains numerous highly characteristic mid-chain-branched fatty acids in its lipids. These fatty acids are generally detected in high-microbial-abundance sponges, but have not been found in sponges harboring few bacteria.

Metagenomic deep sequencing of biosynthetic genes, comparative lipid analysis, and 16S rRNA studies of symbionts suggest that symbionts belonging to the sponge-specific candidate phylum "Poribacteria" might synthesize these lipids by employing unusual polyketide synthase-like enzymes. For more information see the paper by J. Piel et al. on p. 2572 ff. Illustration: Jörn Piel, Ute Hentschel, and Phillip Crews.

2010 Siegl, A., Kamke, J., Hochmuth, T., Piel, J., Richter, M., Liang, C., Dandekar, T., Hentschel, U., 2010. Single-cell genomics reveals the lifestyle of Poribacteria, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. *ISME J.* 5 (1), 61-70

2009 Hochmuth, T., Piel, J., 2009. Polyketide synthases of bacterial symbionts in sponges – evolution-based applications in natural products research. *Phytochemistry*. 70 (15-16), 1841-9

2008 Nguyen, T., Ishida, K., Jenke-Kodama, H., Dittmann, E., Gurgui, C., Hochmuth, T., Taudien, S., Platzer, M., Hertweck, C., Piel, J., 2008. Exploiting the mosaic structure of trans-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection. *Nat. Biotechnol.* 26, 225-233.

### **Vorträge und Poster**

04/2008 "Trans-AT Polyketide Synthases: Evolution-based Applications in Natural Product Research", Vortrag beim 7. Colloquium des SPP 1152 'EVolution der METabolischen Diversität' der DFG, Halle (Saale)

02/2007 "Evolution and function of monomodular polyketide synthases in uncultured bacterial symbionts of marine sponges", Posterpräsentation beim 6. Colloquium des SPP 1152 'EVolution der METabolischen Diversität' der DFG, Halle (Saale)

06/2006 "Evolutionary Analysis of Polyketide Synthases in Symbionts of Marine Sponges", Vortrag beim 5. Colloquium des SPP 1152 'EVolution der METabolischen Diversität' der DFG, Halle (Saale)