

Expression und Untersuchung von Enzymen der Pederin-Biosynthese aus einem nicht kultivierten Symbionten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Diplom-Naturwissenschaftlerin (Dipl.-Nat.)

Katrin Zimmermann

aus Marienberg / Sa.

Bonn, 2008

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

Gutachter: 1. Prof. Dr. Jörn Piel
 2. Prof. Dr. Hans-Georg Sahl
 3. Prof. Dr. Albert Haas
 4. Prof. Dr. Gabriele Bierbaum

Tag der Doktorprüfung: 17.09.2008

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.09.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

für meine Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena begonnen und der überwiegende Teil am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Jörn Piel angefertigt.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Jörn Piel, der mir die Gelegenheit gab, die vorliegende Arbeit anzufertigen und mir durch zahlreiche Ideen und Tipps die erfolgreiche Durchführung ermöglichte. Dadurch konnte ich mir eine Vielzahl Fertigkeiten und Fähigkeiten aneignen. Durch den Umzug vom MPI in Jena zur Universität Bonn kam nicht nur Arbeit bei der Einrichtung des neuen Labors auf mich zu, sondern es bot mir auch Gelegenheit, auf vielen Gebieten der Verwaltung, Organisation sowie der Sicherheit und der Gentechnik viel nützliche Erfahrungen zu sammeln.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Hans-Georg Sahl bedanken, der freundlicherweise das Zweitgutachten meiner Arbeit übernommen hat.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Max Planck Instituts für chemische Ökologie in Jena, vornehmlich der Abteilung Bioorganische Chemie unter der Leitung von Prof. Wilhelm Boland und Ales Svatos und seinen Mitarbeitern der Massenabteilung. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Dr. Nicolas Delaroque, Vera Roman und Ivonne Höfer, die mir vor allem zu Beginn meines Promotionsvorhabens viele wertvolle Tipps gegeben haben. Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung, vor allem Dr. Annika Schmidt, danke ich ebenfalls für das nette Arbeitsklima und die schöne Zeit in Jena.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Kekulé-Institutes für Organische Chemie und Biochemie bedanken, vorwiegend bei meiner Arbeitsgruppe für das tolle Arbeitsklima und die vielen netten Gespräche, sowohl privater als auch fachlicher Natur. Insbesondere gilt mein Dank Kathrin Reinhardt und Martina Heycke, vor allem für private Unterstützung und Hilfe, sowie Jana Moldenhauer, Zeynep Yunt, Holger Niederkrüger, Thomas Hochmuth, Daniel Flachshaar,

Dr. Cristian Gurgui, Dr. Daniel Butzke und Dr. Katja Fisch für ihre fachliche Hilfe, aber zusammen mit dem Rest der Arbeitsgruppe natürlich auch für die lustigen Feiern und Ausflüge und die tolle Zeit, die wir zusammen verbracht haben.

Der Abteilung für Massenanalytik des Kekulé Institutes der Universität Bonn möchte ich ebenfalls danken für die zahlreichen Messungen meiner Proben, insbesondere Frau Dr. Engeser, Frau Peters-Pflaumbaum und Frau Sondag, die sich durch die Art meiner Proben mit für sie neuen Problemstellungen auseinandersetzen mussten. Frau Dr. Engeser möchte ich besonders für die Hilfe bei der MS-MS-Auswertung danken und für ihre Bemühungen bezüglich der Massebestimmung der Proteine.

Jenny Wirtz und Dr. Thomas Kolter von der Abteilung Sandhoff des Kekulé-Institutes sowie André Gerhardt und Dr. Sven Freudenthal vom Arbeitskreis Famulok möchte ich danken für ihre Hilfe bei Strahlenschutz-Tätigkeiten. Insbesondere Jenny Wirtz möchte ich dafür danken, dass sie mir den Umgang mit Radioaktiv-Gelen gezeigt hat.

Für das Korrekturlesen der Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Kathrin Reinhardt bedanken, die mich auch sonst in jeder Hinsicht unterstützt hat.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie sowie meinen Freunden für ihre Hilfe und Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	13
2. Abstract	15
3. Einleitung	17
3.1 Polyketide.....	17
3.2 Suche nach pharmakologisch interessanten Naturstoffen.....	19
3.3 Biosynthese von Polyketiden	20
3.4 Unterteilung der PKS	26
3.5 Varianten modularer Typ-I-PKS.....	30
3.6 Nichtribosomale Peptidsynthetasen	32
3.7 NRPS/PKS-Hybride	35
3.8 Substanzen der Pederinfamilie	36
3.8.1 Pederin	38
3.8.2 Biosynthese von Pederin.....	39
4. Zielsetzung	46
5. Ergebnisse und Diskussion	48
5.1 Expression und Massebestimmung der ACP	48
5.1.1 Intein-Fusionsproteine aus pTYB1	49
5.1.2 His ₆ -Fusionsproteine aus pRSETB.....	50
5.1.3 Maltosebinde-Fusionsproteine aus pMAL-c2X.....	51
5.1.4 His ₈ -Fusionsproteine aus pHIS8-3 / pHIS8-3 <i>svp</i>	59
5.2 Expression der AT-Domänen.....	70
5.2.1 AT PedC	70
5.2.2 AT PedD	73
5.3 Expression der O-MT-Domänen.....	74
5.3.1 MBP-Fusionsproteine aus pMAL-c2X.....	74
5.3.2 His ₈ -Fusionsproteine aus pHIS8-3.....	76
5.4 Expression weiterer Proteine.....	78
5.4.1 Oxidoreduktase PedB	78
5.4.2 A-Domänen der NRPS.....	81
5.4.3 HMGC _o A-Synthase PedP und KS PedM.....	84
5.5 ACP-AT-Assay	89
5.5.1 ACP-AT-Assay mit massenanalytischen Nachweisen	90
5.5.2 ACP-AT-Assay mit radioaktiv markierten Substraten	92
5.5.3 Kinetik der ACP-AT-Assays	98
5.6 O-MT-Assay	102
5.6.1 O-MT-Assay mit PedA, PedE und PedO.....	104
5.6.2 O-MT-Assay mit OnnD	119
5.7 Zusammenfassung und Ausblick	122

6. Material und Methoden	126
6.1 Verwendete Cosmide, Vektoren und Organismen	126
6.1.1 Verwendete Cosmide.....	126
6.1.2 Verwendete Vektoren	126
6.1.3 Verwendete Organismen	128
6.2 Medien	128
6.2.1 LB-Medium	129
6.2.2 Rich Medium mit Glucose.....	129
6.3 Glycerinfrierkulturen	129
6.4 Herstellung kompetenter Zellen.....	130
6.4.1 Herstellung hitzeschockkompetenter Zellen	130
6.4.2 Herstellung elektrokompeter Zellen	131
6.5 Transformation.....	132
6.5.1 Hitzeschocktransformation.....	132
6.5.2 Elektroporation	133
6.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	133
6.6.1 Verwendete Primer	135
6.7 Agarose-Gelelektrophorese	139
6.8 Aufreinigung von Gelfragmenten	140
6.9 Plasmidpräparation	140
6.10 DNA-Konzentrationsbestimmung	141
6.11 Restriktion von DNA	142
6.12 Klonierung	143
6.12.1 Klonierung der PCR-Produkte und Sequenzierung.....	143
6.12.1.1 Reinigung der PCR-Produkte.....	143
6.12.1.2 A-Tailoring.....	143
6.12.1.3 TA-Klonierung	144
6.12.1.4 Transformation und Überprüfung	145
6.12.1.5 Sequenzierung	145
6.12.2 Klonierung in den Expressionsvektor.....	147
6.12.2.1 Restriktion der Fragmente.....	147
6.12.2.2 Restriktion der Vektoren	148
6.12.2.3 Dephosphorylierung der Vektoren	149
6.12.2.4 Kompatibilität der Schnittstellen.....	149
6.12.2.5 MCS und Vektorkarten der Expressionsvektoren.....	150
6.12.2.6 Ligation und Transformation	154
6.13 Proteinexpression.....	158
6.13.1 MBP-Fusionsprotein.....	161
6.13.1.1 Reinigung des MBP-Fusionsproteins.....	161
6.13.1.2 Spaltung des MBP-Fusionsproteins	161

6.13.2	His-Fusionsproteine	161
6.13.3	Intein-Fusionsprotein	163
6.13.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	163
6.13.4.1	Coomassie-Färbung des Proteingels.....	165
6.13.4.2	Silberfärbung des Proteingels	165
6.14	Bestimmung der Proteinmassen	166
6.14.1	MALDI-TOF-MS der Proteine	171
6.14.2	HPLC-Entsalzung und ESI-FT-ICR-MS der Proteine.....	173
6.14.3	Vivaspin-Entsalzung und ESI-FT-ICR-MS der Proteine	174
6.15	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	174
6.16	ACP-AT-Assay und Analytik des Assays.....	176
6.16.1	ACP-AT-Assay I.....	176
6.16.2	ACP-AT-Assay II	177
6.16.3	Massenanalytik der Reaktionsprodukte der ACP-AT-Assays.....	177
6.16.4	ACP-AT-Assay mit ¹⁴ C-markiertem Substrat	178
6.16.5	Kinetik der ACP-AT-Assays	179
6.17	O-MT-Assay und Analytik des Assays.....	181
6.17.1	Reinigung von Pederin.....	181
6.17.2	Löslichkeit der Substrate	182
6.17.3	O-MT-Assay	183
6.17.4	Analytik des O-MT-Assays	183
6.17.5	Derivatisierung des Reaktionsproduktes des O-MT-Assays	185
6.17.6	NMR-Analyse des PedO-Mycalamid A-Assays.....	186
6.18	Verwendete Chemikalien	187
6.19	Verwendete Geräte und Materialien	190
7.	Abkürzungsverzeichnis	193
8.	Literaturverzeichnis	195
9.	Anhang	203
10.	Publikationen	213
11.	Selbstständigkeitserklärung	214

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1:	Strukturen, Herkunft und Eigenschaften einiger Polyketide.	17
Abb. 3.2:	Aktivierung zum Thioester (CoA-Ester).	21
Abb. 3.3:	Starter- und Elongationseinheiten der Polyketidbiosynthese.	21
Abb. 3.4:	Reaktion vom <i>apo</i> -ACP zu <i>holo</i> -ACP.....	22
Abb. 3.5:	Reaktionen während der Polyketidbiosynthese.	23
Abb. 3.6:	Mögliche Reaktionsschritte an der alternierenden Ketogruppe während der Polyketidbiosynthese.	24
Abb. 3.7:	Allgemeiner Aufbau eines Polyketids.	25
Abb. 3.8:	Reaktion von 6-Deoxyerythronolid B zu Erythromycin A.....	26
Abb. 3.9:	Aufbau von Fettsäure- und Polyketidsynthasen.	29
Abb. 3.10:	<i>trans</i> - und <i>cis</i> -AT-PKS.	30
Abb. 3.11:	Phylogenetische Analyse von KS-Domänen bakterieller Typ-I-PKS.	31
Abb. 3.12:	Strukturen und Herkunft nichtribosomal produzierter Peptide.	33
Abb. 3.13:	Reaktionsfolge bei Nichtribosomalen Peptidsynthetasen.....	34
Abb. 3.14:	Strukturen von NRPS/PKS-Hybrid-produzierten Substanzen.	36
Abb. 3.15:	Einige Mitglieder der Pederinfamilie und ihre Herkunft.....	37
Abb. 3.16:	Putativer Gencluster zur Biosynthese von Pederin.....	41
Abb. 3.17:	Putative Biosynthese von Pederin durch ein NRPS/PKS-Hybrid.	43
Abb. 5.1:	Expression der ACP aus pMALc-2X.	52
Abb. 5.2:	Expression der ACP aus pMALc-2X unter Sfp-Coexpression.	53
Abb. 5.3:	Faktor-Xa-Spaltung der exprimierten ACP aus pMALc-2X.....	54
Abb. 5.4:	MALDI-TOF-MS-Spektren von PedI2.	56
Abb. 5.5:	PCR mit Vektor pREP4 <i>sfp</i>	57
Abb. 5.6:	Expression der ACP aus pHIS8-3 <i>svp</i> in <i>E. coli</i> BL21 DE3.	60
Abb. 5.7:	Expression von PedI3 aus pHIS8-3 <i>svp</i> in <i>E. coli</i> Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS.	61
Abb. 5.8:	Expression der ACP aus pHIS8-3.....	62
Abb. 5.9:	MALDI-TOF-TOF-MS-Spektren von PedN.....	63
Abb. 5.10a:	HPLC-Lauf von <i>apo</i> -PedN, <i>holo</i> -PedN und Elutionspuffer.....	64
Abb. 5.10b:	Proteinkonzentration der HPLC-Fractionen von <i>apo</i> - und <i>holo</i> -PedN. ..	65
Abb. 5.11:	ESI-FT-ICR-MS-Spektren von PedN nach HPLC-Lauf.	66
Abb. 5.12:	ESI-FT-ICR-MS-Spektrum von <i>holo</i> -PedN nach Vivaspin-Entsalzung. .	67
Abb. 5.13:	ESI-FT-ICR-MS-Spektrum von PedI3 nach Vivaspin-Entsalzung.....	68
Abb. 5.14:	Expression von PedGNAT-ACP aus pHIS8-3 <i>svp</i>	69
Abb. 5.15:	Expression von PedC aus pMAL-c2X.....	71
Abb. 5.16:	Expression von PedD aus pHIS8-3.....	74
Abb. 5.17:	Expression der <i>O</i> -MT aus pMAL-c2X.	75
Abb. 5.18:	ESI-FT-ICR-MS-Spektrum von PedO aus pMAL-c2X.	76
Abb. 5.19:	Expression der <i>O</i> -MT aus pHIS8-3.	77
Abb. 5.20:	Expression von PedB aus pMAL-c2X.....	80

Abb. 5.21: Assay zur Aminosäurespezifität von exprimierten A-Domänen.	82
Abb. 5.22: Expression der A-Domänen aus pMAL-c2X.....	83
Abb. 5.23: Expression der A-Domänen aus pHIS8-3.....	83
Abb. 5.24: Reaktionsabfolge zur Bildung der Exomethylengruppe in Pederin.....	85
Abb. 5.25: Expression von PedM und PedP aus pHIS8-3.....	87
Abb. 5.26: Proteingel und Autoradiogramm des ACP-AT-Assays.....	93
Abb. 5.27: Reaktionen des gekoppelten Assays für die ACP-AT-Kinetik.....	98
Abb. 5.28: Ergebnisse der Kinetikuntersuchung von PedN und PedD.....	100
Abb. 5.29: Relevante Strukturen für die O-MT-Assays.....	103
Abb. 5.30: Massenspektrum des Assays von PedO mit Mycalamid A.....	104
Abb. 5.31: Hochauflösung des Massenspektrums vom PedO-Mycalamid A-Assay. .	106
Abb. 5.32: MS-MS-Spektren von Mycalamid A und B und vom Reaktionsprodukt des Assays von PedO mit Mycalamid A.....	108
Abb. 5.33: Theoretische Fragmentierung von Mycalamid A und O-methyliertem Mycalamid A.....	109
Abb. 5.34: LC-MS mit Mycalamid A und B und mit dem Reaktionsprodukt des Assays von PedO mit Mycalamid A.....	112
Abb. 5.35: Oxidation von Mycalamid A und Mycalamid B.....	114
Abb. 5.36: ¹ H-NMR vom PedO-Mycalamid A-Assay.....	116
Abb. 5.37: Bildung von 18-O-Methylmycalamid A.....	118
Abb. 5.38: Massenspektren von Pederin und vom OnnD-Pederin-Assay.....	120
Abb. 6.1: MCS und Vektorkarten der Expressionsvektoren.....	153
Abb. A.1: Theoretische Isotopenspektren von Pedi2 und MBP.....	203
Abb. A.2: Theoretische Isotopenspektren der ACP.....	205
Abb. A.3: Theoretisches Massenspektrum der O-MT PedO.....	206
Abb. A.4: Massenspektren der O-MT-Assays mit Mycalamid A.....	208
Abb. A.5: Massenspektren der O-MT-Assays mit Mycalamid B.....	210
Abb. A.6: ¹ H-NMR von Mycalamid A.....	211
Abb. A.7: ¹ H-NMR von Mycalamid B.....	212

Tabellenverzeichnis

Tab. 5.1:	$^1\text{H-NMR}$ -Daten.....	117
Tab. 6.1:	Verwendete Cosmide zur Amplifizierung der Biosynthesegene.....	126
Tab. 6.2:	Herkunft und Verwendung von Klonierungsvektoren.	126
Tab. 6.3:	Eigenschaften verwendeter Stämme.....	128
Tab. 6.4:	Lösungen zum Herstellen von chemisch kompetenten Zellen.	131
Tab. 6.5:	Verwendete Primer und ihre Eigenschaften.	136
Tab. 6.6:	Puffer für die Plasmidpräparation.....	141
Tab. 6.7:	Verwendete Sequenzierungsprimer.	146
Tab. 6.8:	Konstrukte der klonierten PCR-Produkte.....	146
Tab. 6.9:	Konstrukte der klonierten Biosynthesegene im Expressionsvektor.	155
Tab. 6.10:	Lösungen für das Aufarbeiten von Zellkulturen nach der Proteinexpression.....	160
Tab. 6.11:	Puffer für die Aufreinigung von His-Fusionsproteinen.....	162
Tab. 6.12:	Puffer für die Aufreinigung und Spaltung von Intein-Fusionsproteinen. ..	163
Tab. 6.13:	Lösungen für die Silberfärbung von Proteingelen.....	166
Tab. 6.14:	Theoretische Massen der aus pMAL-c2X exprimierten Proteine.	167
Tab. 6.15:	Theoretische Massen der aus pHIS8-3 / pHIS8-3 <i>svp</i> exprimierten Proteine.....	168
Tab. 6.16:	Theoretische Massen der aus pRSETB und pET52b(+) exprimierten Proteine.....	170
Tab. 6.17:	Theoretische Massen der nach der Spaltung erhaltenen Proteine aus pTYB1.	170
Tab. 6.18:	Lösungen für die Entsalzung mit ZipTip.....	172
Tab. 6.19:	Lösungen für die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Amidoschwarz.	175

1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Enzymen des *ped*-Genclusters aus einem bisher nicht kultivierten Symbionten.

Der *ped*-Cluster gehört zu Typ-I-Polyketidsynthasen (PKS), in denen die Acyltransferasen (AT) *in trans* agieren. Die PKS ist modular aufgebaut, wobei jedes Modul in Domänen untergliedert ist. Zwei Module bestehen aus Nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS). Dem Cluster wird die Herstellung von Pederin zugeschrieben, eine sehr wirksame Antitumorsubstanz, die in Käfern der Gattung *Paederus* und *Paederidus* gefunden werden kann. Die eigentliche Biosynthese von Pederin wird wahrscheinlich durch einen in den Käfern lebenden bakteriellen Symbionten durchgeführt, der ein naher Verwandter von *Pseudomonas aeruginosa* ist.

Für genauere Hinweise auf die Funktionen einzelner Enzyme während der Pederin-Biosynthese wurden verschiedene Gene des putativen Genclusters kloniert und exprimiert. Die aufgereinigten Proteine konnten anschließend in Enzym-Assays eingesetzt werden. Hauptaspekt der Arbeit waren dabei zum einen die AT und Acylcarrierproteine (ACP) und zum anderen die *O*-Methyltransferasen (*O*-MT). Dabei sollten Substrat- und ACP-Spezifität der AT und die Regioselektivität der *O*-MT näher beleuchtet werden.

Von den untersuchten ACP wurde PedN, codiert als separates Gen, und PedI3, eine Doppel-ACP innerhalb eines Moduls, erfolgreich als His₈-Fusionsprotein exprimiert. Die Umsetzung vom *apo*- zum aktiven *holo*-ACP gelang durch die Verwendung von Svp, eine Phosphopantetheinyltransferase aus *Streptomyces verticillus* ATCC15003. Die Bestätigung der erfolgten Phosphopantetheinylierung erfolgte durch MALDI-TOF- bzw. ESI-FT-ICR-MS. Die beiden vorhandenen AT PedC und PedD konnten als MBP- bzw. His₈-Fusionsprotein hergestellt werden. Eine Expression von PedC mit N-terminalen His₈ brachte nur unlösliches Protein hervor. Zur Untersuchung der ACP-AT-Assays konnte die Verwendung von radioaktiv markierten Substraten als geeignete Methode herausgestellt werden. Dabei zeigte sich, dass PedD in der Lage ist, Malonyl-CoA zu übertragen, während es Acetyl-CoA nicht als Substrat nutzen kann. Der Transfer von Malonyl-CoA erfolgt dabei sowohl auf PedN als auch auf PedI3. Die AT weist demnach eine Substrat- jedoch keine ACP-Spezifität auf. PedC zeigte weder gegenüber Malonyl- noch Acetyl-CoA Aktivität und ist nach bisherigen Daten nicht in der Lage, das Substrat auf die ACP zu übertragen. Am Ende wurde

auch die GCN5-verwandte *N*-Acetyltransferase (GNAT) mit dem darauffolgenden ACP kloniert und als His₈-Fusionsprotein exprimiert. Bei der GNAT könnte es sich um den Überträger des Startersubstrates Acetyl-CoA handeln. Kinetische Untersuchungen des Transfers von Malonyl-CoA auf PedN durch PedD wurden begonnen. Die Durchführung dieser Untersuchung muss jedoch noch optimiert werden, um die entsprechenden Parameter k_{cat} und K_m zu ermitteln.

Da Pederin vier Methoxygruppen, der *ped*-Cluster aber nur die drei *O*-MT PedA, PedE und PedO enthält, sollten diese untersucht werden. Sie wurden jeweils als MBP- und His₈-Fusionsprotein erfolgreich exprimiert. Als Substratanaloga dienten Mycalamid A und B aus dem Schwamm *Mycale hentscheli*, die weniger *O*-Methylierungen als Pederin aufweisen, ihm strukturell aber sehr ähneln. Die Enzym-Assays von Fusionsprotein, Substrat und *S*-Adenosylmethionin (SAM) als Kofaktor wurden mittels ESI-microQ-TOF-MS analysiert. Dabei zeigte sich, dass PedO in der Lage ist, eine Hydroxylgruppe in Mycalamid A zu methylieren. MS/MS-Versuche stellten heraus, dass es sich um die Methylierung der OH-Gruppe an C17 oder C18 handeln muss. Die Derivatisierung des Reaktionsproduktes sowie LC-MS brachten keine spezifischeren Aussagen. Die Analyse des Reaktionsproduktes aus PedO und Mycalamid A mittels 1D- und 2D-NMR lieferte aber das Ergebnis, dass es sich um 18-*O*-Methylmycalamid A handeln muss. Diese durch PedO erzeugte Substanz ist nicht als Naturstoff bekannt und stellt ein neues Mitglied der Mycalamide dar. Damit wurde der erste funktionelle Beweis erbracht, dass der *ped*-Gencluster für die Biosynthese von Pederin verantwortlich ist.

OnnD, eine *O*-MT aus dem *onn*-Gencluster (putativer Cluster der Biosynthese von Onnamid A aus *Theonella swinhoei*) wurde erfolgreich als MBP-Fusionsprotein exprimiert. Der entsprechende Enzym-Assay mit Pederin als Substrat zeigte keine *O*-Methylierung. Demnach scheint OnnD nicht für die Methoxygruppe an C13 zuständig zu sein, oder Pederin wird als Strukturanaloga nicht akzeptiert.

Für zukünftige Versuche wurden die Oxidoreduktase PedB, die beiden A-Domänen, die Ketosynthase PedM und die HMGC_oA-Synthase PedP als MBP- und teilweise als His₈-Fusionsprotein erfolgreich exprimiert. Die beiden letztgenannten Enzyme sind wahrscheinlich an der Bildung der Exomethylengruppe an C4 in Pederin beteiligt. Die A-Domänen sind Bestandteile der NRPS und für die Auswahl und Aktivierung der jeweils einzubauenden Aminosäure erforderlich.

2. Abstract

Presented here are the results of work carried out on the *ped*-cluster enzymes from an uncultivated symbiont.

The *ped*-cluster encodes a type I polyketide synthase (PKS), in which the acyltransferases (AT) act *in trans*. The PKS consists of modules that are divided into domains. Two of these modules harbor non-ribosomal peptide synthetases (NRPS). Strong evidence exists that the cluster encodes the biosynthesis of pederin, a highly active antitumor compound. Pederin can be found in beetles of the genera *Paederus* and *Paederidus*, but biosynthesis of pederin is performed by a bacterial symbiont that lives in the beetle and that has a close relationship to *Pseudomonas aeruginosa*.

In order to gain further insights into the function of distinct enzymes during the biosynthesis of pederin, different genes of the putative gene cluster were cloned and expressed. The purified enzymes were then used for enzyme assays. An important aspect of the work was to look at the AT and acyl carrier proteins (ACP) as well as the *O*-methyltransferases (*O*-MT). Investigations into substrate- and ACP-specificity of the AT and regioselectivity of the *O*-MT was carried out.

Successful expression as His₈-fusion protein in the case of the tested ACP was carried out for PedN, encoded as a separate gene, and PedI3, a didomain-ACP within a module of the PKS. Use of Svp, a phosphopantetheinyltransferase from *Streptomyces verticillus* ATCC15003, leads to conversion of *apo*-ACP, forming an active *holo*-ACP. Confirmation of the successful phosphopantetheinylation was ascertained using MALDI-TOF- and ESI-FT-ICR-MS. The two available AT PedC and PedD were produced as maltose binding- or His₈-fusion proteins. Expression of PedC with *N*-terminal histidine tag resulted only in insoluble protein. For analysis of the ACP-AT-assays the use of radioactive labeled substrates was found to be the favourable method. This method showed that PedD is able to use malonyl-CoA as a substrate, but not acetyl-CoA. PedD transfers malonyl-CoA to PedN as well as to PedI3. The AT PedD showed substrate, but not ACP-specificity. PedC had no affinity for malonyl- or acetyl-CoA. Preliminary data suggest that PedC is not able to transfer any substrate to the ACP. The GCN5-related *N*-acetyltransferase (GNAT) with the neighbouring ACP was also cloned and expressed as His₈-fusion protein. GNAT is probably responsible for the transfer of the initiation substrate, acetyl-CoA.

Kinetic experiments for the transfer of malonyl-CoA to PedN by PedD have been started, but the procedure must still be optimized in order to obtain the appropriate parameters k_{cat} and K_m .

Because pederin has four methoxygroups, but the *ped*-cluster only contains three *O*-MT, these three enzymes (PedA, PedE and PedO) were examined. Each of them was successfully expressed as maltose binding- and as His₈-fusion proteins. Mycalamide A and B from the sponge *Mycale hentscheli* were used as substrate analogues. They have less *O*-methylations, but their structure is very close to that of pederin. The enzyme-assays of the fusion proteins were carried out with substrate and the cofactor *S*-adenosylmethionine (SAM). These were analysed by ESI-microQ-TOF-MS. This showed that PedO is able to methylate one hydroxyl group of mycalamide A. MS/MS-experiments revealed that the methylation occurs at the C17 or C18 OH-group. Derivatisation of the reaction product or LC-MS did not provide more specific conclusions. Analysis of the product of PedO and mycalamide A using 1D- and 2D-NMR showed that 18-*O*-methylmycalamide A was formed. This substance is not a known natural product and is a new member of the mycalamides. These results represent the first functional proof that *ped*-gene cluster encodes for the biosynthesis of pederin.

The *O*-MT OnnD from the *onn*-cluster (putative gene cluster for biosynthesis of onnamide A from *Theonella swinhoei*) was successfully expressed as maltose binding fusion protein. The enzyme assay with pederin as the substrate showed no *O*-methylation. It seems that OnnD is either not responsible for the methylation of OH at C13, or it does not accept pederin as structural analogue.

For future experiments, the oxidoreductase PedB, the two A-domains, the ketosynthase PedM and the HMGC_oA-synthase PedP have been successfully expressed as maltose binding- and partly as His₈-fusion proteins. The latter two enzymes are likely involved in the formation of the exomethylene group at C4 of pederin. The A-domains, which are part of the NRPS, are responsible for the choice and activation of the amino acids that are built in.

3. Einleitung

3.1 Polyketide

Bei Polyketiden handelt es sich um Naturstoffe, die von Bakterien, Pilzen und Pflanzen produziert werden können.¹ Sie sind eine Familie von Substanzen mit hoher struktureller Diversität, die häufig biologische Aktivität aufweisen und daher von großem pharmakologischem Interesse sind. Ihre pharmazeutischen Eigenschaften erstrecken sich von antibiotischer, antifungaler und antiparasitärer bis hin zu Antitumor- und immunsuppressiver Wirkung.² Einige Polyketide und ihre biologischen Aktivitäten sind in Abb. 3.1 dargestellt.

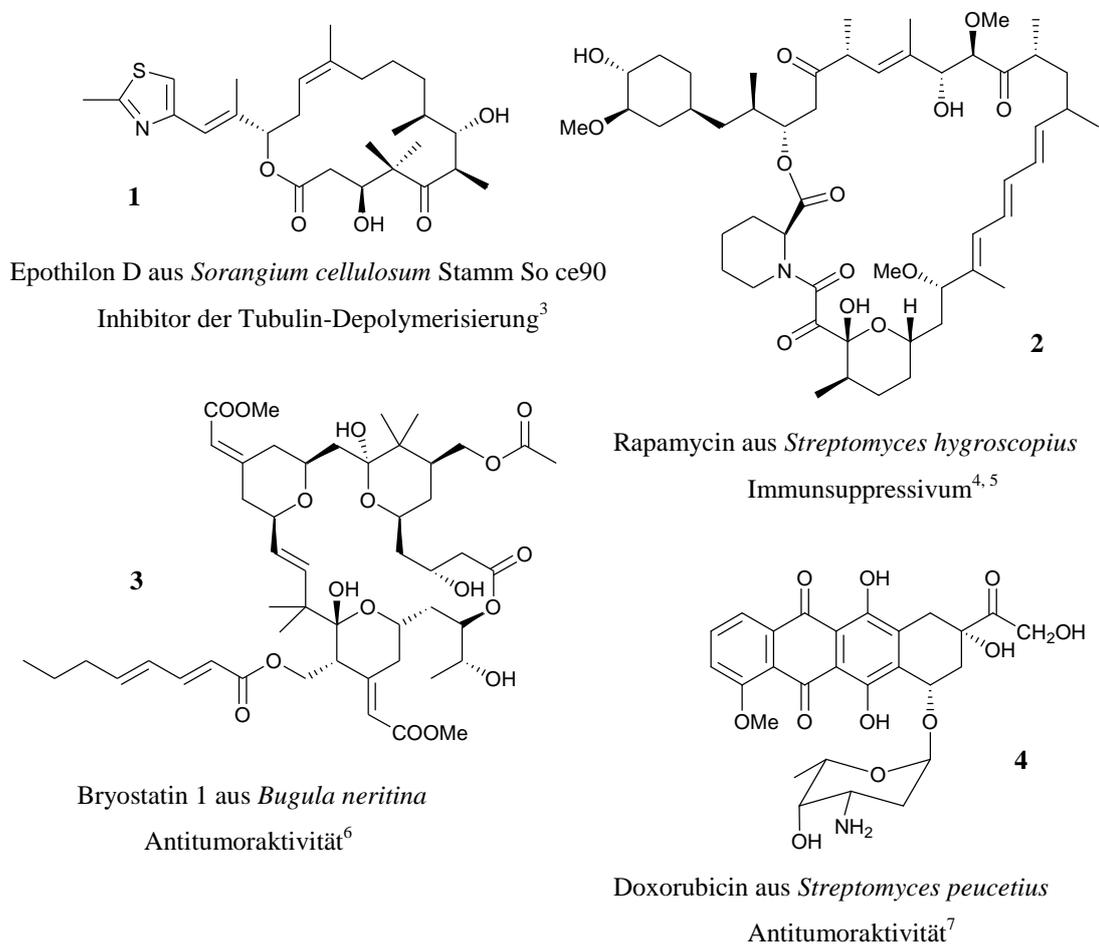


Abb. 3.1: Strukturen, Herkunft und Eigenschaften einiger Polyketide.

Das in Abb. 3.1 dargestellte Polyketid Doxorubicin **4** ist eine schon seit Längerem gebräuchliche Antitumorsubstanz und wird von Actinomyceten produziert. Es handelt sich dabei um ein Zytostatikum, das durch DNA-Interkalation zu

Strangbrüchen führt und damit das Wachstum von Geweben hemmt.⁸ Bryostatin 1 **3** weist Wirksamkeit gegen eine Vielzahl von Krebszelllinien auf wie beispielsweise Bauchspeicheldrüsen- und Nierenkrebs oder Leukämie.⁶ Allein bzw. in Kombination mit anderen Wirkstoffen ist es momentan in mehreren Studien vertreten, die sich in der klinischen Phase II oder III befinden.⁶ Ebenfalls zu den Polyketiden gehörend, stellen auch Tetracycline eine sehr bedeutende Klasse von Antibiotika dar. Sie werden auch von Actinomyceten produziert. Ihre Wirkung beruht auf der Inhibierung der Proteinbiosynthese durch Störung der tRNA-Bindung an die 30S Untereinheit der Ribosomen. Die bekannteste Substanz ist Tetracyclin selbst, aber zum Beispiel auch Oxytetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin finden in der Medizin Verwendung.^{8,9}

Für die Mikroorganismen selbst spielen Polyketide eine Rolle als Sekundärmetabolite, die zur Selbstverteidigung, zum Angriff oder auch zur Kommunikation dienen können.¹⁰ Meistens ist ihr Nutzen für den Produzenten jedoch nicht aufgeklärt.¹¹

Erste Untersuchungen über die Bildung von Polyketiden gehen bis 1893 zurück, als sich James N. Collie mit der Synthese von Orcinol beschäftigte. Seitdem hat sich das Forschungsfeld der Polyketide enorm weiterentwickelt.² James N. Collie prägte auch den Term Polyketene, der die Polymerisation von Keten-Untereinheiten widerspiegeln sollte. Dieser Begriff wurde später zu Polyketid umgeformt.¹²

Polyketide stellen nicht nur eine Substanzklasse mit hoher struktureller Diversität dar, sondern sind auch auf vielen Gebieten geeignete Wirkstoffe oder Wirkstoffkandidaten. Aufgrund der Komplexität der Strukturen ist ein ökonomischer Zugang zu ihrer chemischen Synthese aber häufig versperrt. Daher müssen andere Möglichkeiten gefunden werden, sie zugänglich zu machen. Auch das Wissen über ihre Biosynthese ist dabei sehr wichtig.²

3.2 Suche nach pharmakologisch interessanten Naturstoffen

Die Entdeckung neuer Naturstoffe ist von sehr großem Interesse. Beispielsweise entwickeln immer mehr menschliche, tierische und landwirtschaftliche Pathogene eine Resistenz gegen eingesetzte Antibiotika. Daher spielt die Suche nach neuen Wirkstoffkandidaten eine sehr große Rolle.¹³

Dies kann zum einen durch das Screenen nach neuen Naturstoffen erfolgen.¹⁴ Ein aktuelles Beispiel ist das gegen *Staphylococcus aureus* wirkende Antibiotikum Platensimycin, das in *Streptomyces platensis* entdeckt wurde.¹⁵ Zum anderen besteht aber auch die Möglichkeit kombinatorischer Biosynthese. Dabei werden die für die Produktion der Substanz verantwortlichen Gene und Enzyme verändert, um strukturell modifizierte Wirkstoffe zu entwickeln. Dies konnte schon erfolgreich für Polyketidsynthasen (PKS) durchgeführt werden, die für die Biosynthese von Polyketiden verantwortlich sind.¹⁰ Umfangreiche Versuche hierzu wurden beispielsweise bei dem Gencluster des Antibiotikums Erythromycin A **16** durchgeführt.¹⁶ Auch durch vorstufengesteuerte Biosynthese, bei der andere Ausgangssubstrate gefüttert werden, können neue Strukturen erzeugt werden.^{17, 18} Eine Modifikation des Polyketids durch Veränderung der Tailoring-Enzyme (vgl. Abb. 3.8) bietet ebenfalls die Möglichkeit, neue Substanzen zu produzieren.¹⁹ Eine weitere Variante in diesem Zusammenhang bietet die Mutasynthese. Diese Methode wurde erfolgreich zur Erzeugung von Analoga der Polyketide Enterocin und Wailupemycin angewendet.²⁰ Hierzu wurde das Gen, das für die Biosynthese des Startermoleküls verantwortlich ist, inaktiviert und der resultierende Mutantenstamm mit diversen Aryl-Säuren gefüttert. Auf diese Weise konnte eine Vielzahl neuer Analoga kreiert werden.

Eine andere Variante, neue Wirkstoffkandidaten zu erhalten, besteht in deren Gewinnung aus nicht kultivierten Bakterien oder der Erschließung anderer Bakterienquellen. Weniger als 1% aller Bakterien sind mit gängigen Methoden kultivierbar, was die Entwicklung neuer methodischer Ansätze erfordert.¹⁵ Insbesondere in marinen multizellulären Organismen werden viele Substanzen wahrscheinlich von Endosymbionten hergestellt.²¹ Zu den seltenen Beispielen, bei denen die Kultivierung von Symbionten gelang, gehören die Polyketide Rhizonin und Rhizoxin. Diese Antitumorsubstanzen können aus dem Pilz *Rhizopus*

microsporus isoliert werden, die eigentliche Biosynthese wird aber durch Endosymbionten der Gattung *Burkholderia* durchgeführt.^{22, 23}

Alternativen zur Erzeugung neuer Wirkstoffkandidaten liegen auch in der chemischen Synthese von Substanzenanaloge bzw. Herstellung von Derivaten mittels kombinatorischer Chemie. Dabei können, basierend auf dem Pharmakophor oder der Grundstruktur, durch diverse Reaktionen Substanzbibliotheken aufgebaut werden. In semichemischen Methoden werden von Organismen produzierte Strukturen verwendet, um sie anschließend chemisch zu derivatisieren.²⁴ Ziel ist es, auf diesen Wegen, Wirkstoffe mit hoher biologischer Aktivität zu finden, die möglichst wenige Nebenwirkungen aufweisen.²⁵ Beispiele hierfür sind Roxithromycin, Clarithromycin oder Azithromycin, die sich vom Erythromycin ableiten. Gegenüber dem säureempfindlichen Erythromycin A **16** sind die semisynthetischen Verbindungen stabiler, besitzen gleichzeitig aber ähnliche pharmakologische Eigenschaften. Ein Vorteil ist ihre geringere notwendige Dosierung, da sie langsamer eliminiert werden.⁸ Eine weitere Möglichkeit besteht in der direkten chemischen Synthese von Wirkstoffanaloge, die leichter synthetisierbar sind als die natürlich vorkommende Substanz, aber eine mindestens vergleichbare Aktivität aufweisen. Dies konnte beispielsweise im Fall von Bryostatin 1 **3** erfolgreich umgesetzt werden, wobei verschiedene Analoga mit ähnlicher Wirkung synthetisiert werden konnten.²⁶ Totalsynthesen wurden bisher zwar von einigen Bryostatinen durchgeführt, sie sind aber durch ihre bis zu mehr als 70 notwendigen Schritte nicht ökonomisch.^{6, 27}

3.3 Biosynthese von Polyketiden

Die Polyketidbiosynthese erfolgt über einen enzymatisch katalysierten schrittweisen Aufbau langer Kohlenstoff-Ketten. Die Enzyme bzw. Multienzymkomplexe bestimmen dabei die Kettenlänge, die Oxidationsstufe, den Grad der Verzweigung, die Zyklisierung und die Stereochemie des produzierten Moleküls und werden als PKS bezeichnet.²⁸ PKS haben ihren Ursprung in Fettsäuresynthasen (FAS), denen sie mechanistisch und architektonisch sehr ähneln (vgl. Abb. 3.9).²⁹ Allerdings weisen Polyketide in der Regel eine sehr viel höhere Komplexität als Fettsäuren auf. Gemeinsam ist ihnen die Kondensation aktivierter niedermolekularer organischer Säuren wie zum Beispiel Essigsäure **5** oder Malonsäure **6** durch eine Ketosynthese

(KS). Die Aktivierung der Polyketid-Bausteine erfolgt dabei zu den entsprechenden Coenzym A-Estern (Thioester) wie beispielsweise Acetyl-CoA **7** oder Malonyl-CoA **8** (Abb. 3.2).²⁸

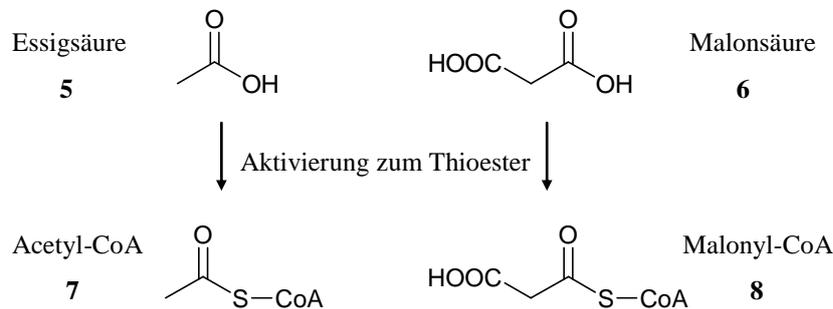


Abb. 3.2: Aktivierung zum Thioester (CoA-Ester).²⁸

Acetyl-CoA **7** kann dabei die Starter- und Malonyl-CoA **8** die Verlängerungseinheit bilden, wie dies bei der Fettsäurebiosynthese der Fall ist.³⁰ Bei PKS hingegen können neben Acetyl-CoA **7** und Malonyl-CoA **8** auch andere Acyl-CoA-Substrate als Starter- oder Elongationssubstanzen dienen.³¹ Einige Beispiele sind in Abb. 3.3 aufgeführt.

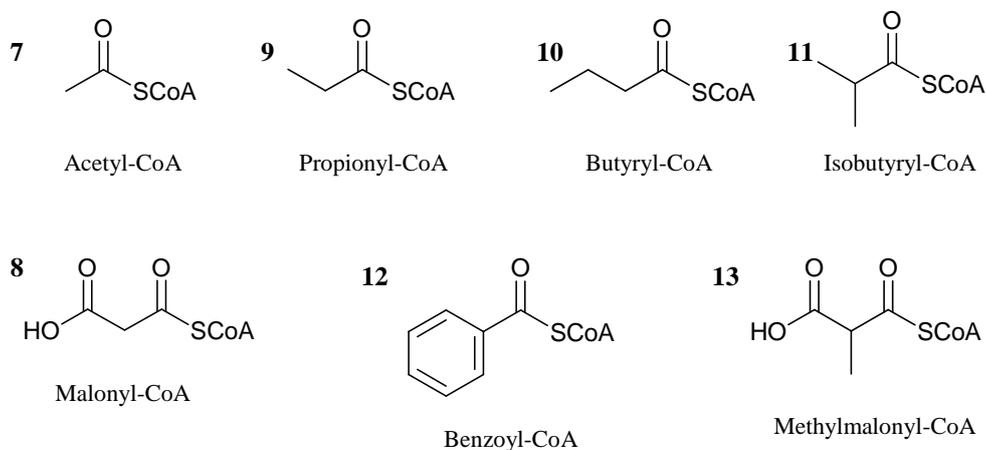


Abb. 3.3: Starter- und Elongationseinheiten der Polyketidbiosynthese.³²

Starter- und Verlängerungseinheit werden zunächst an Acylcarrierproteine (ACP) gebunden. Dieser Schritt wird durch eine Acyltransferase (AT) katalysiert (vgl. Abb. 3.5 a).²⁸ Vor der eigentlichen Polyketidproduktion ist aber eine Aktivierung der ACP notwendig, damit eine Verknüpfung mit dem Substrat stattfinden kann.³³ Dabei wird Coenzym A **14** über eine Phosphodiester-Bindung post-translational an die Seitenkette eines konservierten Serin-Restes des ACP kovalent gebunden. Die

Reaktion wird durch eine 5'-Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) katalysiert, die die inaktive *apo*-Form des ACP in seine aktive *holo*-Form umwandelt.³³ Schematisch ist diese Umsetzung in Abb. 3.4 dargestellt. Diese Aktivierung der ACP ist sowohl für FAS als auch für Typ-I- und Typ-II-PKS notwendig (s. Abschnitt 3.4).³⁴

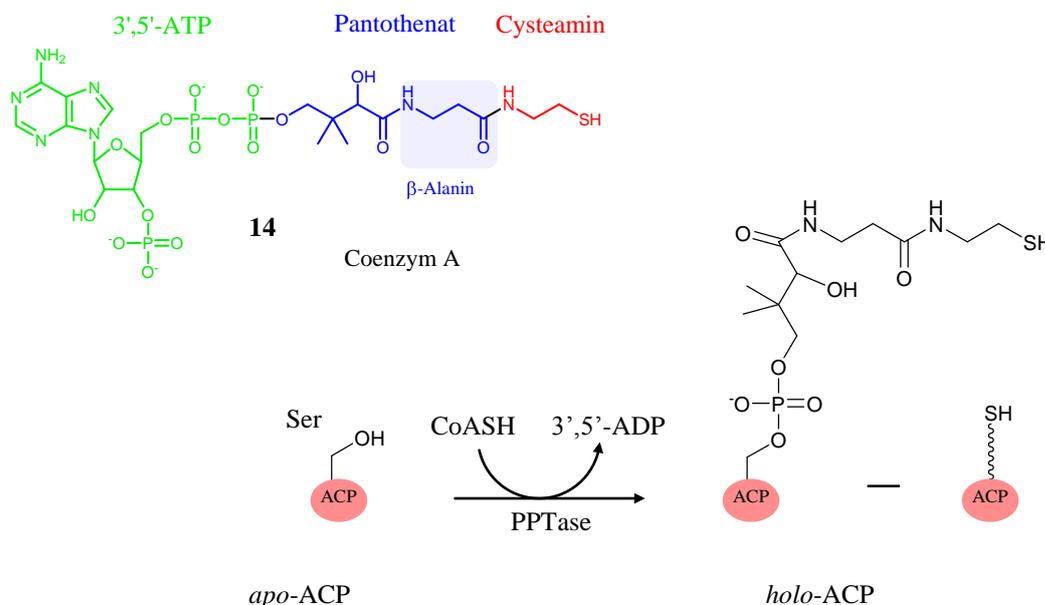


Abb. 3.4: Reaktion vom *apo*-ACP zu *holo*-ACP.

Dargestellt ist die Reaktion des *apo*-ACP zu seiner aktiven *holo*-Form, katalysiert durch eine PPTase. Der Phosphopantetheinarm wird häufig vereinfacht dargestellt durch eine Wellenlinie mit der aktiven Thiol-Gruppe am Ende. Die Struktur von Coenzym A **14** setzt sich aus den dargestellten Teilen zusammen. Coenzym A **14** wird häufig abgekürzt durch CoA oder CoASH.³³

Da das in der vorliegenden Arbeit betrachtete Pederin **23** zu modularen Typ-I-PKS zählt (vgl. Abschnitt 3.4) werden im Folgenden nur die entsprechenden Reaktionen dieses Typs näher beleuchtet. Bei der betrachteten Typ-I-PKS liegt eine modulare Organisation vor, wobei jedes Modul nicht-iterativ arbeitende Domänen enthält, so zum Beispiel ACP- oder KS-Domänen. Auf den Unterschied zu anderen PKS-Typen soll in Abschnitt 3.4 näher eingegangen werden.

Wie erwähnt wird das als Thioester aktivierte Starter- oder Elongationssubstrat (Abb. 3.2) auf das *holo*-ACP übertragen, was unter Katalyse der AT geschieht (Abb. 3.5 a). Im Folgenden wird das Startersubstrat an das aktive Zentrum der KS geknüpft, das Elongationsmolekül verbleibt am ACP (Abb. 3.5 b). In der folgenden Claisen-artigen Kondensation sorgt dann die KS unter Kohlenstoffdioxid-Abspaltung für eine

Verknüpfung der beiden Einheiten und somit für eine Kettenverlängerung (Abb. 3.5 b). In weiteren Zyklen wird die Kohlenstoffkette jeweils um eine C₂-Einheit verlängert, indem wiederum eine Kondensation der Kohlenstoffkette mit dem Elongationssubstrat unter CO₂-Abgabe erfolgt.²⁸ Die Übertragung der Acylkette erfolgt auf ein konserviertes Cystein der KS,³³ wobei der flexible Phosphopantetheinarm des ACP (Abb. 3.4) eine entscheidende Rolle bei der Weitergabe des Substrates bzw. des Intermediats spielt.³⁵ In Abb. 3.5 sind die durch die AT und KS katalysierten Reaktionen mit Acetyl- **7** und Malonyl-CoA **8** dargestellt, das Schema lässt sich aber auch auf andere CoA-Substrate übertragen. Während der Polyketidbiosynthese in Typ-I-PKS ist das jeweils entstandene Intermediat am ACP (entspricht ACP1 in Abb. 3.5) gebunden und wird durch die KS mit dem Elongationssubstrat des folgenden ACP (entspricht ACP2 in Abb. 3.5) verknüpft.

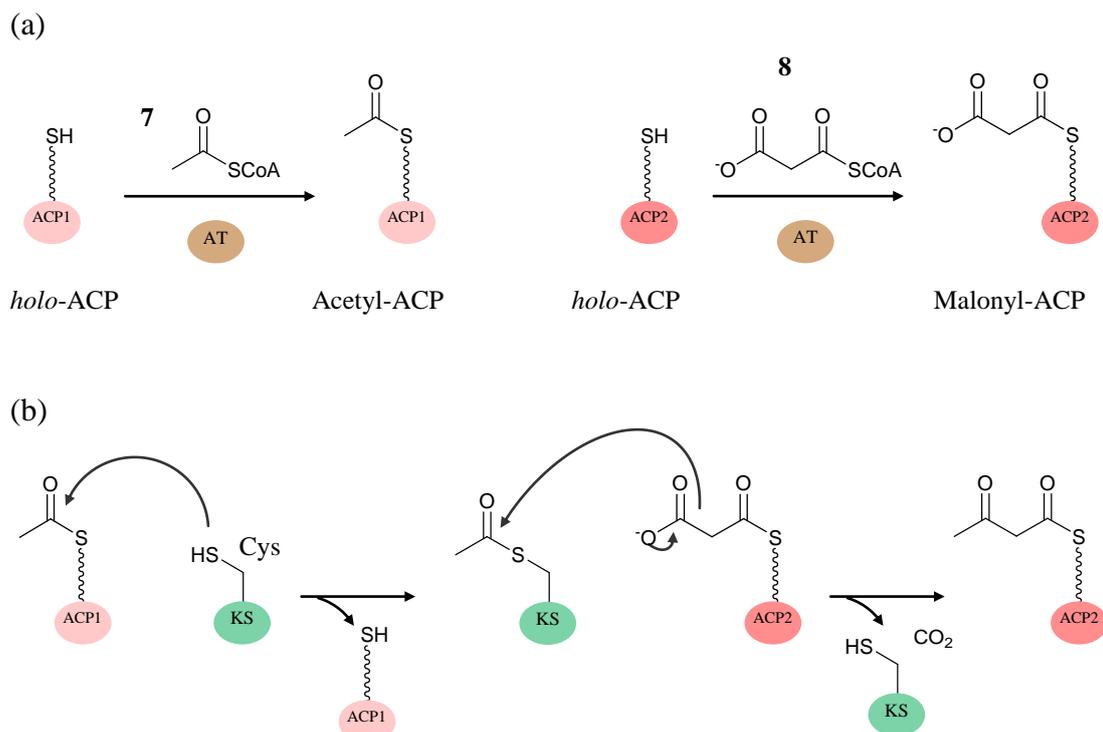


Abb. 3.5: Reaktionen während der Polyketidbiosynthese.

- (a) Übertragung des aktivierten CoA-Substrates auf das *holo*-ACP unter AT-Katalyse.
 (b) Übertragung der Startereinheit auf die KS und folgende decarboxylative Claisen-artige Kondensation mit dem am *holo*-ACP gebundenen Elongationssubstrat, katalysiert durch die KS.

Die Reaktionen sind mit Acetyl- **7** und Malonyl-CoA **8** dargestellt, das Schema lässt sich auch auf andere Substrate übertragen. Anstelle von Acetyl-CoA **7** befindet sich während der Polyketidbiosynthese das jeweilige Intermediat an ACP1. ACP1 und ACP2 stellen zwei ACP aus aufeinanderfolgenden Modulen dar (s. Abschnitt 3.4).³³

Handelt es sich bei der Verlängerungseinheit, wie dies zum Beispiel bei der Biosynthese von Erythromycin A **16** der Fall ist, um Methylmalonyl-CoA **13**, wird die lineare Kohlenstoffkette ebenfalls um zwei C-Atome verlängert, während die vorhandene Methylgruppe eine Verzweigung bildet. Komplexere Verlängerungseinheiten führen folglich zu komplexeren Seitenketten. Die Anzahl der Zyklen und die verwendeten Polyketid-Bausteine können bei PKS i. a. sehr verschieden sein und führen daher u. a. zur Diversität der synthetisierten Moleküle.²⁸

Einen weiteren Einfluss auf die Polyketidstruktur hat die vollständige oder unvollständige Reduktion der Ketogruppe, die aufgrund der jeweils erfolgten Kondensationsreaktion an der β -Position der wachsenden Kohlenstoffkette auftritt. Diese Ketogruppe spielte auch die entscheidende Rolle bei der unter 3.1 erläuterten Namensfindung der Substanzklasse der Polyketide. Sie kann durch eine Ketoreduktase (KR) zur Hydroxylgruppe reduziert werden, die in einer folgenden Wasserabspaltung durch eine Dehydratase (DH) zur Doppelbindung eliminiert werden kann. Bei einer vollständigen Sättigung erfolgt in einem dritten Schritt die Reduktion zur Einfachbindung durch eine Enoylreduktase (ER) (Abb. 3.6).²⁸ Bei Typ-I-PKS werden die einzelnen Enzyme als Domänen innerhalb des Moduls codiert und führen ihre charakteristischen Reaktionen während der Polyketidbiosynthese durch.

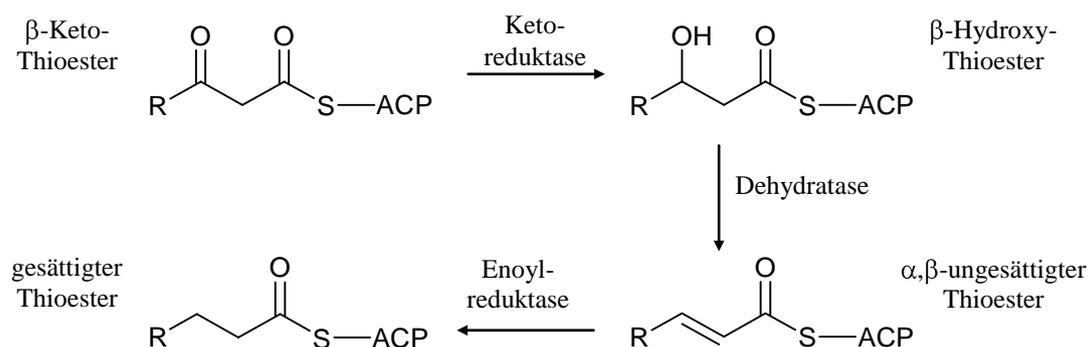


Abb. 3.6: Mögliche Reaktionsschritte an der alternierenden Ketogruppe während der Polyketidbiosynthese.²⁸

Bei FAS werden in jedem Zyklus immer alle drei Schritte durchlaufen, wodurch folglich eine gesättigte Fettsäure, wie beispielsweise Palmitinsäure **17**, produziert wird (vgl. Abb. 3.9 a).^{2, 29} Bei Polyketiden hingegen können diese Reaktionen der

Ketogruppe komplett, nur teilweise oder gar nicht pro Zyklus der Kettenverlängerung erfolgen. Dadurch kann das entstehende Molekül an manchen Stellen noch die Ketogruppe besitzen, während es an anderer Stelle eine Hydroxylgruppe oder eine Doppelbindung aufweist bzw. komplett reduziert ist (Abb. 3.7).²⁸ Bei Typ-I-PKS ist dies abhängig davon, welche einzelnen Domänen sich im jeweiligen Modul befinden.

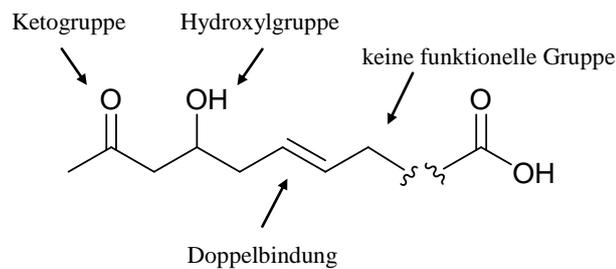


Abb. 3.7: Allgemeiner Aufbau eines Polyketids.

Die Darstellung des allgemeinen Aufbaus von Polyketiden bezieht sich auf die unterschiedlichen Funktionalitäten, ausgehend vom β -Ketothioester.²⁸

Durch die unterschiedlichen möglichen Funktionalitäten erhöht sich die Komplexität von Polyketiden enorm. Neben diesen verschiedenen funktionellen Gruppen kann das Molekül noch weitere Seitenketten tragen, bedingt durch komplexere Starter- und Verlängerungseinheiten (Abb. 3.3). Auch die Stereochemie des Moleküls trägt zur Diversität der Substanzklasse bei. Nach der Abspaltung von der PKS können sich aufgrund der vielen möglichen Funktionalitäten diverse Stereoisomere ausbilden.²⁸ Die Abtrennung des fertigen Polyketid-Intermediats vom Enzymkomplex wird durch eine Thioesterase (TE) katalysiert. Sie kann dabei auch eine Zyklisierung des Produkts durchführen.³⁶

Nach der Biosynthese des mehr oder weniger stark verzweigten Polyketidgrundkörpers durch die PKS können sogenannte Tailoring-Enzyme in Folgereaktionen das Molekül noch weiter modifizieren. Dabei können unterschiedlichste Struktureinheiten wie Zucker, Methyl- oder Hydroxylgruppen in das Polyketid eingeführt werden. Dadurch wird die Diversität weiter erhöht und führt insgesamt zu einer enormen Strukturvielfalt.²⁸ Ein Beispiel hierfür ist die Modifizierung von 6-Deoxyerythronolid B **15**: durch Oxidation und Glykosylierung des durch *Saccharopolyspora erythraea* zunächst synthetisierten Polyketid-

intermediats entsteht das Antibiotikum Erythromycin A **16**. Diese Derivatisierungen werden in Tailoring-Reaktionen durch Cytochrom P450-Enzyme und Glykosyltransferasen katalysiert (Abb. 3.8).³⁷ Erythromycin A **16** wirkt insbesondere auf Gram-positive Mikroorganismen bakteriostatisch, indem es die Proteinbiosynthese hemmt. Die Translation der DNA wird verhindert, indem das Ribosom wahrscheinlich nicht an der mRNA weiterrücken kann. Verantwortlich für diese Wirkung sind die post-PKS angefügten Desoxyzucker.⁸

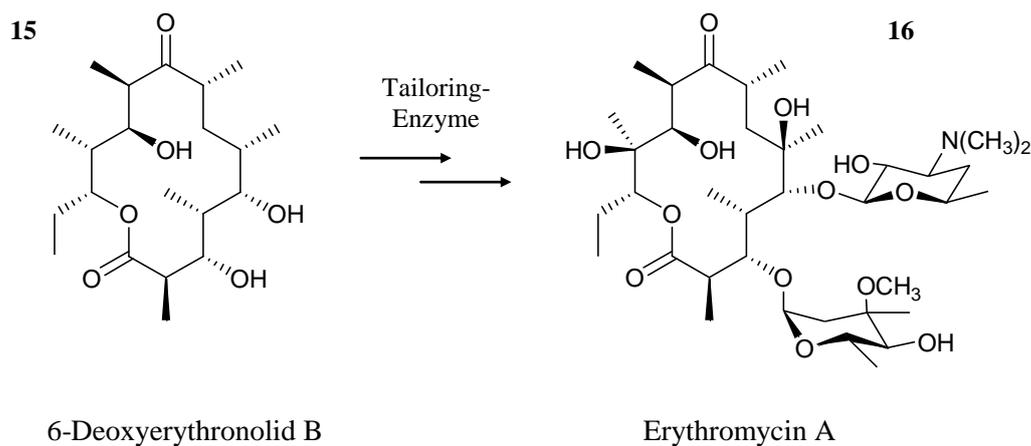


Abb. 3.8: Reaktion von 6-Deoxyerythronolid B zu Erythromycin A.

6-Deoxyerythronolid B **15** ist das Produkt der PKS des Erythromycin A **16**-Genclusters und wird durch weitere Enzyme (Tailoring-Enzyme), die ebenfalls auf dem Gencluster codiert sind, umgesetzt zu Erythromycin A **16**.³⁷

3.4 Unterteilung der PKS

PKS können in 3 Typen unterteilt werden: Typ I, II und III.¹ Dabei besteht jeweils die Möglichkeit einer iterativen oder modularen Reaktionsfolge. Iterative PKS bestehen aus Enzymen, die für jeden Elongationsschritt iterativ genutzt werden. Modulare PKS sind multifunktionelle Enzyme, die in Module organisiert sind, die wiederum nicht-iterativ arbeitende Domänen beinhalten. Jedes Modul ist dabei für einen Zyklus der Polyketidverlängerung verantwortlich und gibt das Zwischenprodukt an das nächste Modul weiter. Bei Typ-I-PKS existieren sowohl iterativ als auch modular arbeitende PKS.¹ Im Falle von Typ-II-PKS hingegen wurden bisher nur iterative PKS beschrieben.⁹ Es existieren aber auch Typ-II-PKS,

die teilweise modular aufgebaut sind, ein Beispiel ist die PKS für die Biosynthese von R1128 **18** (Abb. 3.9 b).³⁸ Bei Typ-III-PKS besteht eine iterative Reaktionsfolge.¹

Eine modulare Typ-I-PKS liegt bei der Erythromycin A **16** -Biosynthese vor, die in Abb. 3.9 c veranschaulicht ist.¹ Das eigentlich durch die PKS gebildete 6-Deoxyerythronolid B **15** wird in post-PKS-Modifikationen dann zu Erythromycin A **16** umgesetzt (vgl. Abb. 3.8).³⁷ Auch das in dieser Arbeit betrachtete Pederin **23** und die bereits erwähnten Polyketide Rapamycin **2** und Bryostatin 1 **3** werden von modularen Typ-I-PKS produziert.^{4, 6, 39} Bei diesem PKS-Typ enthält normalerweise jedes Modul mindestens eine KS-, eine ACP- und eine AT-Domäne. Des Weiteren können sich in den Modulen noch Domänen für die KR, DH oder ER befinden (vgl. Abb. 3.6). Für direkte Methylierungen der Intermediate während vieler Polyketidbiosynthesen sind im Modul vorhandene Methyltransferase (MT)-Domänen verantwortlich. Die Anordnung der PKS-Module bestimmt dabei die Reaktionsabfolge und die variierenden Domänen innerhalb des Moduls führen zur Diversität im Polyketid.¹ Die Domänenanordnung spiegelt folglich oft die Struktur des synthetisierten Polyketids wider. Durch diese sogenannte Kolinearitätsregel lässt sich anhand der Gensequenz des Clusters die Grundstruktur des Naturstoffes vorhersagen.⁴⁰ Bei der Analyse des Genclusters von Pederin **23** zeigt sich dieses Phänomen sehr deutlich bei den beiden PKS *pedI* und *pedF* (Abb. 3.16 und 3.17): die Abfolge von katalytischen Domänen entspricht genau dem Grundkörper von Pederin **23**^{39, 41} (vgl. Abschnitt 3.8.2). Diese Kolinearitätsregel kann auch dazu dienen, neue Polyketide durch genetische Modifikation der Domänenarchitektur zu kreieren.⁴⁰

Iterative Typ-I-PKS treten in Pilzen auf, in denen sie beispielsweise für die Bildung von aromatischen Polyketiden wie 6-Methylsalicylsäure (aus *Penicillium patulum*) verantwortlich sind. Diese PKS bestehen aus einem einzigen Modul, das wiederum in Domänen organisiert ist. Das Modul wird dann für jeden Zyklus iterativ verwendet.^{1, 2}

Iterative Typ-II-PKS bestehen aus Enzymen, die für jeden Zyklus immer wieder genutzt werden. Diese sind dabei jeweils als separates Gen codiert.¹ Bakterielle aromatische Polyketide wie das Griseorhodin A oder R1128 **18** werden durch diesen PKS-Typ synthetisiert.⁹ Die von *Streptomyces* sp. R1128 hergestellte Substanz

R1128 **18** ist ein Antagonist des Östrogen-Rezeptors. Solche Agentien dienen der nichthormonalen Behandlung von Brustkrebs. Bei der Substanzklasse R1128 **18** handelt es sich um viel versprechende Wirkstoffkandidaten, da sie gegenüber den konventionell eingesetzten Tamoxifen zwar eine etwas geringere Aktivität, dafür eine sehr viel höhere Selektivität und geringere Toxizität aufweisen.³⁸ Auch die bereits erwähnten Substanzen Doxorubicin **4** und Tetracyclin werden durch Typ-II-PKS hergestellt.⁹

Chalcon-Synthase-ähnliche PKS bzw. Typ-III-PKS bestehen aus homodimeren, iterativ agierenden Enzymen. Aromatische Polyketide wie das Flavolin werden auf diese Weise vom Organismus hergestellt.¹

In Abb. 3.9 sind exemplarisch neben den erwähnten Typ-I- und -II-PKS zum Vergleich ebenfalls FAS dargestellt (Abb. 3.9 a). Bei diesen wird beispielsweise zwischen bakteriellen FAS und FAS aus Vertebraten unterschieden.²⁹ Bakterielle FAS sind dabei aus individuellen Enzymen aufgebaut, während FAS aus Vertebraten aus einem multifunktionellen Protein bestehen, das alle Funktionalitäten enthält.⁴²

Ein Unterschied zwischen den verschiedenen PKS-Typen liegt zum Beispiel auch in Bezug auf die ACP. Bei Typ-I- und -II-PKS sind ACP vorhanden, die die Acyl-CoA-Substrate binden und die wachsenden Polyketidintermediate weiterreichen. Typ-III-PKS hingegen sind ACP-unabhängig. Die Kondensation mit dem Substrat erfolgt hier direkt ohne vorherige kovalente Bindung des Acyl-CoA-Substrats. Die Kondensation unter CO₂-Abspaltung erfolgt aber bei allen drei Typen jeweils katalysiert durch die KS.¹

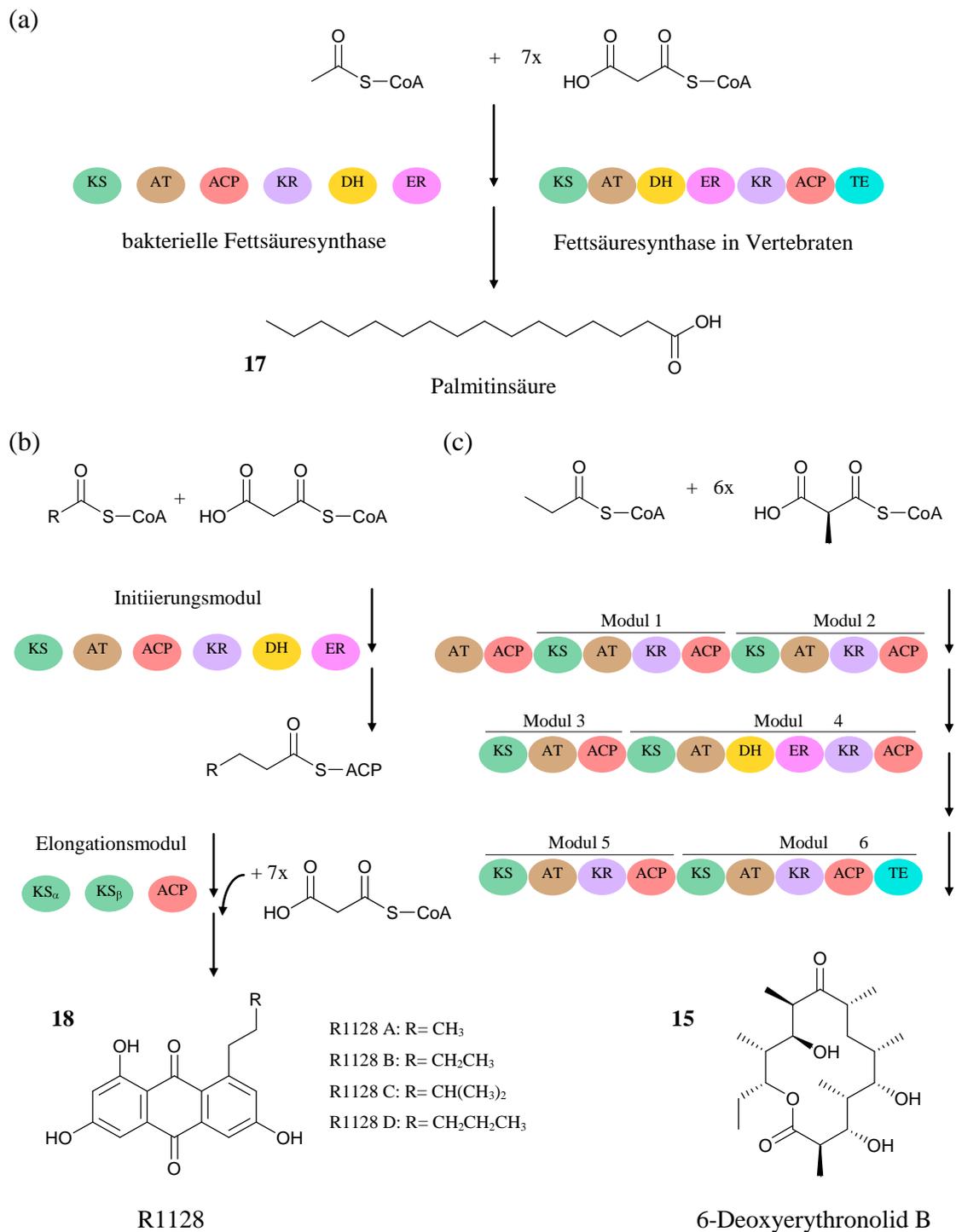


Abb. 3.9: Aufbau von Fettsäure- und Polyketidsynthasen.

- (a) Aufbau von Fettsäuresynthasen (FAS) in Bakterien und Vertebraten²⁹
- (b) Aufbau einer iterativen Typ II-PKS am Beispiel der PKS zur Biosynthese von R1128 **18**, das vier verschiedene Derivate A-D hat.^{9, 29, 38}
- (c) Aufbau einer modularen Typ I-PKS am Beispiel der PKS zur Herstellung von 6-Deoxyerythronolid B **15**, aus dem durch weitere Modifikationen Erythromycin A **16** gebildet wird (vgl. Abb. 3.8).²⁹

3.5 Varianten modularer Typ-I-PKS

Wie unter 3.4 erwähnt enthalten modulare Typ-I-PKS normalerweise mindestens eine KS-, eine ACP- und eine AT-Domäne pro Modul. Interessanterweise fehlen aber in allen Modulen des *ped*-Genclusters AT-Domänen, die für die Auswahl der entsprechenden Acyl-CoA-Einheit verantwortlich sind und es auf das *holo*-ACP übertragen (Abb. 3.5 a). Jedoch sind zwei eigenständige AT-Gene im Cluster enthalten (Abb. 3.16).¹¹ Im Leinamycin-Gencluster existiert eine separate AT. Es wurde gezeigt, dass sie für die Beladung der ACP in allen vorhandenen 6 PKS-Modulen zuständig ist.⁴³ Für Gencluster dieser Art wurde der Begriff *trans*-AT-PKS geprägt.³⁹ Die AT dieser Cluster liegen nicht als Domäne jeweils innerhalb eines Moduls vor, sondern führen als separate Enzyme die ACP-Acylierung *in trans* durch. Weitere *trans*-AT-PKS sind beispielsweise der *pksX*-Gencluster aus *Bacillus subtilis* zur Bacillaen-Biosynthese⁴⁴⁻⁴⁶ oder das *bry*-Cluster aus *Bugula neritina* zur Biosynthese von Bryostatin **3**.⁶

Modulare Typ-I-PKS, die in jedem Modul eine AT-Domäne enthalten, heißen dementsprechend *cis*-AT-PKS.⁴⁷ Ein Beispiel hierfür ist der Erythromycin A **16** -Gencluster (Abb. 3.9 c). Wie bereits beschrieben, führt die modulare PKS zur Bildung von 6-Deoxyerythronolid B **15**, aus dem Erythromycin A **16** hervorgeht (vgl. Abb. 3.8).

Zur Verdeutlichung wurde der Unterschied von *trans*- und *cis*-AT-PKS schematisch in Abb. 3.10 dargestellt.

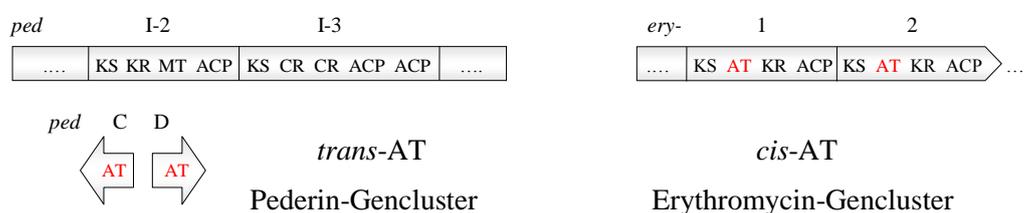


Abb. 3.10: *trans*- und *cis*-AT-PKS.

Im linken Teil ist ein Ausschnitt aus dem Pederin **23**-, im rechten Teil aus dem Erythromycin A **16** -Gencluster dargestellt. Die AT-Domänen sind jeweils rot hervorgehoben.^{37, 47}

Phylogenetische Untersuchungen zeigten, dass sich *trans*- und *cis*-AT-PKS zwei unterschiedlichen Abstammungslinien zuordnen lassen (Abb. 3.11).⁴⁷ In dem

Stammbaum flossen dabei Sequenzen der KS verschiedener PKS-Gencluster ein, da diese hochkonservierte Regionen enthalten. Während in vorherigen Untersuchungen der *cis*-AT-PKS-Cluster eine Korrelation zur Phylogenie der jeweiligen Wirtsorganismen bestand,⁴⁸ korreliert der Stammbaum der *trans*-AT Enzyme nicht mit dem der Bakterienspezies.

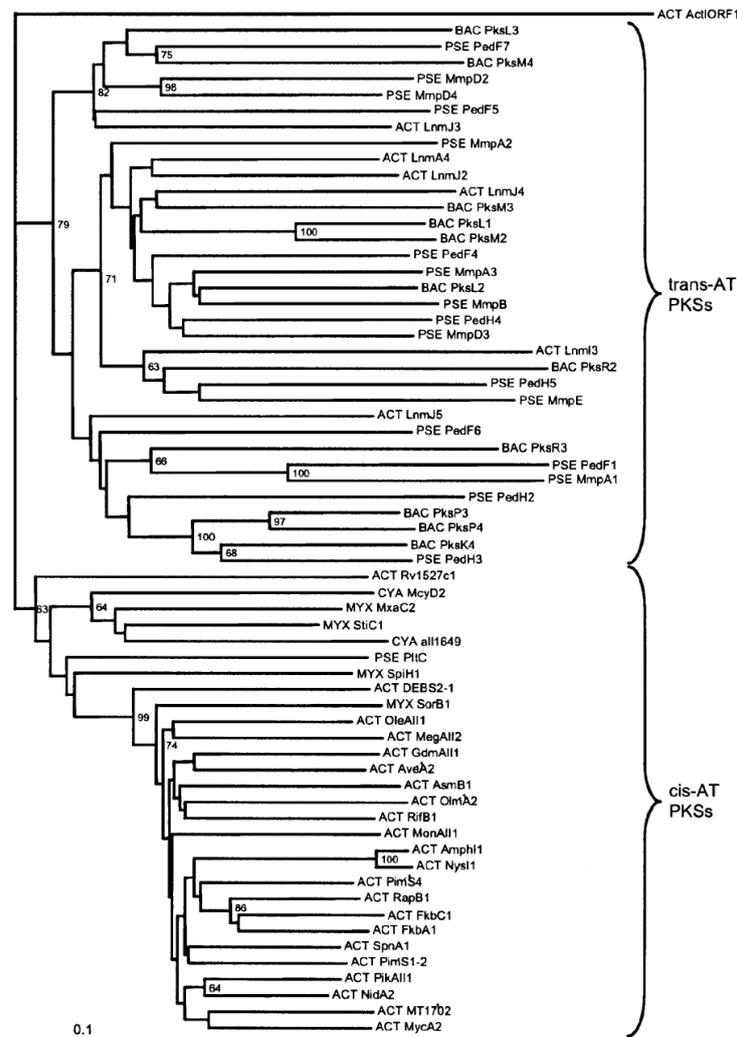


Abb. 3.11: Phylogenetische Analyse von KS-Domänen bakterieller Typ-I-PKS.⁴⁷

Die verwendeten KS-Sequenzen zur Erstellung des phylogenetischen Baumes stammen von folgenden Bakterien: ACT, Actinobakterien; BAC, Bacilli; PSE, Pseudomonaden; CYA, Cyanobakterien; MYX, Myxokokken. Die hinter der Bakterienabkürzung jeweils angegebene Information spezifiziert das Modul, aus dem die KS-Sequenz stammt. Als Außengruppe diente KS ActI ORF1 aus dem Typ-II-PKS Actinorhodin-Gencluster.⁴⁷

Eine phylogenetische Analyse der durch PCR amplifizierte Genfragmente der KS lassen damit eine Zuordnung zum PKS-Typ *trans*- oder *cis*-AT zu. Die Notwendigkeit, größere Genregionen zu klonieren, die den AT-Bereich abdecken, entfällt damit.⁴⁷ Diese Methode konnte schon erfolgreich für die Identifizierung von *trans*-AT-Systemen aus metagenomischer DNA angewendet werden. Zum Beispiel

wurden so Teile des putativen Genclusters für Onnamid A **26** aus dem Schwamm *Theonella swinhoei* gefunden.²¹ Schwämme können bis zu 40% ihrer gesamten Biomasse aus Bakterien bestehen,⁴⁹ wobei es sich dabei um bis zu mehrere hundert verschiedene Arten handeln kann.⁵⁰ Daher ist dies eine relativ einfache Methode, in metagenomischer DNA gezielt nach spezifischen Genclustern zu suchen, die für mögliche Arzneimittelkandidaten codieren.⁴⁷

Eine weitere Herausforderung bei *trans*-AT-PKS-Genclustern ist die Tatsache, dass die Anwendung der Kolinearitätsregel nicht mit absoluter Sicherheit zur Bestätigung des putativen Genclusters für die Naturstoffproduktion führt. In *trans*-AT-PKS befinden sich in der Regel zahlreiche Domänen, die keine offensichtliche Entsprechung in der Polyketidstruktur haben. Dieses von *cis*-AT-PKS abweichende Merkmal ist sicherlich auch eine Folge der völlig eigenständigen evolutiven Entwicklung.⁴⁷ Neuste Erkenntnisse zeigen, dass bei *trans*-AT-Systemen die KS-Domänen über horizontalen Gentransfer, basierend auf ihrer Substratspezifität, zusammengesetzt wurden,⁵¹ wogegen bei *cis*-AT-PKS Modulduplikationen innerhalb eines Genclusters zur Multimodularität führten.⁵² Bei der phylogenetische Analyse von KS-Sequenzen aus *trans*-AT-Clustern stellte sich heraus, dass sich die KS innerhalb des Stammbaumes wiederum in Gruppen mit gleicher Substratspezifität für das von ihnen prozessierte Polyketidintermediat einordnen lassen. Dieses Wissen wurde beispielsweise zur Vorhersage von Strukturen aus einem *trans*-AT-Cluster von *Burkholderia thailandensis* genutzt.⁵¹ Anhand der KS-Sequenz konnte gezielt nach neuen, durch den Cluster codierte, Polyketiden gesucht werden. Dies führte zur Identifizierung der Isomere Thailandamid A und B.

3.6 Nichtribosomale Peptidsynthetasen

Neben PKS existieren in Pilzen und Bakterien auch große Multienzymkomplexe zur Bildung von Peptiden mit teilweise hoher biologischer Aktivität. Diese Nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) sind in der Lage, durch modular aufgebaute Enzyme Peptide herzustellen, die ungewöhnliche Strukturen besitzen können.³⁵ Gegenüber den Proteinen, die durch Ribosomen erzeugt werden, sind nichtribosomale Peptide nicht nur aus den gewöhnlichen 20 proteinogenen Aminosäuren aufgebaut, sondern können hunderte verschiedener Strukturen

enthalten. Des Weiteren können heterozyklische Elemente, D-Aminosäuren und glykosylierte oder *N*-methylierte Reste auftreten.⁵³ Beispiele für nichtribosomale Peptide sind Peptidantibiotika wie das Vancomycin **19** (Abb. 3.12), das von Streptomyceten produziert wird.⁵⁴ Ein weiteres Beispiel ist das von *Streptomyces griseoflavus* W384 synthetisierte Hormaomycin **20** (Abb. 3.12). Das Peptidlacton enthält eine Reihe ungewöhnlicher Aminosäuren,⁵⁵ deren Bildung wahrscheinlich aus proteinogenen Aminosäuren durch Enzyme erfolgt, die ebenfalls auf dem Hormaomycin **20**-Gencluster codiert sind (unveröffentlicht). Die Substanz kann die Sporulation und die Antibiotikaproduktion in anderen Actinomyceten anregen und wirkt selektiv gegen Gram-positive Bakterien.⁵⁵

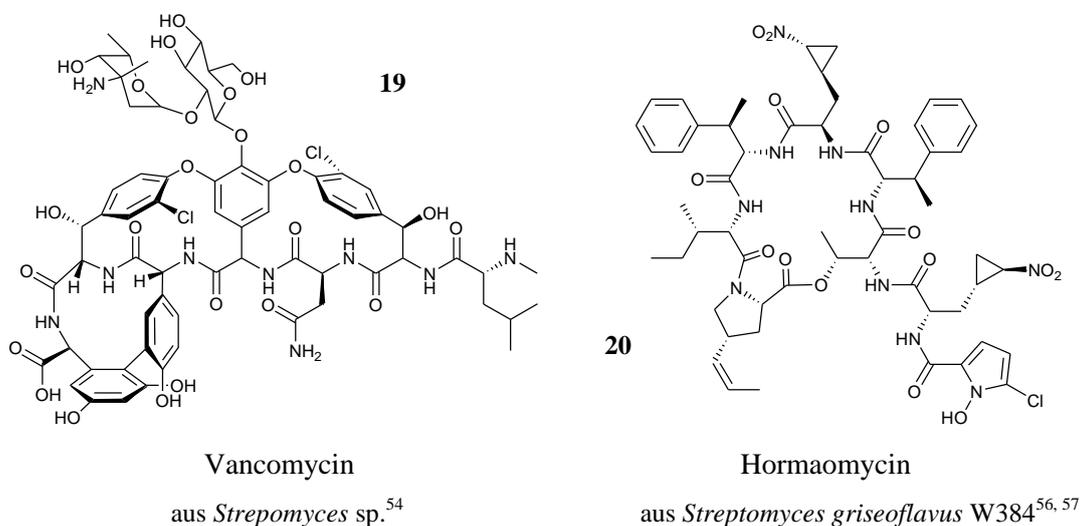


Abb. 3.12: Strukturen und Herkunft nichtribosomal produzierter Peptide.

NRPS sind beteiligt an der Produktion einiger der wichtigsten antibakteriellen, antifungalen, antiviralen, immunsuppressiven und antitumoralen Medikamente.⁵⁸ Zu den bekanntesten nichtribosomal hergestellten Substanzen zählen die β -Lactame, zu den die Penicilline und Cephalosporine gehören. Auch wenn viele Bakterien mittlerweile eine Resistenz gegen β -Lactam-Antibiotika entwickelt haben, existieren noch immer Organismen, die sensitiv auf diese Moleküle reagieren. Ihre Zellwandbiosynthese wird inaktiviert, was letztendlich zu Zellyse führt. Daher besteht noch immer eine klinische Relevanz für diese Antibiotika. Auch Daptomycin, Cyclosporin A, Glykolipide wie Vancomycin **19** oder Teichoplanin, Chinoxaline oder Bleomycine werden durch NRPS synthetisiert und haben verschiedene Einsatzgebiete in der Medizin.⁵⁸

Dem Initiierungsmodul, das die erste Aminosäure einbaut, fehlt die C-Domäne, während alle Elongationsmodule mindestens A-, PCP- und C-Domäne aufweisen. Zusätzlich zu diesen essentiellen Komponenten, existieren in NRPS noch weitere Domänen, so zum Beispiel die Epimerisierungs-Domäne (E-Domäne), die die Umwandlung von L- in D-Aminosäuren katalysiert. N-Methylierungs-, Oxidations- und Reduktionsdomänen können ebenfalls enthalten sein und führen zu weiterer Diversität der nichtribosomalen Peptide. Für weitergehende Details wird auf entsprechende Literatur verwiesen.^{35, 53, 61}

3.7 NRPS/PKS-Hybride

Beim Vergleich der Reaktionen in NRPS (Abb. 3.13) und PKS (Abb. 3.5) können einige Ähnlichkeiten festgestellt werden. So ist bei beiden eine Aktivierung des Carrierproteins (PCP bei NRPS, ACP bei PKS) notwendig. Dies geschieht durch eine von der PPTase katalysierten Reaktion mit Coenzym A **14** unter Abspaltung von 3',5'-Adenosindiphosphat (vgl. Abb. 3.4). Das auf das Carrierprotein übertragene Substrat ist bei den PKS ein aktiviertes Acyl-CoA (zum Beispiel Malonyl-CoA **8**) während es sich bei den NRPS um ein aktiviertes Aminoacyladenylat handelt (Abb. 3.13 a). Für die Auswahl des Substrates ist die AT (PKS) bzw. die A-Domäne (NRPS) verantwortlich. In beiden Multienzymkomplexen wird eine Kondensationsreaktion katalysiert, zum einen durch die KS (PKS), zum anderen durch die C-Domäne (NRPS) und führt zur Ausbildung von C-C-Bindungen (PKS) oder Peptidbindungen (NRPS).⁶² Es besteht folglich eine enge funktionelle Verwandtschaft zwischen Fettsäuresynthasen, Polyketidsynthasen und Nichtribosomalen Peptidsynthetasen.³⁵

Neben reinen NRPS und PKS existieren auch gemischte Gencluster, die für sogenannte NRPS/PKS-Hybride codieren. Dabei werden in die Grundstruktur Aminosäuren von NRPS und kurzkettige Carbonsäuren von PKS-Modulen eingebaut.⁶² Beispiele hierfür sind das in der vorliegenden Arbeit betrachtete Pederin **23**³⁹, das bereits erwähnte Epothilon D **1**³ sowie Jamaicamid A **21**⁶³ und Myxothiazol A **22**⁶² (Abb. 3.14). Jamaicamide sind Neurotoxine, die großes experimentelles Interesse besitzen. Wie das aus Dinoflagellaten stammende Saxitoxin hemmen sie spezifisch den Natrium-Einstrom während der fortgeleiteten

Erregung in Nerven und Muskelgeweben.^{8, 63} Myxothiazole sind starke Elektronentransportinhibitoren in der eukaryotischen Atmungskette.⁶²

Die Kombination von PKS und NRPS erweitert die Möglichkeiten der kombinatorischen Biosynthese sowohl in der Natur als auch im Labor enorm und kann zur Gewinnung von neuen aktiveren Strukturen durch Umordnung von Modulen führen.³⁵

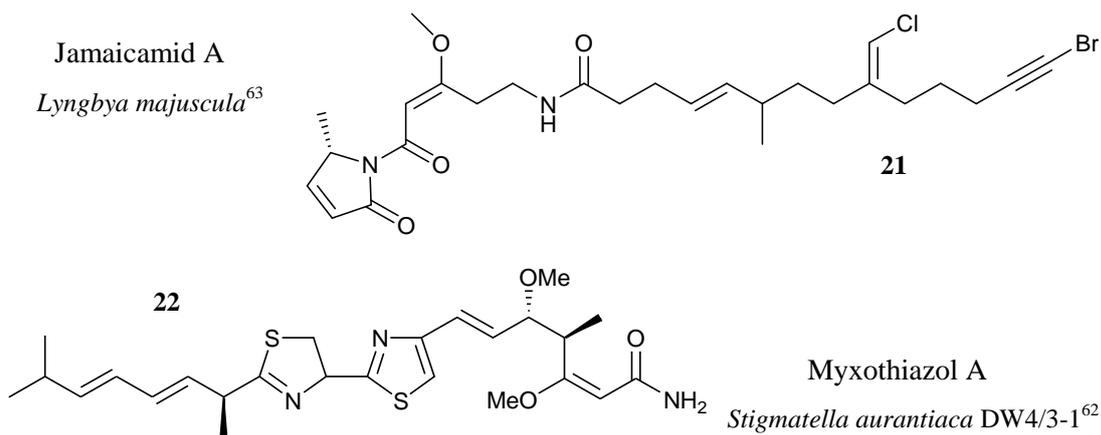


Abb. 3.14: Strukturen von NRPS/PKS-Hybrid-produzierten Substanzen.

Die Enzyme für die Biosynthese von Jamaicamid A **21** und Myxothiazol A **22** werden durch NRPS/PKS-Hybridgencluster codiert. Unter dem Namen der Substanz ist jeweils der produzierende Organismus angegeben.

3.8 Substanzen der Pederinfamilie

Bei Pederin **23**, dem Namensgeber der Pederinfamilie, handelt es sich um eine Antitumorsubstanz, die sich schon in frühen Studien als Inhibitor der Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen herausstellte.^{64, 65} Pederin **23** kann in der Hämolymphe von fast allen Arten der Käfergattungen *Paederus* und *Paederidus* gefunden werden⁶⁶ (Abb. 3.15). Zur Pederinfamilie zählen aber auch aus Schwämmen isolierte Verbindungen, die v. a. während pharmakologischer Screenings von marinen Naturstoffen entdeckt wurden.⁶⁷ Eine Auswahl ist in Abb. 3.15 dargestellt. Die zur Pederinfamilie zählenden Substanzen weisen eine sehr hohe Antitumoraktivität auf. So kann Pederin **23**, das IC₅₀-Werte im subnanomolaren Bereich gegen einige Tumormodelle aufzeigt, die Lebensdauer von Mäusen mit soliden Tumoren erhöhen.⁶⁷ Außerdem kann es den Zelltod verschiedener Zelllinien innerhalb kurzer Zeit durch Inhibierung der DNA- und Proteinbiosynthese

verursachen.⁶⁴ Psymberin **24** beispielsweise kann hochselektiv gegen eine Vielzahl verschiedener Tumorarten wirken.⁶⁸ Onnamid A **26** und Theopederin B konnten als wirksame Antitumorsubstanzen im nanomolaren Anwendungsbereich identifiziert werden und weisen u. a. cytotoxische Aktivität gegen verschiedene Zelllinien auf. Des Weiteren konnte ihnen die Induzierung der Apoptose in HeLa-Zellen innerhalb von 24 h nachgewiesen werden.⁶⁹ Auch Mycalamid A **25** und B **32** können schon im unteren nanomolaren Bereich eine starke Inhibierung der Replikation von humanen Tumorzellen aufweisen und besitzen u. a. eine hohe Aktivität gegen P388-Leukämie-Zellen.⁷⁰

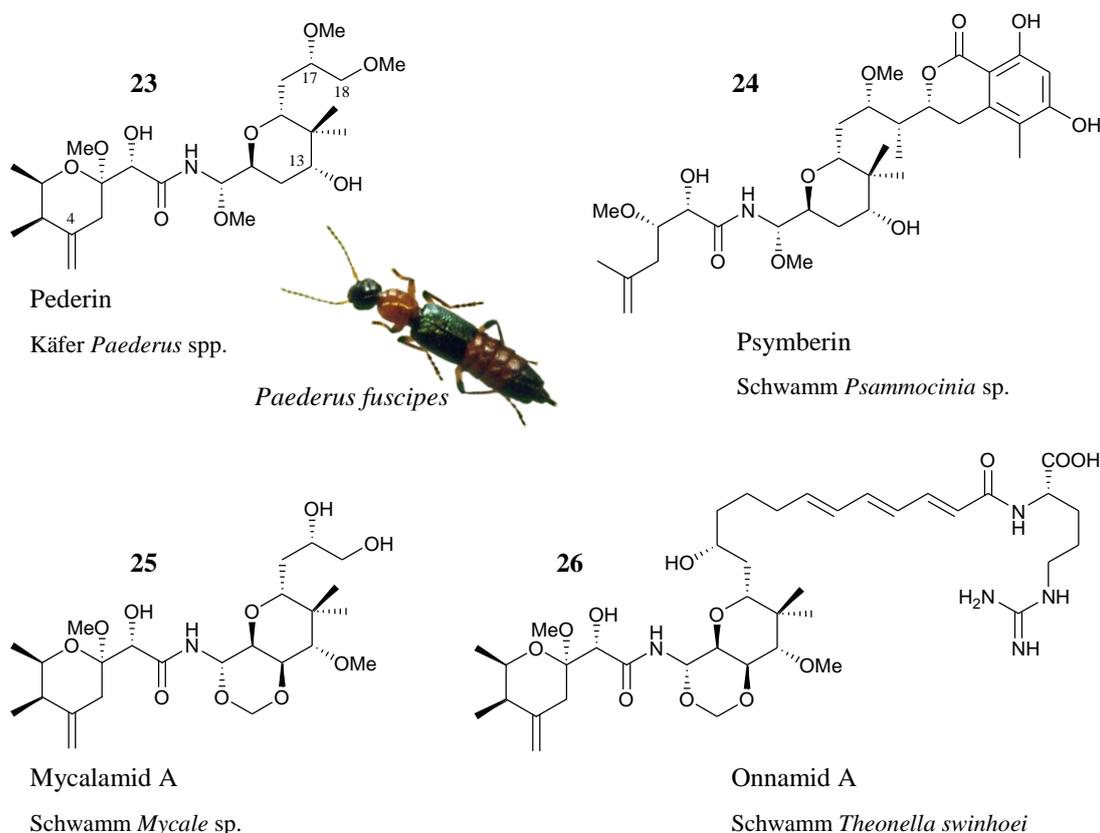


Abb. 3.15: Einige Mitglieder der Pederinfamilie und ihre Herkunft.

Dargestellt sind die Strukturen einiger Mitglieder der Pederinfamilie^{21, 39, 71}. Unter dem Namen ist die Herkunft der Substanz angegeben. Psymberin **24** wurde gleichzeitig auch als Irciniastatin A aus dem Schwamm *Ircinia ramosa* beschrieben.^{11, 72}

Paederus fuscipes als ein Vertreter der Käfergattung *Paederus* ist ebenfalls dargestellt (Foto: Thomas Hochmuth).

Durch das hohe therapeutische Potential dieser Substanzen ist die Erforschung der entsprechenden Biosynthesewege von großem Interesse.³⁹ Dies gestaltet sich für Substanzen aus Invertebraten durch die hohe genetische Vielfalt in den Schwämmen i. a. aber sehr schwierig, da diese oft eine große Anzahl verschiedener Bakterienarten

beherbergen.^{49, 50} Schwämme selbst sind zudem nicht leicht kultivierbar und die chemische Synthese der Verbindungen ist in der Regel nicht ökonomisch. Die tatsächlichen Produzenten vieler solcher Arzneimittelkandidaten sind wahrscheinlich Bakterien. Da eine Kultivierung dieser Bakterien bisher aber nicht erfolgreich war, liegt in der Entdeckung der Biosynthesegencluster und ihrer heterologen Expression viel Potential zur nachhaltigen Produktion der Substanzen.^{21, 39}

3.8.1 Pederin

Pederin **23** ist im Gegensatz zu den anderen Vertretern der Pederinfamilie nicht in Schwämmen, sondern wie bereits erwähnt in terrestrischen Käfern der Gattung *Paederus* (Ordnung: Coleoptera - Käfer, Familie: Staphylinidae - Kurzflügler) zu finden. Die Käfer nutzen die Substanz zur chemischen Verteidigung gegen (Wolf-) Spinnen. Die Käferweibchen geben das Toxin an ihre Eier weiter und Pederin **23** - enthaltende Larven überleben einen Spinnenangriff, während pederinlose Larven oft getötet und gefressen werden.⁷³ Interessanterweise enthalten etwa 85% der Weibchen Pederin **23** in großer Menge in ihrer Hämolymphe (bezeichnet als (+)-Weibchen), während die restlichen 15% „(-)-Weibchen“ und alle Männchen nur geringe Konzentrationen aufweisen. Nur die (+)-Weibchen sind in der Lage, ihren gesamten Nachwuchs ausreichend mit Pederin **23** zu versorgen. Larven hingegen können das Toxin nicht selbst produzieren, haben aber eine sehr effiziente Möglichkeit der Lagerung. Diese ursprünglich weitergegebene geringe Pederinmenge ändert sich im Erwachsenenalter von Männchen und (-)-Weibchen nicht, während sich in (+)-Weibchen die Menge erhöht. (-)-Weibchen und Männchen sind folglich auch nicht in der Lage, das Toxin selbst zu produzieren. Werden jedoch (-)-Weibchen mit Eiern von (+)-Weibchen versehen, erzeugen auch sie (+)-Nachwuchs.⁶⁶

Neben seinen hervorragenden Eigenschaften im Bereich der Antitumorwirkung verursacht Pederin **23** aber auch eine Kontakt-Dermatitis, wenn beispielsweise pederinhaltige *Paederus*-Käfer auf der Haut zerdrückt werden. Dabei können sich Läsionen, Vesikel und Pusteln bilden.⁷⁴ Diese Hautirritation zeigt sich vornehmlich in Gebieten mit heißem tropischem Klima, wie in Indien oder der Türkei, wo sich auch das Hauptverbreitungsgebiet der Käfer befindet.^{74, 75} Mögliche schlagartig ansteigende Verbreitung der *Paederus*-Käfer und folgendes vermehrtes Auftreten der

Dermatitis aufgrund von Pederin **23**, werden auch als Ursache von drei der zehn biblischen Plagen angesehen.⁷⁶

3.8.2 Biosynthese von Pederin

Die Tatsache, dass fast alle Mitglieder der Pederinfamilie marinen Ursprungs sind, Pederin **23** aber in terrestrischen Käfern gefunden wird, legt die bereits erwähnte bakterielle Produktion der Substanzen nahe. (-)-Käferweibchen erzeugen auch (-)-Nachwuchs, außer sie werden mit (+)-Eiern versehen (s. 3.8.1). Werden die (+)-Eier jedoch vorher mit Antibiotika versetzt, wird dies verhindert.⁷⁷ Bei Fütterung von (+)-Eiern an (-)-Larven von *Paederus melanurus* konnte des Weiteren festgestellt werden, dass ein vorheriges Einfrieren der Eier zu einer reduzierten Zahl von Larven führt, die nach der Fütterung eine Pederinproduktion aufwiesen. Dasselbe passiert auch bei vorherigem Erhitzen der Eier bei 80°C, wobei hier noch zusätzlich das schon vorhandene Pederin **23** zu Pseudopederin umgesetzt wird. Beide Beobachtungen sind ein Zeichen für Endosymbionten, die keine Sporen bilden.⁷⁸ Ein in den (+)-Weibchen vorherrschendes Bakterium konnte außerdem durch 16S rRNA-Untersuchungen als naher Verwandter von *Pseudomonas aeruginosa* herausgestellt werden.⁷⁹ Diese Erkenntnisse unterstützen die Vermutung, dass Pederin **23** durch ein symbiotisch lebendes Bakterium in dem Käfer produziert wird.

Durch die Entdeckung des putativen Biosyntheseclusters von Pederin **23**^{11, 39, 41} ist die Theorie der bakteriellen Pederin **23**-Produktion weiter verstärkt: Flankierende Bereiche der Clusterregionen zeigen viele IS-Elemente (Insertionssequenzen), Transposons und Gene mit hoher Ähnlichkeit zu *Pseudomonas aeruginosa* auf Nukleotid- und Proteinebene sowie eine große Anzahl unvollständiger ORFs.⁸⁰ Durch Konstruktion einer DNA-Bibliothek von Bakterien aus dem Käfer und anschließendem Screening nach Pederingenen konnten diese deutlich häufiger detektiert werden als beim Screenen einer DNA-Bibliothek aus Käfer-Gesamt-DNA. Alle bisherigen Ergebnisse deuten auf einen horizontalen Gentransfer des Pederinclusters in das Bakteriengenom als sogenannte Genominsel hin, wobei im Folgenden verschiedene Integrations- und/oder Neuordnungsprozesse abgelaufen sein mussten.⁸⁰ *Pseudomonas aeruginosa* ist zudem ein opportunistisch pathogener Organismus, der Immunsystem-schädigende Infektionen hervorrufen kann. Eine bakterielle Infektion des Käfers mit anschließender genetischer Adaption der Partner

kann daher die Grundlage der Symbiose gewesen sein.³⁹ Auch für die Biosynthese der Polyketidfamilie der Bryostatine wurde gezeigt, dass die putativen Biosynthesegene auf dem Genom von *Candidatus Endobugula sertula* liegen, einem symbiotischen Bakterium in dem marinen Moostierchen *Bugula neritina*.^{81, 82}

Alle Versuche, den Käfer-Symbionten zu kultivieren, schlugen bisher jedoch fehl, sodass eine nachhaltige Pederin **23** -Produktion nur durch heterologe Expression erfolgen kann.^{41, 80} Allein für die Bestimmung der Summenformel und einer ersten Strukturidee von Pederin **23** wurden 25 Millionen *Paederus fuscipes* Käfer gesammelt und extrahiert.⁸³ Die Totalsynthese von Pederin **23** erfordert 12 Schritte mit einer Gesamtausbeute von 11% für die längste lineare Sequenz, wobei sich die Synthese auch zur Erzeugung von Strukturanaloga eignet.⁸⁴ Eine heterologe Expression würde demgegenüber jedoch eine effektivere und längerfristige Alternative darstellen mit der Möglichkeit, durch Manipulation der genetischen Information diverse Substanzen zu produzieren. Grundlage dazu wäre aber zunächst ein funktioneller Beweis, dass die isolierten Gene tatsächlich an der Pederinproduktion beteiligt sind.

Der putative Biosynthesegencluster von Pederin **23** ist eine NRPS/PKS mit einer modularen Typ I *trans*-AT-PKS (Abb. 3.16), wobei der größte Teil des Clusters (*pedA* bis *pedH*) durch das Screenen einer DNA-Bibliothek aus der Gesamt-DNA des Käfers *Paederus fuscipes* mit KS-Primern gefunden wurde.³⁹ Der zweite Bereich (*pedI* bis *pedK*) konnte ebenfalls durch Screenen der DNA-Bibliothek entdeckt werden.⁴¹ Durch Sequenzierung des Symbiontengenoms war die Identifizierung des dritten Abschnitts mit den noch fehlenden Genen (*pedL* bis *pedR*) möglich.¹¹ Die drei Bereiche liegen auf unterschiedlichen Abschnitten im Genom des Symbionten und sind damit seltene Beispiele für nicht geclusterte Gene einer bakteriellen PKS.⁴¹ Ein Grund hierfür kann das oben erwähnte vermehrte Auftreten von Genen für Transposons und IS-Elemente in flankierenden Bereichen des PKS-Clusters sein, die eine Neu- und Umordnung der Gene verursacht haben könnten.^{11, 80} Eine Fragmentierung des Genclusters konnte auch für die Bryostatin 1 **3**-PKS entdeckt werden, ebenfalls eine modulare *trans*-AT Typ-I-PKS aus einem Symbionten.⁶ Folglich scheinen „nicht geclusterte Gencluster“ beim Auftreten von Transposons und einer symbiotischen Polyketidproduktion durchaus vorzukommen.

Der putative Pederin-Biosynthesegencluster (*ped*-Gencluster) stellt die erste beschriebene *trans*-AT-PKS dar, danach folgte jedoch die Entdeckung vieler ähnlich aufgebauter Gencluster, wie das Leinamycin-,⁸⁵ Bacillaen-^{44, 46} oder Bryostatin 3-System.⁶

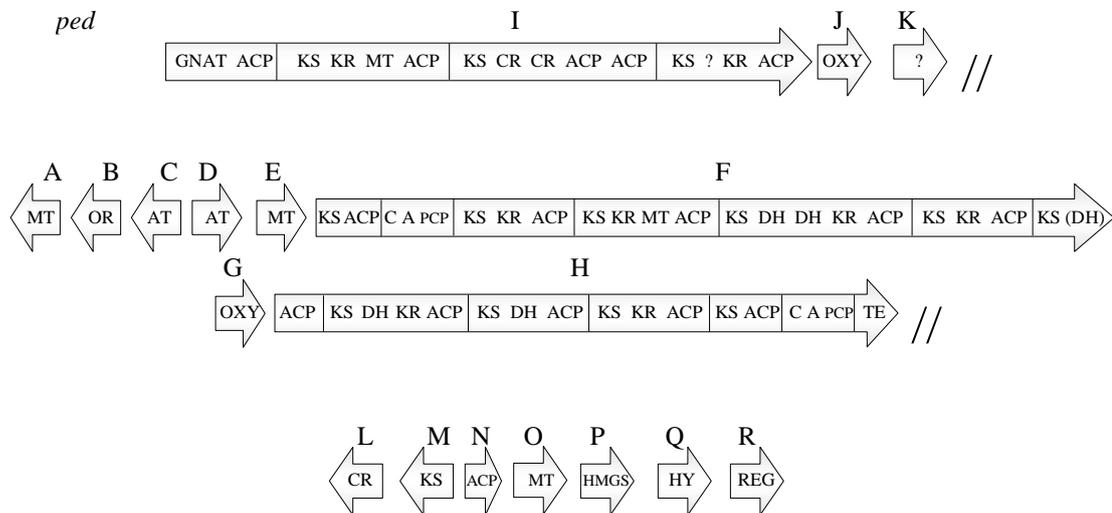


Abb. 3.16: Putativer Gencluster zur Biosynthese von Pederin.

Zum putativen Pederin-Gencluster (*ped*-Gencluster) zählen drei Genomregionen des Bakteriensymbionten: *pedI-K*, *pedA-H*, *pedL-R*. Die drei Bereiche sind an unterschiedlichen Stellen des Bakteriengenoms lokalisiert (verdeutlicht durch die Abtrennung //). Die Pfeile stellen jeweils das Gen in Leserichtung dar. Die Bezeichnung der ORFs mit A-R erfolgte entsprechend der zeitlichen Entdeckung der Gene, sie entspricht nicht der Abfolge bei der Pederin **23**-Biosynthese. *pedI*, *pedF* und *pedH* sind NRPS/PKS-Hybride mit einer modularen Typ-I-*trans* AT-PKS.¹¹

Funktionelle Beweise, dass der gefundene Gencluster für die Biosynthese von Pederin **23** verantwortlich ist, wurden bisher noch nicht erhalten, jedoch sprechen einige Fakten dafür: Zum einen konnten in (+)-Weibchen und ihren Nachkommen unabhängig vom Sammelort *ped*-Gene eindeutig durch PCR nachgewiesen werden, während die entsprechende PCR mit (-)-Weibchen und Männchen keine Signale lieferte. Zum anderen wurde kein weiterer entsprechender Gencluster in der GesamtdNA des Käfers entdeckt. Zum dritten stimmt die Architektur des Clusters mit der Pederin-Struktur **23** entsprechend der Kolinearitätsregel⁴⁰ überein (vgl. Abschnitt 3.4)³⁹. Aus den genetischen Informationen des Genclusters konnte im Folgenden die Biosynthese von Pederin **23** postuliert werden (Abb. 3.17).¹¹

Die Genregion *pedI-K* enthält das *trans*-AT-PKS-Gen *pedI* mit 4 Modulen. Da dem ersten Modul eine KS fehlt, findet hier die Initiierung der Kettenbildung statt. Im Gegensatz zu den üblichen Initiierungsmodulen von Typ-I-PKS enthält das Modul

eine Domäne mit einer GCN5-verwandten *N*-Acetyltransferase (GNAT), die üblicherweise Acetyl-CoA-Substrate bindet.^{41, 86} Andere GNAT-haltige Module sind zum Beispiel in den Biosyntheseclustern von Onnamid A **26**¹¹ oder von Curacin A (aus dem marinen Cyanobakterium *Lyngbya majuscula*) gefunden worden.⁸⁶ Die Analyse der GNAT aus dem Curacin A-Cluster zeigte zudem, dass sie nicht nur für den Transfer von Acetyl-CoA **7** auf das ACP zuständig ist, sondern auch Malonyl-CoA **8** decarboxylieren kann. Am ACP, das auf die GNAT folgt, konnte jeweils nur die Acetyl-Gruppe detektiert werden, unabhängig davon, ob Acetyl- **7** oder Malonyl-CoA **8** als Substrat eingesetzt wurde. Die GNAT in den Genclustern von Curacin A, Pederin **23**, Onnamid A **26**, Theopederin, Myxovirescin und Rhizoxin weisen dabei eine hohe Ähnlichkeit auf und erfüllen demnach anscheinend die selbe Funktion.⁸⁶

Die im 2. Modul von *pedI* codierte MT katalysiert eine C-Methylierung in α -Position zu einer Hydroxylgruppe. Für die Bildung der OH-Gruppe am β -Ketothioester ist eine ebenfalls im Modul vorhandene KR zuständig. Dies spiegelt sich auch jeweils in der Intermediatstruktur wider.⁴¹

Im zweiten Elongationsschritt wird eine selten vorkommende Exomethylengruppe an C4-gebildet. Ein hierfür mit verantwortlichem Enzym ist wahrscheinlich die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A- (HMGCoA-) Synthase (PedP). In der Literatur beschriebene Homologe katalysieren die Addition von Acetyl-CoA **7** an eine Ketogruppe mit anschließender Decarboxylierung, Dehydratisierung und/oder Reduktion.^{87, 88} Enzyme der Crotonase (CR)-Superfamilie sind ebenfalls an einer Vielzahl von verschiedenen Reaktionen beteiligt und stabilisieren Anionen von CoA-Thioester-Intermediaten.⁸⁹ Die Enzyme der im *ped*-Cluster gefundenen Crotonase-codierenden Gene (CR-Domänen von *pedI3*; *pedL*) können folglich ebenfalls in die Bildung der Exomethylengruppe involviert sein.^{11, 41} Die Reaktion erfolgt wahrscheinlich unter Beteiligung der freiständigen ACP PedN und der ebenfalls freiständigen KS PedM,⁴¹ die aufgrund eines fehlenden konservierten Cys nur noch eine Decarboxylierung katalysieren kann.⁹⁰ Funktionelle Beweise bezüglich des *ped*-Genclusters stehen noch aus, während die Beteiligung der erwähnten Enzyme im Fall des Genclusters zur Biosynthese von Bacillaen^{44, 91} sowie des Clusters zur Curacin A-Biosynthese⁹² nachgewiesen werden konnte (vgl. Abschnitt 5.4.3).

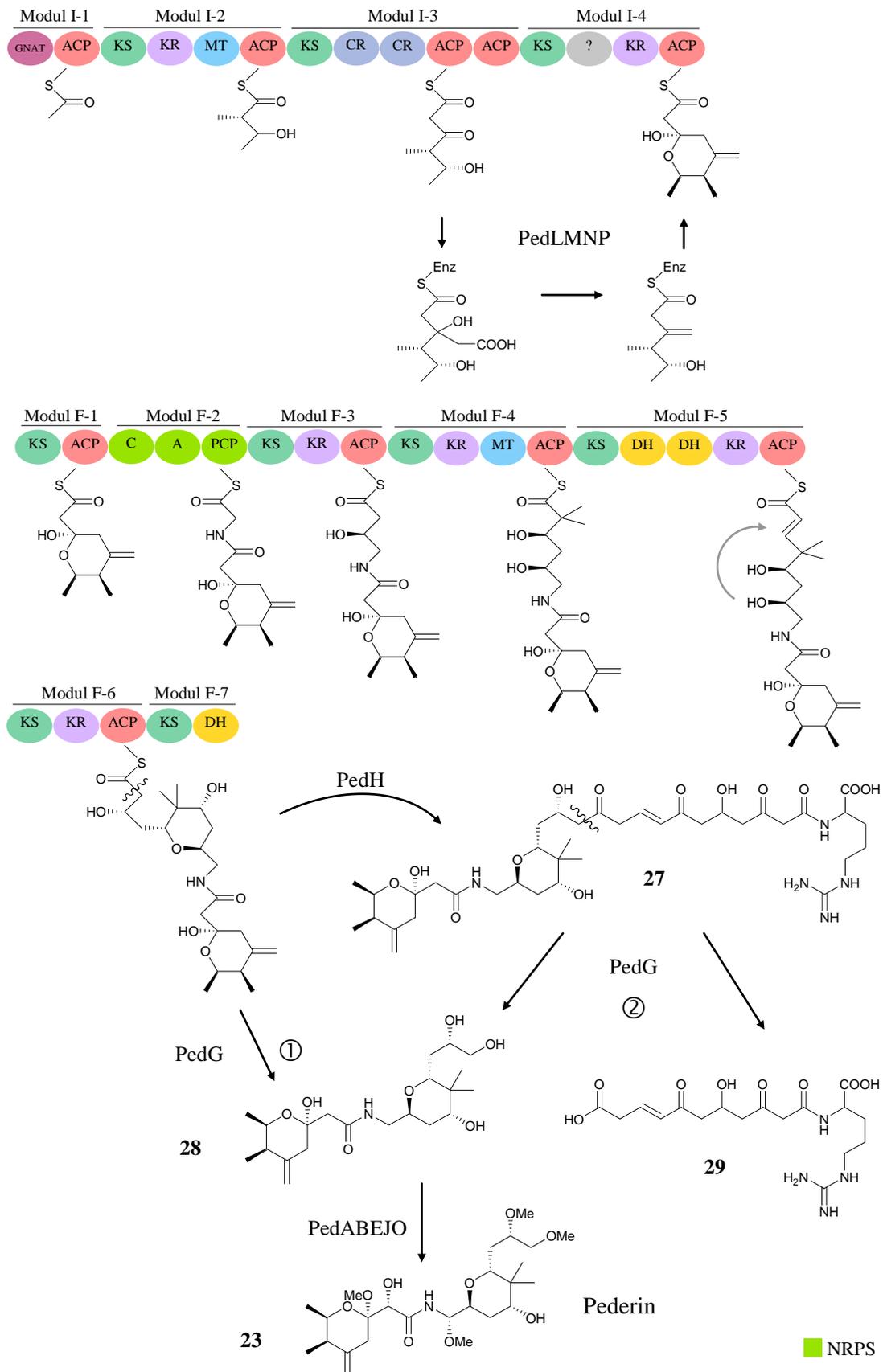


Abb. 3.17: Putative Biosynthese von Pederin durch ein NRPS/PKS-Hybrid.

Die Bildung von Pederin **23** könnte auf zwei verschiedenen hypothetischen Wegen (① und ②) erfolgen (s. Text). Die ACP liegen in ihrer *holo*-Form vor, der Phosphopantetheinarm wurde nicht gezeichnet (vgl. Abb. 3.4). Enz, ACP des 3. Moduls von *pedI*.¹¹

Die weiteren Elongationsschritte des Intermediats nach intramolekularer Cyclisierung erfolgen dann über Enzyme des 4. Moduls von *pedI* und den Modulen von *pedF* entsprechend der Kolinearitätsregel.^{39, 40} Eine Verlängerung durch die Enzyme von Modul PedF-1 findet nicht statt, da der KS das konservierte Histidin für die Decarboxylierung der Verlängerungseinheit fehlt.⁹³ Die A-Domäne der NRPS im 2. Modul von *pedF* hat eine 100%ige Identität mit dem bekannten nichtribosomalen Code^{59, 60} (s. Abschnitt 3.6) für den Einbau von Glycin, was dem Aufbau von Pederin **23** entspricht.³⁹ Die MT, codiert im 4. Modul von *pedF*, zeigt Homologie zu solchen, die für den Einbau geminaler Dimethylgruppen zuständig sind.^{94, 95} Auch dies deckt sich mit der Pederinstruktur **23**. Die Doppel-DH in PedF-5 katalysiert die Bildung des Pyranringes, was ebenfalls schon in der Literatur beschrieben wurde.⁹⁶

Interessanterweise liegt nach *pedF* noch *pedH* mit 4 weiteren PKS-Modulen und einem NRPS-Modul, dessen A-Domäne den nichtribosomalen Code für den Einbau von Arginin aufweist.³⁹ Diese Genarchitektur entspricht jedoch nicht der Pederinstruktur **23**. Die am Ende von PedH befindliche TE spricht dafür, dass an dieser Stelle das Polyketid von dem Multienzymkomplex abgespalten wird. Folglich würde daraus theoretisch die in Abb. 3.17 (Weg ②) dargestellte Struktur **27** resultieren. Diese weist sehr starke Ähnlichkeit zu aus Schwämmen isolierten Mitgliedern der Pederinfamilie wie dem Onnamid A **26** auf, insbesondere bezüglich Kettenlänge und der eingebauten Aminosäure. Zwischen *pedF* und *pedH* befindet sich aber noch *pedG*, das für eine FAD-abhängige Monooxygenase codiert. Diese Enzyme katalysieren oft oxidative Spaltungen in einer Bayer-Villiger-Reaktion. Die Lage von *pedG* legt die Vermutung nahe, dass das Gen in ein vorher intaktes Modul eines NRPS/PKS-Hybrid eingefügt wurde. Die Funktion von PedG könnte die Termination der Kettenverlängerung nach PedF-7 und anschließender oxidativer Abspaltung der Pederinvorstufe **28** vom Enzymkomplex sein (Weg ① in Abb. 3.17). Dafür würde die Lage von *pedG* sprechen und der oxygenierte Pederinterminus. Eine andere Möglichkeit wäre die weitere Elongation des Intermediats durch die Module von PedH unter Bildung der oben erwähnten „schwammähnlichen“ Struktur **27** und einer folgenden Bayer-Villiger-Oxidation durch PedG mit den Produkten **28** (Pederin-Vorstufe) und der nicht benötigten Substanz **29** (Weg ② in Abb. 3.17). Beweise für den einen oder anderen Weg stehen jedoch noch aus.³⁹

Die weiteren Tailoring-Enzyme führen dann zu der bekannten Struktur von Pederin **23**, wobei noch nicht alle Funktionen eindeutig geklärt werden konnten. Interessanterweise werden auf dem Cluster nur die drei *O*-Methyltransferasen (*O*-MT) PedA, PedE und PedO codiert, während Pederin **23** vier *O*-Methylierungen aufweist. Der *ped*-Gencluster und die Struktur von Pederin **23** korrespondieren folglich sehr gut und es sprechen auch viele weitere Fakten dafür, dass es sich um den Pederin-Biosynthesegencluster handelt (s. o.). Die heterologe Expression des Clusters und damit mögliche Knock-out-Versuche waren bisher nicht erfolgreich, sodass abschließende Beweise noch ausstehen.

Bisherige Erkenntnisse deuten auf die Pederin **23** -Produktion durch einen Symbionten hin, der zur Gattung *Pseudomonas* gehört (s. o.). Vergleiche des *ped*-Genclusters mit dem *onn*-Gencluster, der wahrscheinlich für die Biosynthese von Onnamid A **26** verantwortlich ist²¹ und bisher gefundenen Teilen des putativen Genclusters zur Produktion von Psymberin **24** (unveröffentlicht) zeigen große Ähnlichkeit bezüglich PKS-Architektur und Sequenz. Im Falle des *onn*-Clusters konnten außerdem Hinweise auf dessen Lokalisierung in einem Bakteriengenom gefunden werden,²¹ wobei der Symbiont wahrscheinlich zu einem Vertreter des Phylums *Chloroflexi* gehört (unveröffentlicht). Bisherige Erkenntnisse deuten darauf hin, dass symbiotisch lebende Bakterien für die Produktion dieser pharmakologisch interessanten Naturstoffe verantwortlich sind.⁹⁷ Für Seescheiden, die neben Schwämmen ebenfalls reich an Naturstoffen mit pharmakologischem Nutzen sind, konnte gezeigt werden, dass die eigentliche Quelle ein Symbiont ist. Hierbei handelt es sich um *Lissoclium patella*, das einen Peptid-produzierenden Symbionten der Gattung *Prochloron*, ein Cyanobakterium, enthält. Ein Durchbruch war die erfolgreiche Expression der Biosynthesegene in *E. coli*.^{98, 99} Beispiele wie diese zeigen, dass eine nachhaltige Produktion sonst nur schwer zugänglicher Naturstoffe über bakterielle Systeme möglich ist.⁹⁷

4. Zielsetzung

Wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben, steht der funktionelle Beweis noch aus, dass der *ped*-Gencluster (Abb. 3.16) tatsächlich zur Biosynthese von Pederin **23** dient, obwohl eine Vielzahl von Fakten dafür sprechen.

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Gene aus dem *ped*-Gencluster amplifiziert und in unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert werden. Nach Überexpression der entsprechenden Fusionsproteine in verschiedene *E. coli*-Stämmen sollten die Enzyme mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden, um sie im Folgenden für diverse Enzym-Assays verwenden zu können. Damit sollten genauere Informationen über ihre Funktion erhalten werden.

Ein Schwerpunkt lag dabei in der Expression verschiedener ACP, die durch eine geeignete PPTase in ihre aktive *holo*-Form überführt werden sollten, um dann mit den ebenfalls überexprimierten AT reagieren zu können (Abb. 3.4 und 3.5). Dabei sollte auch herausgefunden werden, warum es im *ped*-Cluster zwei in *trans* agierende AT gibt, obwohl für den Einbau von Malonat theoretisch nur eine notwendig wäre. Für die Untersuchung der ACP-AT-Assays sollten massenanalytische Verfahren bzw. die Verwendung von radioaktiv markiertem Substrat getestet werden.

Ein weiterer Hauptaspekt der Arbeit war die Untersuchung der *O*-MT, die ebenfalls auf dem *ped*-Gencluster lokalisiert und für post-PKS-Methylierungen vermutet wurden. Hierzu sollten die Substratanaloga Mycalamid A **25** und B **32**, die weniger *O*-Methylierungen als Pederin **23** aufweisen, als Substrate für die überexprimierten Proteine eingesetzt werden. Die Reaktionen sollten durch geeignete analytische Verfahren untersucht werden. Eine *O*-MT des *onn*-Genclusters (putativer Gencluster zur Biosynthese von Onnamid A **26**) sollte ebenfalls in einem Enzym-Assay mit Pederin **23** als Substrat eingesetzt werden, um Rückschlüsse auf die Funktion dieser *O*-MT ziehen zu können.

Die A-Domänen der beiden NRPS in PedF und PedH, die Oxidoreduktase PedB, die KS PedM und die HMGCoA-Synthase PedP sollten überexprimiert und untersucht

werden oder zumindest für zukünftige Arbeiten als überexprimierbares Protein zur Verfügung gestellt werden. Bei PedM und PedP handelt es sich um Enzyme, die wahrscheinlich an der Ausbildung der Exomethylengruppe im Pederin **23** (3.8.2) beteiligt sind.

Die Untersuchungen sollten zum funktionellen Beweis des Genclusters dienen und tiefere Einblicke in die Biosynthese von Pederin **23** liefern. Ziel war es auch, verschiedene Expressionssysteme und -stämme, sowie post-translationale Enzyme zu testen und die Untersuchung und Analytik der Reaktionsprodukte für zukünftige Arbeiten mit Proteinen aus *trans*-AT-PKS zu etablieren.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Expression und Massebestimmung der ACP

Carrierproteine spielen eine zentrale Rolle in der Biosynthese von Polyketiden, Fettsäuren und nichtribosomalen Peptiden. Die Familie der Carrierproteine ist charakterisiert durch kleine Proteine, aufgebaut aus vier α -Helices mit einer konservierten Serin-Seitenkette am Ende der ersten Helix. An diesem Serin findet die notwendige post-translationale Phosphopantetheinylierung durch eine PPTase statt, indem der 4'-Phosphopantetheinarm von CoA **14** übertragen wird und so die Umsetzung vom inaktiven *apo*- zum aktiven *holo*-Protein erfolgt (Abb. 3.4).³⁴ Diese Grundvoraussetzung für funktionelle ACP musste folglich auch bei der Expression der ACP aus dem *ped*-Cluster (Abb. 3.16) bestehen. Zu Beginn wurde hierzu eine PPTase (Sfp) aus *Bacillus subtilis* verwendet,¹⁰⁰ später die PPTase Svp aus *Streptomyces verticillus* ATCC15003.¹⁰¹ Dabei wurde sowohl die Coexpression mit zwei Plasmiden als auch auf einem Plasmid getestet. Zum Vergleich wurden auch die *apo*-Proteine exprimiert. Dies ist bei einer Proteinherstellung in *E. coli* möglich, da nur ein geringer Teil eine Phosphopantetheinylierung durch die bereits vorhandene PPTase AcpS des Expressionsstammes erfährt.^{102, 103} Nach Angaben in der Literatur liegt die Größenordnung bei unter 5% der überexprimierten *apo*-ACP, die in ihre *holo*-Form umgesetzt werden.¹⁰³ Für die Expression von ACP aus FAS hingegen ist ein PPTase-Zusatz nicht erforderlich. Hier erfüllt die vorhandene PPTase diese Phosphopantetheinylierung, und die Expression erfolgt direkt als *holo*-ACP.¹⁰⁴

Als repräsentative Beispiele des *ped*-Genclusters (Abb. 3.16) wurden verschiedene ACP untersucht:

- ACP-Domäne aus dem 2. Modul von *pedI* → bezeichnet als Gen *pedI2* bzw. Protein PedI2
- Doppel-ACP-Domäne aus dem 3. Modul von *pedI* → *pedI3*, PedI3
- separate ACP-Domäne → *pedN*, PedN
- ACP-Domäne aus dem 1. Modul von *pedI* mit davor liegender GNAT-Domäne → *pedGNAT-ACP*, PedGNAT-ACP

PedGNAT-ACP wurde erst zum Ende der vorliegenden Arbeit einbezogen, sodass vorherige Expressionsversuche damit nicht unternommen wurden.

Für die Expression der ACP wurden die Expressionsvektoren pTYB1, pRSETB, pMAL-c2X und pHIS8-3 bzw. pHIS8-3 *svp* verwendet, für die Expression von Sfp die Vektoren pQE60 *sfp* -pREP4 und pREP4 *sfp* (Tab. 6.2).

5.1.1 Intein-Fusionsproteine aus pTYB1

Durch Klonierung in die MCS (Multiple Cloning Site) des Vektors pTYB1 (Tab. 6.2) werden Fusionsproteine erzeugt, die am C-Terminus einen Inteinrest aufweisen. Dieser bindet an Chitinharz und ermöglicht so eine Aufreinigung des Proteins. Eine Abspaltung des Inteins ist durch DTT direkt an der Säule möglich und während der Inteinteil an der Säule verbleibt, kann das gewünschte Protein eluiert werden. Durch Klonierung in die vom Hersteller vorgeschlagenen Schnittstellen *NdeI* und *SapI* (vgl. MCS von pTYB1, Abb. 6.1) verbleiben am C-Terminus des gewünschten Proteins nach der Spaltung keine zusätzlichen Aminosäuren. *SapI* hat die Eigenschaft nicht innerhalb der entsprechenden Erkennungssequenz zu schneiden, sondern erst danach, wobei es für das Enzym keine Rolle spielt, um welche Basen es sich dabei handelt. Werden diese frei wählbaren Nukleotide im Rückwärtsprimer entsprechend der DNA-Sequenz gewählt, mit der das Intein-Gen beginnt, verbleiben zwischen Vektor und kloniertem Biosynthesegen an dieser Stelle keine zusätzlichen Basen (s. Herstellerangaben des IMPACT-CN-Systems).

Die ACP-Domänen wurden durch PCR nach 6.6 amplifiziert, wobei jeweils das entsprechende Cosmid verwendet wurde (Tab. 6.1). Diese Cosmide stammen aus den DNA-Bibliotheken, die in früheren Arbeiten zur Identifizierung des *ped*-Genclusters dienten und sequenziert waren.^{11, 39, 41} Nach erfolgreicher Amplifizierung des Gens schloss sich eine TA-Klonierung und Sequenzierung an (nach 6.12.1; Konstrukte: pKZ16 (*pedI2*), pKZ8 (*pedI3*), pKZ9 (*pedN*), Tab. 6.8). Bei einer TA-Klonierung werden PCR-Produkte mit einem 3'-dATP-Überhang in einen Vektor ligiert, der einen 5'-dTTP-Überhang aufweist. Der 3'-Überhang des PCR-Produktes entsteht während der Amplifizierung durch Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase oder wird anschließend angefügt bei Nutzung von proof-reading-Polymerasen. Aus einem solchen TA-Konstrukt kann dann das interessierende Gen/Genstück mit den Restriktionsenzymen ausgeschnitten werden, die durch die Primer während der PCR eingebracht wurden. Dies erfolgte auch hier, indem der TA-Vektor mit *NdeI* und *SapI* verdaut wurde. Die Gene konnten dann abschließend in den Vektor pTYB1

entsprechend 6.12.2 ligiert werden. Die erfolgreiche Ligation wurde durch Restriktion und Überprüfung des Schnittmusters bestätigt. Trotz vieler Versuche gelang die Klonierung von *pedI2* und *pedN* in den Expressionsvektor nicht, lediglich *pedI3* zeigte einen Positivklon (pKZ20-1, Tab. 6.9).

Nach Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* ER2566 erfolgte die Proteinexpression (6.13) und anschließende Aufreinigung (6.13.3). Die Analyse der Expression erfolgte mittels SDS-PAGE (6.13.4) und zeigte weder in Lösung noch im Pellet ein Protein der entsprechenden Größe (MW (PedI3 aus pTYB1) = 20,3kDa, Tab. 6.17) (ohne Abb.). Die Klonierung und Expression mittels Intein-Fusionsproteine wurde an dieser Stelle nicht weiterverfolgt, sondern zur Nutzung anderer Expressionssysteme übergegangen. Der Einsatz der Chitinbindedomäne wurde bereits für eine in der Literatur beschriebene ACP-Produktion verwendet, wobei dieses ACP aus einer FAS in *Pseudomonas aeruginosa* stammt. Auch hier wurden die Schnittstellen *NdeI* und *SapI* verwendet und eine DTT-Spaltung an der Säule durchgeführt, wobei eine Proteinmenge von 5 mg aus 4 l Medium erhalten wurde.¹⁰⁵ Für die hier gewünschte ACP-Herstellung führte das System jedoch nicht zum Erfolg.

5.1.2 His₆-Fusionsproteine aus pRSETB

Bei Nutzung des Expressionsvektors pRSETB (Tab. 6.2) werden Fusionsproteine erzeugt, die am N-Terminus einen His₆-Tag tragen und durch die Ausbildung von Nickel-Chelat-Komplexen mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule aufgereinigt werden können. Die Elution erfolgt dabei mittels Imidazol, das eine stärkere Affinität zum Säulenmaterial besitzt. Eine Abspaltung des kurzen Histidin-Tags nach der Reinigung ist meistens nicht erforderlich.

Die Gene wurden mittels PCR (6.6) unter Verwendung der entsprechenden Cosmide (Tab. 6.1) amplifiziert. Daran schloss sich die TA-Klonierung und Sequenzierung (6.12.1) an. Die TA-Konstrukte sind für *pedI2* pKZ79-1, für *pedI3* pKZ57-1 und für *pedN* pKZ32 (Tab. 6.8). Diese Plasmide konnten im Folgenden geschnitten und die ACP-Domäne jeweils in pRSETB kloniert werden (6.12.2). Nach Restriktionskontrolle ergaben sich als Positivklon für *pedI2* pKZ82-2, für *pedI3* pKZ61-2 und für *pedN* pKZ51-14 (Tab. 6.9).

In allen drei Fällen war nach der Proteinexpression (6.13), Aufreinigung (6.13.2) und SDS-PAGE (6.13.4) kein Protein der entsprechenden Größe (Tab. 6.16) auf dem Proteingel sichtbar (ohne Abb.). Daher wurde auch keine Coexpression der PPTase durchgeführt. Trotz diverser Versuche konnte keine erfolgreiche Überexpression der Proteine gelingen. In Veröffentlichungen wurde zwar schon von der gelungenen Expression von Proteinen aus pRSETB berichtet,^{106, 107} dies zeigte hier jedoch keinen Erfolg. Da bei anderen Versuchen ebenfalls Probleme mit dem Vektor auftraten, wurden keine weiteren Experimente diesbezüglich durchgeführt. Möglicherweise hatte der verwendete Vektor auch Mutationen, die zur ausbleibenden Expression führten. Auch in einer anderen Arbeitsgruppe wurde von Problemen mit dem Vektor pRSETB berichtet (persönliche Mitteilung von B. Busch, HKI Jena).

5.1.3 Maltosebinde-Fusionsproteine aus pMAL-c2X

Durch Verwendung des Vektors pMAL-c2X (Tab. 6.2) erfolgt durch IPTG-Induktion die Expression eines Fusionsproteins, das am N-Terminus ein Maltosebindeprotein (MBP) mit einem Molekulargewicht (MW) von 42,5 kDa (Tab. 6.14) besitzt. Das Fusionsprotein bindet an Amyloseharz und bietet so die Möglichkeit der Aufreinigung. Durch Maltose-Zugabe kann das Protein eluiert werden und mittels Faktor Xa in das MBP und dem interessierenden Protein gespalten werden. Die Erkennungssequenz des Faktors liegt auf DNA-Ebene direkt vor der MCS, sodass nur wenige Aminosäuren am N-Terminus des Proteins zurückbleiben (vgl. MCS des Vektors, Abb. 6.1).

Für die Ligation in den Expressionsvektor dienten dieselben TA-Konstrukte wie für pRSETB (s. 5.1.2). Diese wurden mit *Bgl*II geschnitten und die Gene in die kompatible *Bam*HI-Schnittstelle von pMAL-c2X entsprechend 6.12.2 ligiert. Nach Restriktionskontrolle der Klone mit geeigneten Endonukleasen, erwiesen sich folgende Konstrukte als korrekt: für *pedI2* pKZ81-1, für *pedI3* pKZ59-4 und für *pedN* pKZ47-5 (Tab. 6.9).

Die Vektorkonstrukte wurden in den Expressionsstamm *E. coli* ER2566 überführt, die Proteine überexprimiert und aufgereinigt. Dabei wurde zu Beginn keine Coexpression der PPTase durchgeführt und folglich die apo-ACP erhalten. Die Expression der MBP-Fusionsproteine war für alle drei ACP erfolgreich (Abb. 5.1).

Die Höhe der entsprechenden Elutionsfraktion im SDS-PA-Gel und der theoretisch zu erwartende Wert (Tab. 6.14) stimmen im Rahmen der möglichen Genauigkeit überein, da aus dem Proteingel nur eine Schätzung der Größe durch Vergleich mit dem Marker erfolgen kann.

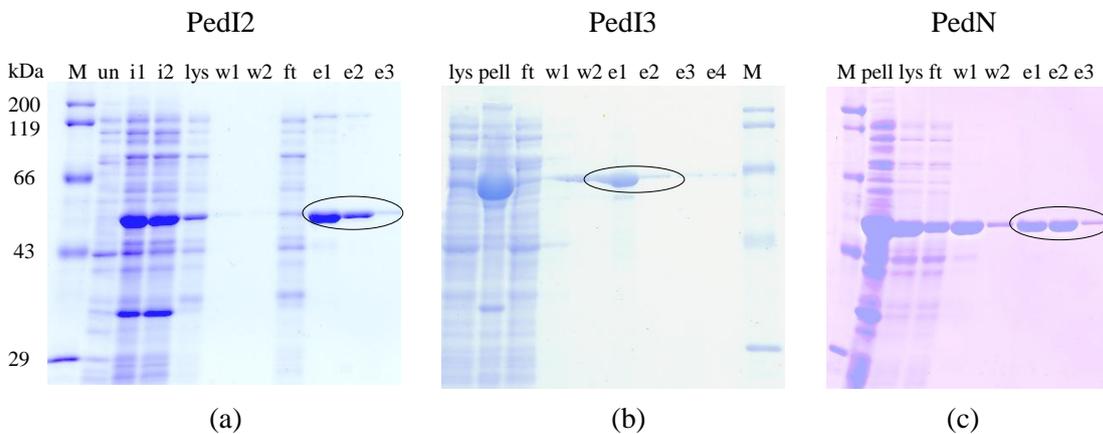


Abb. 5.1: Expression der ACP aus pMALc-2X.

- (a) pKZ81-1 (*pedI2*/pMALc-2X) / *E. coli* ER2566
 (b) pKZ59-4 (*pedI3*/pMALc-2X) / *E. coli* ER2566
 (c) pKZ47-5 (*pedN*/pMALc-2X) / *E. coli* ER2566

Expressionsbedingungen jeweils:

100 ml Rich Medium mit Glucose (RM), Amp¹⁰⁰, 1 mM IPTG, 37 °C, 5 h

M, Marker (RotiMark Standard); un, uninduzierte Kontrolle; i1, Probe nach 3,5 h; i2, Probe nach 5 h; lys, Probe von löslichen Überstand; pell, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w1, w2, Waschfraktion 1, 2; e1 - e4, Elutionsfraktionen 1-4; Expression entsprechend 6.13, Aufreinigung nach 6.13.1.1; SDS-PAGE: 12% Trenngel (6.13.4)

Nach Herstellung der *apo*-ACP erfolgte im nächsten Schritt die Coexpression der ACP und dem Vektor pREP4 *sfp*, der unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors das Gen für die PPTase Sfp enthält. Folglich sollte bei IPTG-Zugabe gleichzeitig eine Expression der *apo*-ACP und der PPTase stattfinden. Da die PPTase die *apo*- in die aktive *holo*-Form umwandelt (vgl. Abb. 3.4), sollte in der Elutionsfraktion der Proteinaufreinigung neben eventuell nicht umgesetzten *apo*- jeweils auch das *holo*-ACP vorliegen. Die Konstrukte wurden hierzu in elektrokompente Zellen *E. coli* ER2566 pREP4 *sfp* transformiert und die Proteinexpression durchgeführt. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte wie zuvor und wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert (Abb. 5.2).

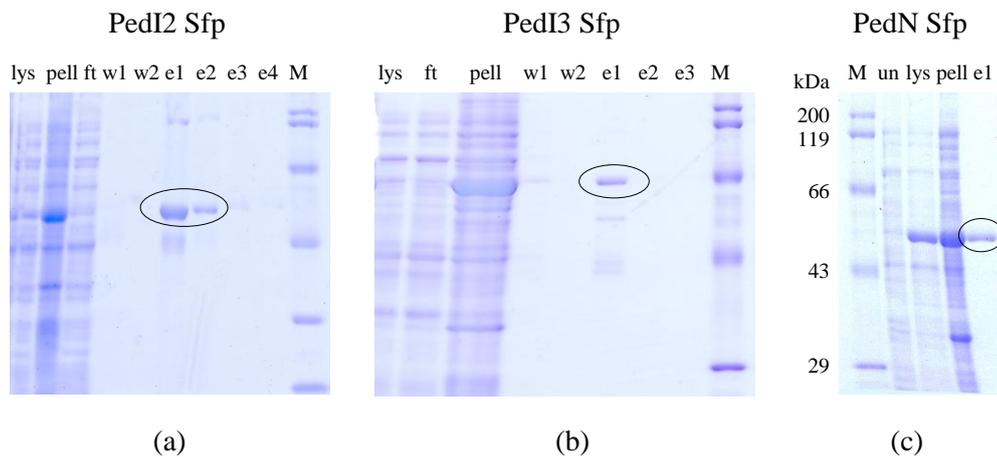


Abb. 5.2: Expression der ACP aus pMALc-2X unter Sfp-Coexpression.

(a) pKZ81-1 / *E. coli* ER2566 pREP4 *sfp*: 100 ml RM Amp¹⁰⁰, 1 mM IPTG, 37 °C, 5 h

(b) pKZ59-4 / *E. coli* ER2566 pREP4 *sfp*: 200 ml RM Amp¹⁰⁰, 1 mM IPTG, 37 °C, 6 h

(c) pKZ47-5 / *E. coli* ER2566 pREP4 *sfp*: 100 ml RM Amp¹⁰⁰, 0,5 mM IPTG, 37 °C, 5 h

M, Marker (RotiMark Standard); un, uninduzierte Kontrolle; lys, Probe von löslichen Überstand; pell, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w1, w2, Waschfraktion 1, 2; e1 - e4, Elutionsfraktionen 1-4; Expression entsprechend 6.13, Aufreinigung nach 6.13.1.1; SDS-PAGE: 12% Trenngel (6.13.4)

Der Massenunterschied zwischen *apo*- und *holo*-ACP beträgt lediglich 339 Da. Dieser Wert ergibt sich aus dem Molekulargewicht des Phosphopantetheinarms abzüglich der Masse eines Wasserstoffatoms. Die Reaktion von CoASH **14** mit dem ACP erfolgt am Serin-Rest (Ser) des Proteins (s. Abb. 3.4), wobei das Wasserstoffatom der Hydroxylgruppe in Ser nach der Anknüpfung des Phosphopantetheinarms nicht mehr vorhanden ist. Bei Addition der Masse des *apo*-ACP zur angelagerten Aktivierungseinheit muss dieses H-Atom berücksichtigt werden. Der Einfachheit halber kann aber auch die ursprüngliche *apo*-ACP-Masse verwendet werden und 339 Da anstatt 340 Da (= die eigentliche Masse des angelagerten Cofaktors) hinzugerechnet werden. Dieser Unterschied lässt sich aus Proteingelen jedoch nicht ablesen, die Größeneinschätzung stellt lediglich eine Näherung dar. Aus diesem Grund muss eine genaue massenspektroskopische Untersuchung folgen, um Aussagen über die erfolgreiche Phosphopantetheinylierung treffen zu können.

Die entsprechenden Elutionsfraktionen der *apo*-ACP und der vermeintlichen *holo*-ACP wurden daher mittels MALDI-TOF-MS untersucht (6.14.1; MPI Jena). Die erhaltenen Spektren der *apo*-ACP zeigten jedoch neben einem teilweise starken Rauschen sehr große Abweichungen gegenüber den theoretischen Massen (ohne

Abb.). Eine Bestimmung von *apo*-PedI3 war zudem nicht möglich. Aufgrund der hohen Massendifferenz war schon bei den *apo*-ACP ein Vergleich zur theoretischen Masse (Tab. 6.14) nicht möglich. Folglich konnten auch keine Aussagen über die vermeintlichen *holo*-ACP getroffen werden.

Daher wurde versucht, durch Spaltung der Fusionsproteine in MBP und ACP und anschließender massenspektrometrischer Untersuchung bessere Aussagen über eine erfolgte Phosphopantetheinylierung treffen zu können. Kleinere Proteine lassen sich i. a. mit einer höheren Auflösung messen als größere, weshalb MALDI-TOF-MS mit den kleineren ACP ohne fusionierten Rest durchgeführt werden sollte. Die Ergebnisse sollten dann geringere Abweichungen haben. Dazu wurden die Elutionsfraktionen der Proteinexpressionen mit und ohne Coexpression der PPTase verwendet (Abb. 5.1 und 5.2) und eine Spaltung mit dem Faktor Xa durchgeführt (Abb. 5.3).

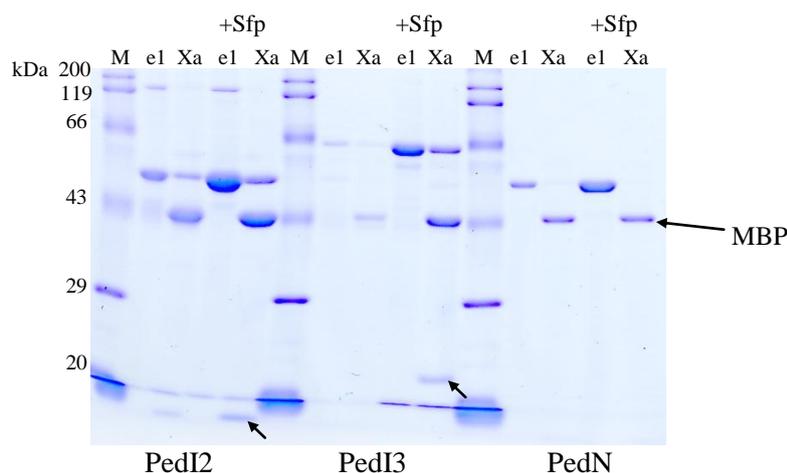


Abb. 5.3: Faktor-Xa-Spaltung der exprimierten ACP aus pMALc-2X.

Die pMALc-2X-Konstrukte pKZ81-1 (PedI2), pKZ59-4 (PedI3) und pKZ47-5 (PedN) wurden in *E. coli* ER2566 und *E. coli* ER2566 pREP4 *sfp* (+Sfp) exprimiert und aufgereinigt (s. Abb. 5.1 und 5.2). Von den Elutionsfraktionen (e1) wurden dann 100 μ l mit 2,5 μ l Faktor Xa (1 mg/ml) versetzt und 20,5 h bei Raumtemperatur inkubiert (6.13.1.2). Von den ursprünglichen Elutionsfraktionen (e1) und den mit Faktor Xa versetzten Lösungen (Xa) wurden jeweils 5 μ l mit 5 μ l 2x SDS-Ladepuffer bei 99 $^{\circ}$ C für 5 min gekocht und auf ein SDS-Gel (12% Trenngel) aufgetragen (6.13.4). M, Marker (RotiMark Standard)

In allen Fällen war die Spaltung des Fusionsproteins ersichtlich, jedoch in den meisten Fällen unvollständig. Die Spaltung nach der Aminosäuresequenz IEGR (Ile-Glu-Gly-Arg) ist zwar sehr spezifisch,¹⁰⁸ jedoch scheint sie häufig nicht vollständig

zu erfolgen.¹⁰⁹ In Abb. 5.3 deutlich erkennbar ist jeweils das MBP (Proteinmasse 42,5 kDa, Tab. 6.14), während die abgespaltenen ACP nicht immer zu sehen sind (Massen s. Tab 6.14). Durch die unvollständige Spaltung ist die Proteinkonzentration geringer als vorher. Dies wirkt sich stark auf das Auftreten der Bande im Proteingel vor allem auf kleinere Proteine aus. Da aber vor der Spaltung das Protein deutlich sichtbar war und die betrachteten ACP auf DNA-Ebene keine Xa-Erkennungssequenz aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass sich in der Mischung neben dem ungespaltenen Fusionsprotein und dem MBP auch das ACP befindet. Diese Mischungen wurden im Folgenden mittels MALDI-TOF-MS untersucht.

Bei einer massenanalytischen Untersuchung ist zu berücksichtigen, dass alle Substanzen ein Isotopenspektrum besitzen. Die mittels MALDI-MS gemessenen Peaks entsprechen dabei in etwa dem Maximum in der Isotopenverteilung. Bei kleineren Molekülen wirkt sich dies weniger deutlich auf die beobachteten Massen aus, da sich das Isotopenspektrum über eine geringere Massendifferenz erstreckt. Isotopenspektren kommen zustande, da für nahezu jedes Element in der Natur verschiedene Isotope existieren. Bei der Analyse eines Moleküls mittels MS muss folglich dieses auftretende Verteilungsmuster der Isotopen beachtet werden. Aus der Zusammensetzung eines Moleküls aus den einzelnen Atomarten kann ein Isotopenmuster theoretisch berechnet werden. Dazu existiert eine Vielzahl von Programmen, wobei in der vorliegenden Arbeit das Programm Compass benutzt wurde. Wasserstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff bestehen zu mehr als 99% aus nur einem Isotop, wodurch bei Peptiden mit einer kleinen Masse (< 5 kDa) in der Regel die monoisotopische Masse gemessen wird. Bei größeren Molekülen - wie alle hier betrachteten Proteine - ergibt sich das erwähnte Isotopenspektrum.¹¹⁰

Die Messungen brachten für PedI3 und PedN keine zufrieden stellenden Resultate (ohne Abb.). Es konnte zwar in allen Fällen das Signal für das MBP zugeordnet werden, aber entsprechend aussagekräftige Peaks für die ACP ließen sich in den Spektren nicht finden. Im Fall von PedI2 können die jeweiligen Massen im Spektrum gesehen werden (Abb. 5.4).

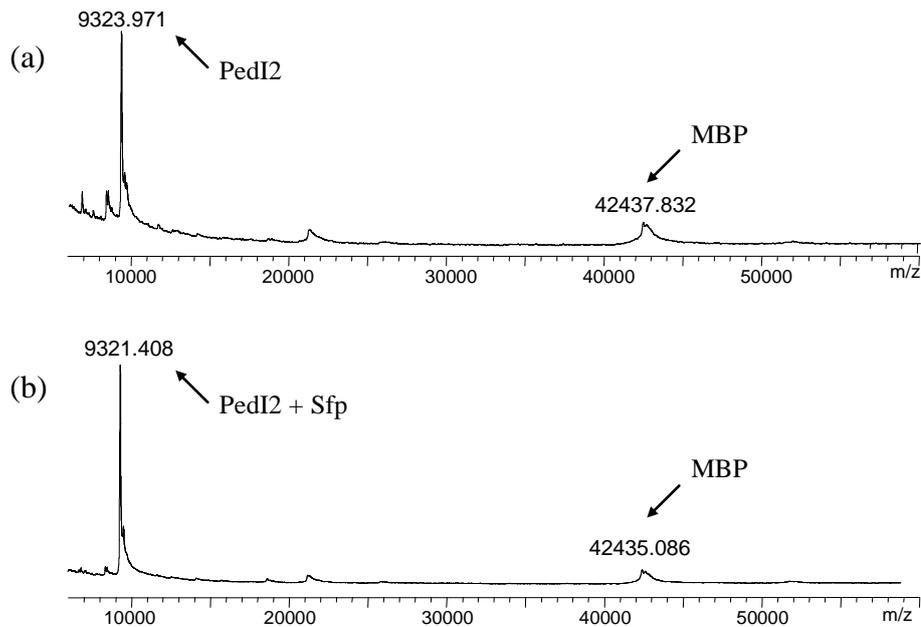


Abb. 5.4: MALDI-TOF-MS-Spektren von PedI2.

(a) MALDI-TOF-MS-Spektrum von PedI2 nach Xa-Spaltung

(b) MALDI-TOF-MS-Spektrum von PedI2 unter Sfp-Coexpression nach Xa-Spaltung

Nach Expression von pKZ81-1 (*pedI2* / pMAL-c2X) mit und ohne Coexpression der PPTase Sfp (Abb. 5.1 a und 5.2 a) wurde die Elutionsfraktion e1 mit Faktor Xa versetzt zur Spaltung des Fusionsproteins in MBP und PedI2 (Abb. 5.3). Die Mischung aus ungespaltenem Protein, MBP und ACP wurde mittels MALDI-TOF-MS untersucht (6.14.1, MPI Jena).

Bei den Peaks in Abb. 5.4 handelt es sich zum einen um das MBP und zum anderen um das abgespaltene ACP PedI2. Beim Vergleich der Massen mit der theoretisch zu erwartenden Größe (Tab. 6.14) zeigt sich für das MBP eine Übereinstimmung. Die Abweichung zum Maximum der Isotopenverteilung (Abb. A.1 a) ist jedoch recht groß, was auch bei PedI2 beobachtet werden kann. Das Maximum im errechneten Isotopenspektrum von PedI2 nach der Abspaltung vom Fusionsprotein liegt bei 9332,9 Da (Abb. A.1 b). Der gemessene Wert im MALDI-Spektrum (Abb. 5.4 a) beträgt 9323,97 Da. Es lässt sich folglich eine starke Abweichung erkennen, die trotz mehrerer Ansätze und Veränderung der Geräteparameter immer die gleiche Größenordnung aufwies und nicht behoben werden konnte. Die Messung wurde ebenfalls mit PedI2 unter Sfp-Coexpression durchgeführt, was theoretisch zur Bildung des *holo*-ACP führen sollte. Die exakte Masse (monoisotopische Masse) von *holo*-PedI2 nach Xa-Spaltung beträgt 9667,01 Da, das Maximum im Isotopenmuster (ohne Abb.) liegt bei 9672,027 Da. Die Masse in Abb. 5.4 b entspricht jedoch der des *apo*-ACP in Abb. 5.4 a. Trotz der vorher beobachteten großen Abweichung vom theoretischen Wert hätte die Differenz von etwa 339 Da ersichtlich sein müssen. Das

MBP zeigt in beiden Spektren eine ähnliche Masse, es lagen folglich gleiche Parameter vor. Auch wenn die Ursache der Messungenauigkeit nicht gefunden werden konnte, kann anhand der vorliegenden Daten eine Phosphopantetheinylierung ausgeschlossen werden. Es fand demnach keine Umsetzung des *apo*-ACP in seine aktive *holo*-Form statt. Da für PedI3 und PedN wie oben erwähnt keine aussagekräftigen Ergebnisse zur Verfügung stehen, muss davon ausgegangen werden, dass auch hier keine Phosphopantetheinylierung stattgefunden hat.

Zur Kontrolle, ob das *sfp*-Gen auch im genutzten Vektor pREP4 vorliegt, wurde eine PCR mit dem Plasmid entsprechend 6.6 durchgeführt unter Verwendung spezifischer *sfp*-Primer (Tab. 6.5). Das entsprechende Agarosegel zeigt ein deutliches Produkt, das der Größe von *sfp* von 946 bp entspricht (Abb. 5.5). Daraus lässt sich schließen, dass das Gen für die PPTase auf dem Vektor vorhanden ist.

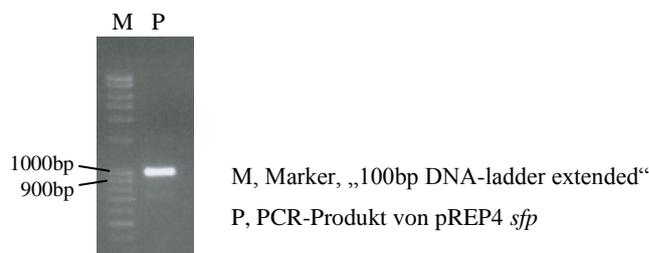


Abb. 5.5: PCR mit Vektor pREP4 *sfp*.

Mit dem Vektor pREP4 *sfp* wurde eine PCR nach 6.6 unter Verwendung der Primer für *sfp* (Tab. 6.5) durchgeführt und das PCR-Produkt auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (6.7).

Eine weitere Ursache der ausgebliebenen Phosphopantetheinylierung könnte in einer fehlenden Expression von Sfp liegen. Die ursprüngliche Klonierung des Gens erfolgte in den Vektor pREP4,¹¹¹ jedoch ohne die Möglichkeit der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Abb. 6.1). Dadurch ist es schlecht nachvollziehbar, ob eine Expression der PPTase stattgefunden hat. Zwar wurde eine Kultivierung durchgeführt, aber anhand der Proteinbanden auf dem SDS-PA-Gel lassen sich keine Aussagen treffen, ob Sfp produziert wurde oder nicht (ohne Abb.). Der Vektor pREP4 *sfp* wurde schon erfolgreich für Phosphopantetheinylierungen von Carrierproteinen aus NRPS und PKS verwendet.¹¹² Auch andere Veröffentlichungen zeigen, dass die PPTase Sfp aus *Bacillus subtilis* PCP bzw. ACP von NRPS und FAS in ihre *holo*-Form umsetzen kann. Dabei wurde auch festgestellt, dass sie effizient und unspezifisch zu sein scheint.¹⁰³ Ein ACP aus dem

pksX-Gencluster, das für die Bacillaen-Biosynthese verantwortlich ist,⁴⁴ wurde durch Sfp ebenfalls in die aktive Form überführt.⁹¹ Daher scheint die PPTase für viele Systeme geeignet zu sein.

Die Ursache der ausbleibenden Phosphopantetheinylierung kann folglich in der zu geringen oder gar nicht stattgefundenen Sfp-Expression oder im exprimierten ACP als MBP-Fusionsprotein selbst liegen. Das MBP mit 42,5 kDa (Tab. 6.14) ist bedeutend größer als beispielsweise PedI2 (9,3 kDa, Tab. 6.14). Daher kann es bei der Expression theoretisch zu Störungen in der korrekten Faltung der ACP durch das fusionierte MBP kommen. Die Phosphopantetheinylierung findet an einem konservierten Ser des ACP statt (Abb. 3.4). Für die post-translationale Modifikation muss gewährleistet sein, dass die PPTase diese Aminosäure auch erreichen und den Phosphopantetheinarm anfügen kann. Durch inkorrekte Faltung könnte dies verhindert werden. Auch in der Literatur wurde davon berichtet, dass durch das MBP das fusionierte Protein nicht in der nativen Form vorlag.¹¹³⁻¹¹⁵ Dem gegenüber steht jedoch die dokumentierte Verwendung des Vektors pMAL-c2X zur Expression von ACP mit anschließender erfolgreicher Phosphopantetheinylierung. Die dabei getesteten ACP stammten ebenfalls aus einer PKS.^{116, 117} Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ein MBP-Fusionsprotein erfolgreich in einem Enzym-Assay eingesetzt (5.6.1). Des Weiteren wurde auch berichtet, dass das MBP in manchen Fällen die korrekte Faltung sogar fördern kann.¹¹⁸ Folglich besteht die Möglichkeit, dass die exprimierten ACP funktionell vorliegen und die Ursache in einer zu geringen oder ausgebliebenen Sfp-Expression durch pREP4 *sfp* lag.

Eine Alternative ist die häufig in der Literatur genutzte *in vitro* Phosphopantetheinylierung der ACP. Dabei werden die *apo*-ACP nach ihrer Aufreinigung mit der ebenfalls exprimierten sauberen PPTase inkubiert und dadurch die *holo*-Proteine erzeugt.^{91, 116, 119} Das Plasmid pREP4 *sfp* trägt das entsprechende Gen (vgl. Abb. 5.5), eine Aufreinigung des Proteins durch Affinitätschromatographie besteht wie erwähnt jedoch nicht. Es existieren zwar andere Möglichkeiten der Reinigung wie zum Beispiel Gelpermeations-, hydrophobe Wechselwirkungs- oder Ionenaustauschchromatographie, aber es wurde zuerst nach einfacheren Varianten gesucht. Dabei kam das Vektorsystem pQE60 *sfp* pREP4 zum Einsatz. Die PPTase kann aus pQE60 *sfp* als C-terminales His₆-Fusionsprotein exprimiert werden, wobei

pREP4 hier als Helferplasmid dient.¹²⁰ Die Expression der PPTase war jedoch unter Verwendung verschiedener Kultivierungsparameter nicht erfolgreich (ohne Abb.). Da eine andere Alternative der Erzeugung der *holo*-ACP zur Verfügung stand (s. Abschnitt 5.1.4), wurden auch keine weiteren Versuche diesbezüglich unternommen.

5.1.4 His₈-Fusionsproteine aus pHIS8-3 / pHIS8-3 *svp*

Die Klonierung von Genen in die MCS von pHIS8-3 *svp* führt zur Expression von N-terminalen His₈-Fusionsproteinen unter Coexpression der PPTase Svp (s. 5.1). Die Proteinaufreinigung erfolgt auch hier über Affinitätschromatographie aufgrund der Ausbildung von Ni-Chelat-Komplexen an Ni-NTA-Agarose (vgl. 5.1.2). Da *svp* ebenfalls unter Kontrolle des T7-Promotors steht, werden beide Expressionen durch IPTG-Zugabe induziert. Folglich sollte das entstehende *apo*-ACP mit einem His₈-Tag durch die post-translationale Katalyse der PPTase Svp direkt zum *holo*-ACP umgesetzt werden. Das entstandene *holo*-ACP sollte sich dann aufreinigen lassen. Da der Vektor pHIS8-3 *svp* das PPTase-Gen in seiner *NotI*-Stelle enthält, ist das Ausschneiden von *svp* auf DNA-Ebene leicht möglich. Das so entstandene Plasmid pHIS8-3 kann dann zur Expression der *apo*-ACP als Kontrolle verwendet werden.

Für die Klonierung in den Vektor pHIS8-3 *svp* wurden die schon für 5.1.2 und 5.1.3 verwendeten TA-Konstrukte verwendet: für *pedI2* pKZ79-1, für *pedI3* pKZ57-1 und für *pedN* pKZ32 (Tab. 6.8). Diese wurden mit *BglIII* geschnitten und in den mit *BamHI* verdauten, dephosphorylierten Vektor ligiert (6.12.2). Da die Schnittstellen von *BglIII* und *BamHI* kompatibel sind, war dies möglich (6.12.2.4). Die Positivklone wurden mittels Kolonie-PCR gefunden (6.6) und durch Restriktionskontrolle mit *EcoRI* und *XbaI* bestätigt. Folgende pHIS8-3 *svp*-Konstrukte wurden für die weiteren Versuche verwendet: pKZ122-25 für *pedI2*, pKZ123-19 für *pedI3* und pKZ124-17 für *pedN* (Tab.6.9).

Zur Proteinexpression wurden die Plasmide in *E. coli* ER2566 bzw. BL21 DE3 transformiert und die Expression unter verschiedenen Bedingungen getestet. Eine Überexpression konnte jedoch lediglich für PedN festgestellt werden, während für PedI2 und PedI3 keine entsprechenden Proteinbanden vorhanden waren (ohne Abb.). Auch durch Nutzung eines größeren Proteingels (mit der vertikalen Elektrophoresekammer Protean II xi cell) konnte nur im Fall von PedN eine

deutliche Proteinbande erkannt werden. Durch Verwendung dieses Gelsystems sind auch kleinere, niedrig konzentrierte Proteine auf einem hochprozentigen SDS-Gel erkennbar. Das Testen anderer Positivklone führte ebenfalls zu dem gleichen Ergebnis (ohne Abb.).

Daraufhin wurde im Folgenden His-tag-Lysepuffer II verwendet (Tab. 6.10), der eine andere Zusammensetzung hat als der bis dahin genutzte Puffer. Die Elution erfolgte hierbei durch steigende Anteile an Imidazol im Lysepuffer II, von 30 mM bis 250 mM. Dadurch konnte die Proteinkonzentration für PedN deutlich erhöht werden, für PedI2 und PedI3 jedoch wiederum keine Überexpression festgestellt werden (Abb. 5.6).

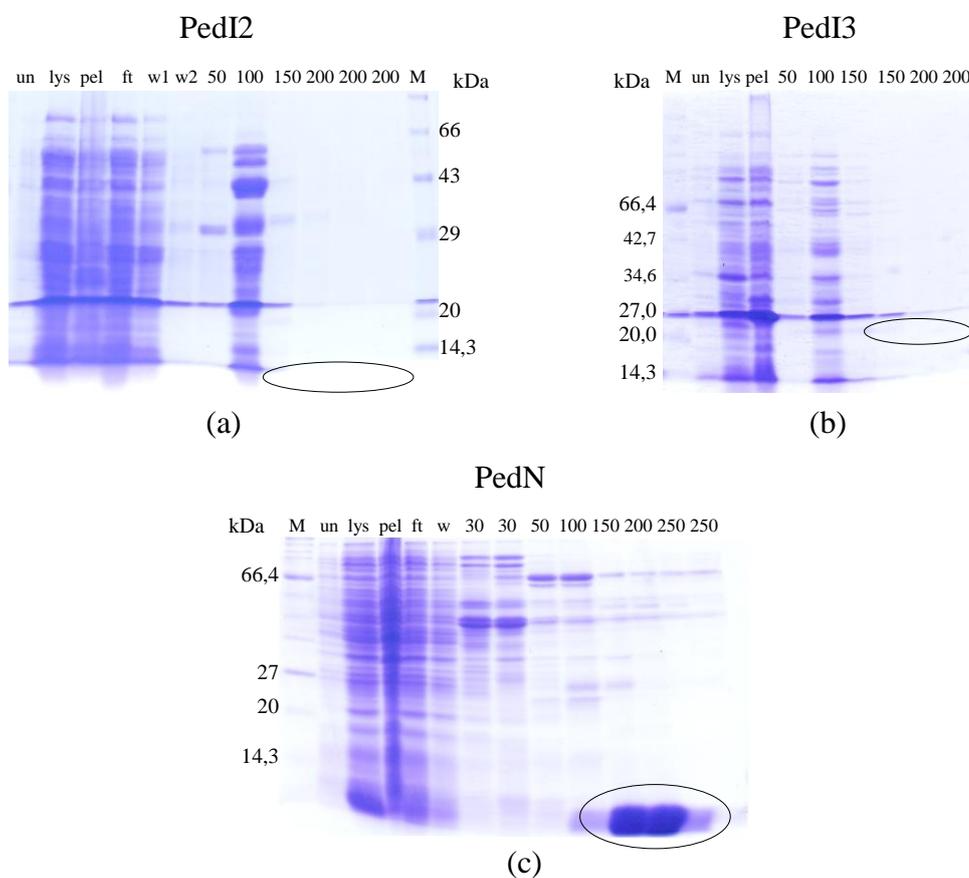


Abb. 5.6: Expression der ACP aus pHis8-3 *svp* in *E. coli* BL21 DE3.

(a) pKZ122-25 (*pedI2* / pHis8-3 *svp*) / *E. coli*: 500 ml LB Kn⁵⁰, 0,4 mM IPTG, RT, 26 h

(b) pKZ123-19 (*pedI3* / pHis8-3 *svp*) / *E. coli*: 1 l LB Kn⁵⁰, 0,4 mM IPTG, 16 °C, 70 h

(c) pKZ124-17 (*pedN* / pHis8-3 *svp*) / *E. coli*: 1 l LB Kn⁵⁰, 0,4 mM IPTG, 16 °C, 23 h

M, Marker (RotiMark Standard, Broad-Range); un, uninduzierte Kontrolle; lys, Probe von löslichen Überstand; pel, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w, Waschfraktion (Lysepuffer II); 30-250, Elutionsfraktion Lysepuffer II + 30-250 mM Imidazol; Expression nach 6.13; Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II; SDS-PAGE: 20% Trenngel (6.13.4)

Im Folgenden wurden diverse Versuche unternommen, auch für PedI2 und PedI3 eine Überexpression zu erhalten. Für PedI3 stellte sich der Expressionsstamm *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS als geeignet heraus (Abb. 5.7). Dieser *E. coli*-Stamm ist kommerziell erhältlich (Tab. 6.3) und dient der Expression von Proteinen. Wie die meisten Expressionsstämme kann er die Basalexpression von T7 RNA Polymerase unterdrücken, um eine Produktion des gewünschten Proteins erst durch IPTG-Zugabe zu gewährleisten. Zusätzlich enthält der Stamm noch Gene, die für seltene tRNA codieren und trägt die genetische Information für Enzyme, die die Bildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma bei heterologer Expression fördern. Für PedI2 führten jedoch weder *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS noch andere Expressionsstämme zum Erfolg. Auch zahlreiche Versuche unter Variation der Kultivierungsbedingungen und der Puffer zum Aufreinigen des Proteins zeigten keine Expression der ACP. Da trotz der vielen Tests kein Enzym erhalten werden konnte, wurden die Versuche für PedI2 hier eingestellt.

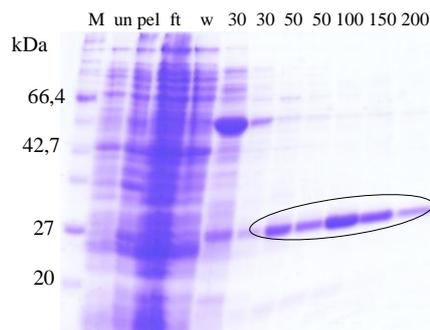


Abb. 5.7: Expression von PedI3 aus pHis8-3 *svp* in *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS.

pKZ123-19 (*pedI3* / pHis8-3 *svp*) / *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS
 1 l LB Kn⁵⁰ Tet^{12.5} Str⁵⁰ Cm³⁴, 0,4 mM IPTG, 16 °C, 24 h

M, Marker (Broad-Range); un, uninduzierte Kontrolle; pel, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w, Waschfraktion (Lysepuffer II); 30-200, Elutionsfraktion Lysepuffer II + 30-200 mM Imidazol; Expression nach 6.13; Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II; SDS-PAGE: 20% Trenngel (6.13.4)

Da für PedN und PedI3 nun putative *holo*-ACP zur Verfügung standen, sollte auch eine Expression der *apo*-ACP durchgeführt werden, um Vergleichsproben zu erhalten. Hierzu wurden die pHis8-3 *svp*-Konstrukte pKZ124-17 (*pedN*) und pKZ123-19 (*pedI3*) zur Entfernung des PPTase-Gens mit dem Restriktionsenzym *NotI* geschnitten. Die verdauten Vektoren wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und in *E. coli* XL1-Blue transformiert, um eine Religation zu erreichen (6.12.2). Dies ist durch *E. coli*-eigene Ligasen möglich, da

der Vektor zwei gleiche Überhang-Enden besitzt. Die so entstandenen Klone wurden mittels PCR (6.6) mit den entsprechenden Primern (Tab. 6.5) und Restriktion mit *NotI* kontrolliert. Für eine Expression der *apo*-ACP von PedN und PedI3 standen somit die Plasmide pKZ161-1 und pKZ176-1 (Tab. 6.9) zur Verfügung. Die Expression dieser erfolgte unter ähnlichen Bedingungen wie die der putativen *holo*-ACP. Für *apo*-PedN konnte dabei in etwa die gleiche Protein-konzentration erhalten werden, während die Expression von *apo*-PedI3 auch unter Änderung der Kultivierungsparameter jeweils geringe Enzymmengen lieferte (Abb. 5.8).

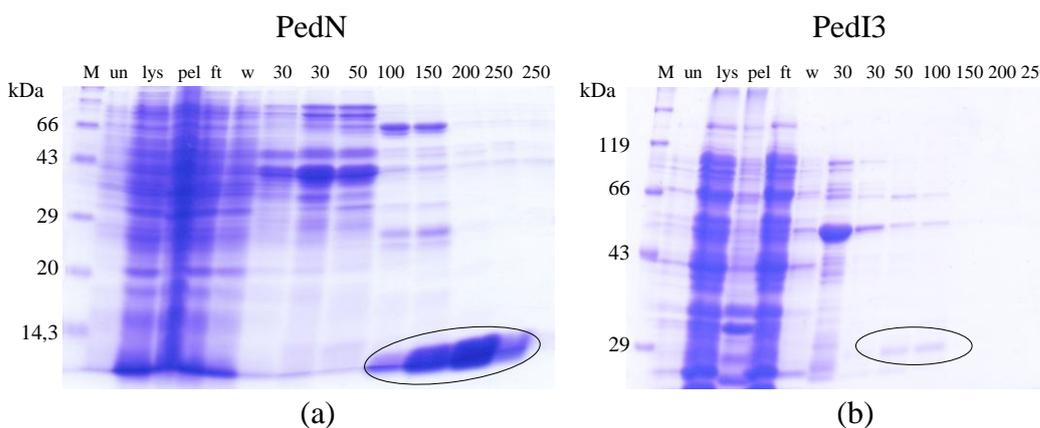


Abb. 5.8: Expression der ACP aus pHIS8-3.

(a) pKZ161-1 (*pedN* / pHIS8-3) / *E. coli* BL21 DE3

1 l LB Kn⁵⁰, 0,4 mM IPTG, 16 °C, 23 h

(b) pKZ176-1 (*pedI3* / pHIS8-3) / *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS

1 l LB Kn⁵⁰ Tet^{12,5} Str⁵⁰ Cm³⁴, 1 mM IPTG, 16 °C, 24 h

M, Marker (RotiMark Standard); un, uninduzierte Kontrolle; lys, Probe von löslichen Überstand; pel, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w, Waschfraktion (Lysepuffer II); 30-250, Elutionsfraktion Lysepuffer II + 30-250 mM Imidazol; Expression nach 6.13; Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II; SDS-PAGE: (a) 20% Trenngel; (b) 12% Trenngel (6.13.4)

Im Folgenden sollten die exprimierten Proteine massenspektrometrisch untersucht werden (6.14.1 bis 6.14.3). Dabei wurde als erstes die Untersuchung mittels MALDI-TOF-TOF-MS angestrebt. Zu Beginn erfolgte die Messung mit PedN, wobei die Proben mittels Vivaspin- und ZipTip-Entsalzung (6.14.1) präpariert und gemessen wurden. Die erhaltenen Spektren zeigten jedoch sehr ungenaue Werte (ohne Abb.). Im Anschluss wurde eine andere Methode getestet, indem die Proben unbehandelt auf die Matrix (HCCA) gegeben und mit TFA gewaschen wurden. Diese einfachere Methode stellte sich letztendlich auch als die geeignetere heraus, da hierbei sowohl für *apo*-PedN als auch für das putative *holo*-PedN Spektren erhalten werden konnten (Abb. 5.9).

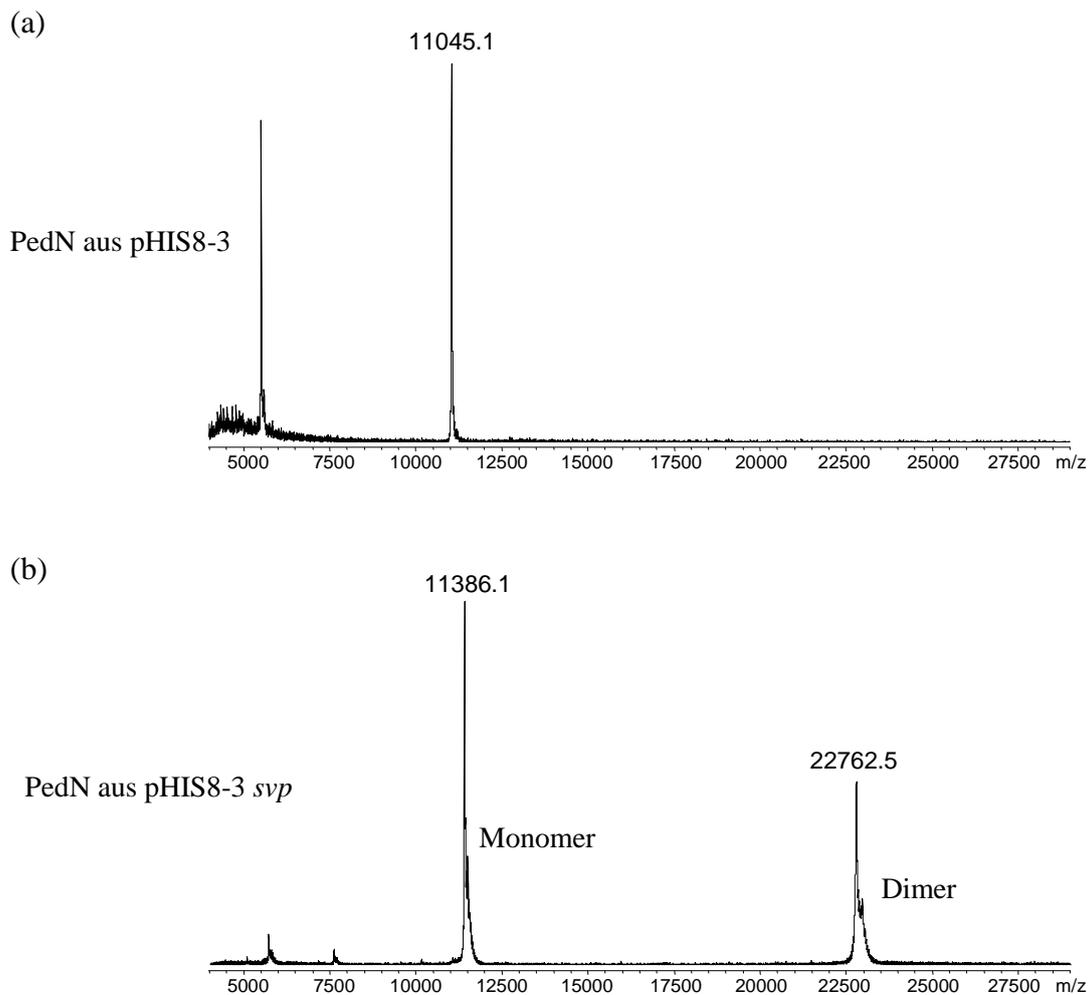


Abb. 5.9: MALDI-TOF-TOF-MS-Spektren von PedN.

(a) Elutionsfraktion aus Expression von pKZ161-1 (*pedN* / pHIS8-3)

(b) Elutionsfraktion aus Expression von pKZ124-17 (*pedN* / pHIS8-3 *svp*)

Die Elutionsfraktionen aus der Proteinexpression der Plasmide in *E. coli* BL21 DE3 mit dem höchsten Gehalt an gewünschtem Protein wurden auf die HCCA-Matrix aufgegeben und mit TFA gewaschen, anschließend eine MALDI-TOF-TOF-MS durchgeführt (6.14.1). Die Expression erfolgte nach 6.13 jeweils bei folgenden Bedingungen: 1 l LB Kn⁵⁰, 0,4 mM IPTG, RT, 26,5 h, die Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II. Für die Messung wurden jeweils die Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol verwendet.

Unter Berücksichtigung der entsprechenden Isotopenspektren (Abb. A.2 a, b und c) zeigten die MALDI-Spektren eine Expression von PedN als *apo*-ACP (Abb. 5.9 a) bzw. als *holo*-ACP (Abb. 5.9 b). Dabei entspricht die gemessene Masse in etwa dem Maximum in der Isotopenverteilung. Bei *holo*-PedN kann zusätzlich im Spektrum das Signal für das Dimer erkannt werden. Damit wurde gezeigt, dass die PPTase Svp in der Lage ist, die Phosphopantetheinylierung von PedN zu katalysieren. Svp wurde auch schon erfolgreich für die Phosphopantetheinylierung von ACP aus dem Leinamycin-Gencluster eingesetzt, das wie Pederin **23** ein modularer *trans*-AT Typ-I-PKS/NRPS-Hybrid ist.¹²¹

Entsprechende Versuche, MALDI-Spektren auch von PedI3 aufzunehmen, schlugen jedoch fehl. Aus nicht geklärter Ursache zeigte sich bei den Messungen kein Signal, so dass zur Bestätigung der erforderlichen Phosphopantetheinylierung eine andere Methode gewählt werden musste.

Dies sollte mittels ESI-FT-ICR-MS erfolgen, wozu jedoch vorher eine Entsalzung der zu messenden Proteinprobe erforderlich ist. Eine hierfür sinnvolle Variante ist die HPLC, die auch schon erfolgreich für die Detektion von ACP angewendet werden konnte.¹²² Zum Testen der Methode wurde PedN genutzt, wobei mit den Elutionsfraktionen aus den Expressionen von *apo-* bzw. *holo-*PedN ein HPLC-Lauf durchgeführt wurde. Die Proteinkonzentrationen der gesammelten Fraktionen wurden dabei mit Amidoschwarz bestimmt und jeweils eine Probe mit SDS-PAGE untersucht. In Abb. 5.10 sind die Ergebnisse des HPLC-Laufes und der Bestimmung der Proteinkonzentration dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Fraktionen mit der stärksten UV-Absorption (bei 254 nm) auch die größten Proteinmengen enthalten. Sie haben eine Retentionszeit von 29-30 min und entsprechen der Größe von PedN auf dem SDS-Polyacrylamidgel (ohne Abb.).

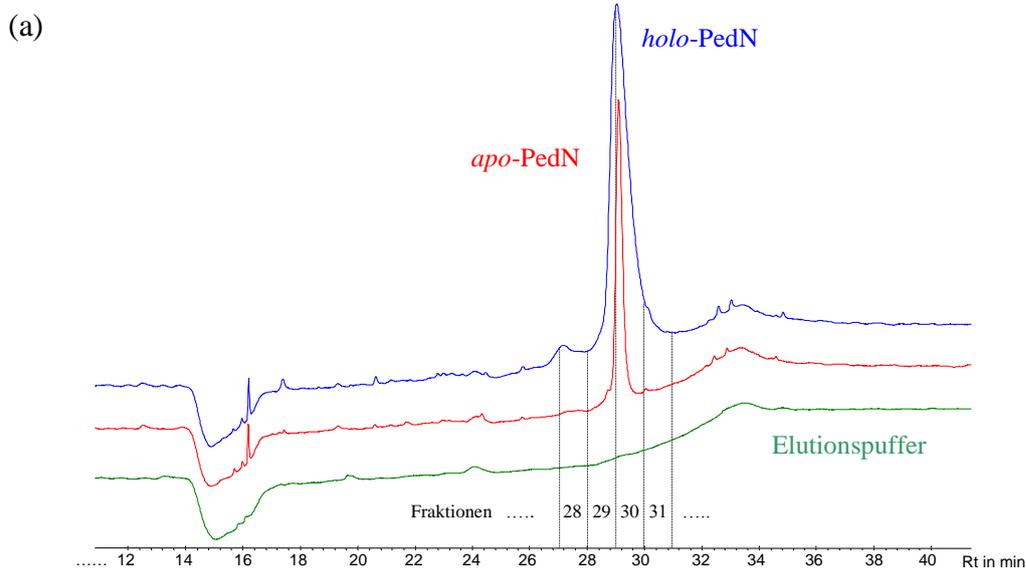


Abb. 5.10 a: HPLC-Lauf von *apo*-PedN, *holo*-PedN und Elutionspuffer.

holo-PedN: Expression von pKZ124-17 (*pedN* / pHis8-3 *svp*)

apo-PedN: Expression von pKZ161-1 (*pedN* / pHis8-3)

Elutionspuffer: Lysepuffer II + 150 mM Imidazol

Legende s. Abb. 5.10 b

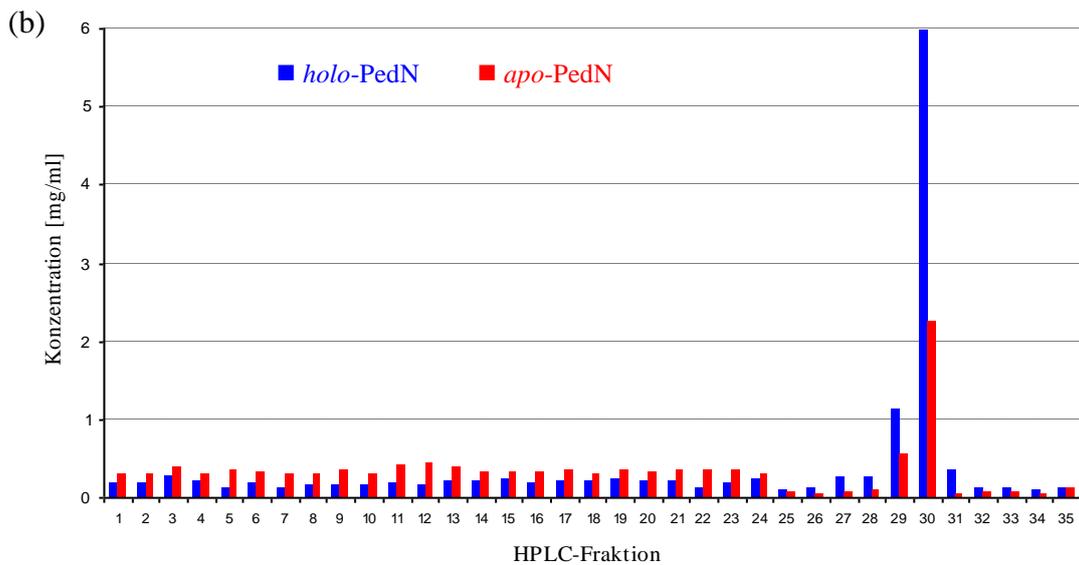


Abb. 5.10 b: Proteinkonzentration der HPLC-Fractionen von *apo*- und *holo*-PedN.

holo-PedN: Expression von pKZ124-17 (*pedN* / pHis8-3 *svp*)

apo-PedN: Expression von pKZ161-1 (*pedN* / pHis8-3)

Die Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol aus der Proteinexpression der Plasmide in *E. coli* BL21 DE3 wurden mittels HPLC gemessen (6.14.2). Die Expression erfolgte nach 6.13 jeweils bei folgenden Bedingungen: 1 l LB Kn⁵⁰, 0,4 mM IPTG, RT, 26,5 h, die Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II. Die gesammelten Fraktionen wurden entsprechend 6.14.2 eingedampft und jeweils die Proteinkonzentration mit Amidoschwarz nach 6.15 gemessen. Rt, Retentionszeit

Die entsprechenden Fraktionen wurden anschließend mit Acetonitril und TFA versetzt und mittels ESI-FT-ICR-MS gemessen. Die erhaltenen Spektren sind in Abb. 5.11 dargestellt. Durch Vergleich mit den theoretischen Isotopenspektren (Abb. A.2 a und c) zeigt sich wieder eindeutig die Expression als *apo*- bzw. *holo*-PedN. Interessanterweise konnte *holo*-PedN in dem dargestellten Versuch nur als dimeres Molekül detektiert werden, während in dem entsprechenden MALDI-MS-Spektrum (Abb. 5.9 b) sowohl Monomer als auch Dimer vorkommen. Bei weiteren Experimenten zur ESI-FT-ICR-MS der HPLC-Fractionen konnten jedoch wieder beide Formen detektiert werden. Untersuchungen bezüglich der Ursache wurden nicht durchgeführt, da die Messungen nur zur Überprüfung der erfolgten Phosphopantetheinylierung dienen sollten, was sowohl durch die Masse des auftretenden Monomers als auch des Dimers bestätigt wird. Möglicherweise ist die Aufarbeitungsart eine Ursache für das Auftreten des Dimers. Es handelt sich dabei nicht um ein Dimer, das sich durch die Bindung von zwei Thiolgruppen am Phosphopantetheinende zweier *holo*-PedN-Moleküle ergibt, sondern um genau die doppelte Masse. Dies kann durch Vergleich mit den relevanten Isotopenspektren erkannt werden (Abb. A.2 c bzw. ohne Abb.). Solche Dimere traten beispielsweise

auch bei MALDI-Messungen von ACP aus *Pseudomonas aeruginosa* auf, während sie auf nativen Gelen nicht beobachtet werden konnten.¹⁰⁵ In den vorliegenden Experimenten wurden zwar keine nativen Proteingele angefertigt, aber auch auf allen SDS-Gelen konnte kein Dimer gesehen werden. Folglich scheint es sich tatsächlich um ein Phänomen zu handeln, das durch Entsalzen, Aufkonzentrieren oder Versetzen mit Lösungsmittel auftritt. Interessanterweise treten diese Dimere lediglich in Spektren von *holo*-PedN auf, während bei *apo*-PedN immer nur das Monomer vorliegt. Möglicherweise haben die Thiolgruppen doch einen Einfluss, da der Phosphopantetheinarm der einzige Unterschied zwischen *apo*- und *holo*-Form ist. Die Neigung, während der MS-Probenvorbereitung Dimere zu bilden, wird anscheinend durch den Phosphopantetheinarm verstärkt.

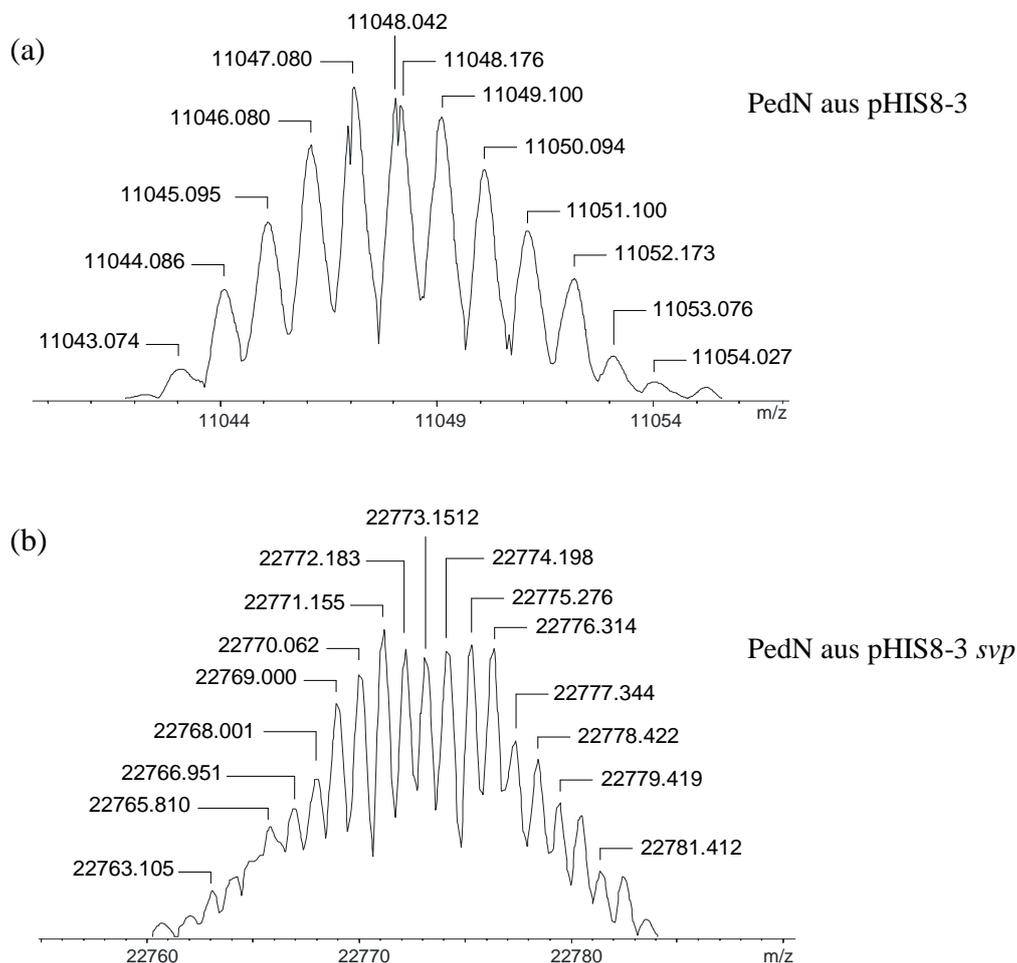


Abb. 5.11: ESI-FT-ICR-MS-Spektren von PedN nach HPLC-Lauf.

(a) Spektrum der HPLC-Fraktion nach Expression von pKZ161-1 (*pedN* / pHIS8-3)

(b) Spektrum der HPLC-Fraktion nach Expression von pKZ124-17 (*pedN* / pHIS8-3 svp)

Die Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol aus der Proteinexpression der Plasmide in *E. coli* BL21 DE3 wurden mittels HPLC nach 6.14.2 gemessen. Für die ESI-FT-ICR-MS wurde jeweils die Fraktion der 30. Minute aus dem HPLC-Lauf in Abb. 5.10 b verwendet. Expressionsbedingungen: s. Legende Abb. 5.10 b

Da die Nutzung der HPLC eine geeignete Methode zur Probenvorbereitung für ESI-FT-ICR-MS darzustellen scheint, wurde dies auch mit PedI3 unter denselben Bedingungen durchgeführt. Allerdings zeigte sich hier wiedererwartend kein Peak im UV-Spektrum. Daher wurde durch Variation des HPLC-Gradienten, der Laufmittel (Acetonitril, Methanol, Isopropanol) und der verwendeten Säule (C18, C8) versucht, einen Peak, der dem enthaltenen Protein entspricht, zu finden. Dies war aber erfolglos.

Um ein Isotopenspektrum von PedI3 zu erhalten, wurde dann eine neue Entsalzungsmethode getestet, die letztendlich zum Erfolg führte. Verwendung fanden hierbei die Zentrifugaleinheiten Vivaspin 500 mit unterschiedlichen MWCO (Molekulargewicht-Ausschlussgrenze), je nach Größe des jeweiligen Proteins (6.14.3). Die vertikale Membran der Gefäße ermöglicht durch einfaches Zentrifugieren eine Entsalzung und gleichzeitig eine Aufkonzentrierung der Probe. Die so vorbereiteten Proteine konnten dann nach Acetonitril- und TFA-Zugabe mittels ESI-FT-ICR-MS untersucht werden. Dies erfolgte sowohl für *holo*-, und *apo*-PedN als auch für das putative *holo*-PedI3. Aufgrund der bereits erwähnten geringen Konzentration des *apo*-Proteins von PedI3 (Abb. 5.8 b) war hier eine Messung trotz einiger Versuche nicht erfolgreich. Für *apo*-PedN ergaben sich dieselben Resultate, die schon vorher erzielt wurden (ohne Abb.), im Fall von *holo*-PedN wurden sowohl das monomere als auch das dimere Molekül detektiert (Abb. 5.12).

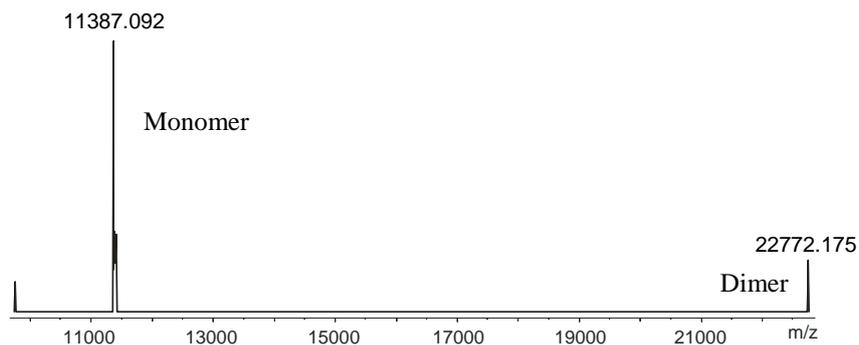


Abb. 5.12: ESI-FT-ICR-MS-Spektrum von *holo*-PedN nach Vivaspin-Entsalzung.

100 μ l der Elutionsfraktion mit 200 mM Imidazol aus der Expression von pKZ124-17 (*pedN* / pHIS8-3 *svp*) in *E. coli* BL21 DE3 wurde mittels Vivaspin 500, MWCO 5000 entsprechend 6.14.3 entsalzt, mit Acetonitril und TFA versetzt und mittels ESI-FT-ICR-MS gemessen. Die Expression erfolgte nach 6.13 bei folgenden Bedingungen: 1 l LB Kn⁵⁰, 0,4 mM IPTG, 16 °C, 23 h, die Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II. Dargestellt ist ein Übersichtsspektrum; durch Vergrößern des interessierenden Ausschnitts können die schon ermittelten Isotopenauflösungen gesehen werden.

Für das putative *holo*-PedI3 konnte nach Vivaspin-Entsalzung ebenfalls ein isotopenaufgelöstes Massenspektrum aufgenommen werden (Abb. 5.13).

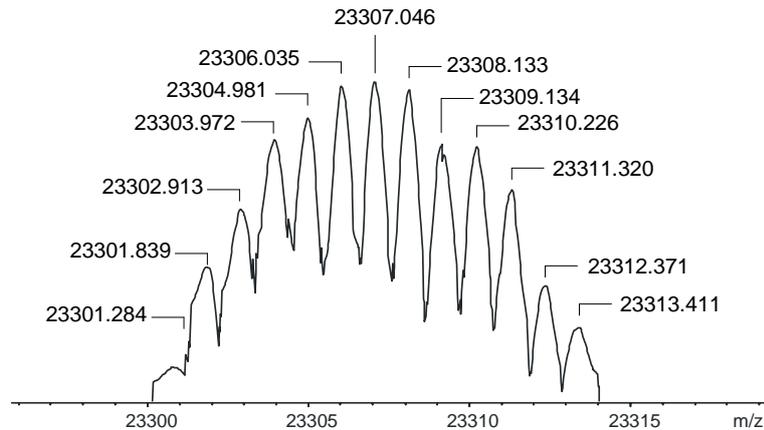


Abb. 5.13: ESI-FT-ICR-MS-Spektrum von PedI3 nach Vivaspin-Entsalzung.

200 μ l der Elutionsfraktion mit 100 mM Imidazol aus der Expression von pKZ123-19 (*pedI3* / pHis8-3 *svp*) in *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS wurden mittels Vivaspin 500, MWCO 10000 entsprechend 6.14.3 entsalzt, mit Acetonitril und TFA versetzt und mittels ESI-FT-ICR-MS gemessen. Die Expression erfolgte nach 6.13 bei folgenden Bedingungen: 1 l LB Kn⁵⁰ Tet^{12,5} Str⁵⁰ Cm³⁴, 0,4 mM IPTG, 16 °C, 24 h, die Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II.

Das Spektrum in Abb. 5.13 zeigt bei Vergleich mit dem theoretischen Isotopenspektrum (Abb. A.2 d) eindeutig, dass eine Phosphopantetheinylierung stattgefunden haben muss. Da es sich bei PedI3 um eine Doppel-ACP (s. 5.1) handelt, war davon auszugehen, dass das Protein auch zweimal mit einem Phosphopantetheinarm versehen wird. Dies bedeutet eine Massendifferenz zwischen *apo*- und *holo*-Form von 678,156 Da und ergibt für *holo*-PedI3 somit eine exakte (monoisotopische) Masse von 23293,793 Da (Tab. 6.15) bzw. ein Maximum in der Isotopenverteilung von 23307,82 Da (Abb. A.2). Dies korreliert mit dem Spektrum in Abb. 5.13.

Die PPTase Svp ist wie erwartet auch in der Lage, *apo*-PedI3 in seine aktive *holo*-Form umzusetzen. Interessanterweise konnte für *holo*-PedI3 kein Dimer gefunden werden. PedN hingegen trat in seiner *holo*-Form in den Massenspektren wie bereits erwähnt als Monomer und Dimer auf. Durch Vergleich mit *apo*-PedN, das immer nur in der monomeren Form detektiert werden konnte, wurde die Ursache in dem anhängenden Phosphopantetheinarm vermutet. Bei der Doppel-ACP *holo*-PedI3 könnten die beiden Thiolgruppen am Ende intramolekular in Wechselwirkung treten und sich daher keine Dimere aus zwei Molekülen bilden. Dies würde sich mit den

Beobachtungen und Vermutungen decken. In der Literatur wurden keine entsprechenden Daten über das Verhalten einer Doppel-ACP als überexprimiertes Enzym dokumentiert, daher kann an dieser Stelle nur spekuliert werden.

Wie oben erwähnt, fand am Ende der Arbeit noch die Klonierung und Untersuchung von *pedGNAT-ACP* statt. Dafür wurde das Gen mittels PCR (6.6) vom entsprechenden Cosmid (Tab. 6.1) mit den spezifischen Primern (Tab. 6.5) amplifiziert, aufgereinigt und eine TA-Klonierung durchgeführt (6.12.1). Nach der Sequenzierung des Positivklons (pKZ196-1, Tab. 6.8) wurde das Gen in die Schnittstellen *Bam*HI und *Hind*III des Expressionsvektors pHIS8-3 *svp* ligiert (6.12.2). Die resultierenden Klone wurden durch Restriktion und PCR kontrolliert. Mit dem korrekten Konstrukt pKZ201-8 (Tab. 6.9) schloss sich im Folgenden eine Proteinexpression und Aufreinigung des Enzyms an (Abb. 5.14).

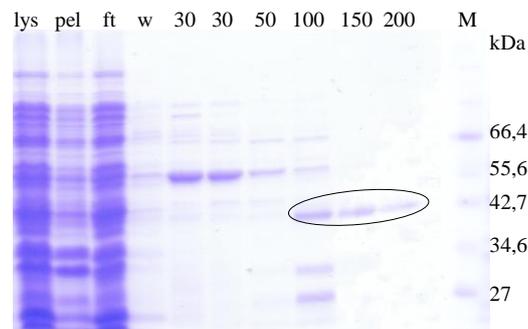


Abb. 5.14: Expression von PedGNAT-ACP aus pHIS8-3 *svp*.

pKZ201-8 (*pedGNAT-ACP* / pHIS8-3 *svp*) / *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS:
 1 l LB Kn⁵⁰ Tet^{12,5} Str⁵⁰ Cm³⁴, 1 mM IPTG, 16 °C, 25,5 h

M, Marker (Broad-Range); lys, Probe von löslichen Überstand; pel, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w, Waschfraktion (Lysepuffer II); 30-200, Elutionsfraktion Lysepuffer II + 30-200 mM Imidazol; Expression entsprechend 6.13; Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II; SDS-PAGE: 12% Trenngel (6.13.4)

Die Kultivierungsbedingungen sollten für PedGNAT-ACP noch optimiert werden, da die Enzymkonzentration relativ gering ist. Versuche, eine ESI-FT-ICR-Messung mit dem entsalzten Protein durchzuführen, scheiterten wie bei *apo*-PedI3 bisher. Für weitere Experimente muss aber sichergestellt sein, dass es sich tatsächlich um das *holo*-ACP handelt. Daher sollte die Proteinkonzentration erhöht werden, um eine Massenbestimmung durchführen zu können. Zum Vergleich sollte auch für *pedGNAT-ACP* die Expression aus pHIS8-3 als *apo*-Protein durchgeführt werden. Hierzu wurde pKZ201-8 mit *Not*I geschnitten und der gereinigte Vektor religiert (6.12.2). Der Positivklon pKZ202-1 (Tab. 6.9) wurde durch Restriktionskontrolle

und PCR identifiziert. Die Proteinexpression erfolgte in *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS unter denselben Bedingungen wie für PedGNAT-ACP aus pHIS8-3 *svp* (Abb. 5.14). Bisher führte dies jedoch nicht zum gewünschten Resultat (ohne Abb.), für zukünftige Experimente sollten daher die Kultivierungsparameter variiert werden, um das *apo*-Enzym herzustellen.

5.2 Expression der AT-Domänen

Im *ped*-Gencluster (Abb. 3.16) kommen zwei *in trans* agierende AT vor (PedC und PedD). Daher sollte getestet werden, ob bei den beiden AT eine Substrat- oder ACP-Spezifität vorliegt. Dafür wurden die AT exprimiert und in Enzym-Assays mit jeweils verschiedenen Substraten und ACP eingesetzt.

5.2.1 AT PedC

Für die Erzeugung der AT PedC lag zu Beginn der Arbeit bereits das pMAL-c2X-Konstrukt pH66 von Hong Chang vor (Tab. 6.9). Die Proteinherstellung in *E. coli* ER2566 bzw. *E. coli* BL21 DE3 zeigte jeweils eine Überexpression der AT (Abb. 5.15). Der Großteil des gewünschten Proteins befand sich jedoch im Pellet. Folglich aggregiert das Protein zu unlöslichen sogenannten inclusion bodies. Dies tritt häufig bei High-Level-Expressionen in *E. coli* auf¹²³ und konnte auch bei vielen hier durchgeführten Versuchen beobachtet werden (vgl. beispielsweise Abb. 5.1 oder 5.16). Durch Änderung der Kultivierungsbedingungen kann aber oft die Enzymmenge im Überstand erhöht werden, was auch in diesem Fall gelang. Die Reduktion der Temperatur während der Expression hat dabei häufig einen positiven Einfluss auf die Verfügbarkeit von löslichem Protein.¹¹⁸

Die zweite AT aus dem *ped*-Gencluster (PedD, 5.2.2) wurde letztendlich als His₈-Fusionsprotein erfolgreich exprimiert. Da die Enzym-Assays mit beiden Proteinen durchgeführt werden sollten, erschien es sinnvoll, auch PedC als His₈-Fusionsprotein zu exprimieren, um einen besseren Vergleich der Resultate zu erzielen. Durch die Größe des MBP (42,5 kDa, Tab. 6.14) kann sich dieses störend auf die korrekte Faltung des gewünschten Proteins auswirken. Negativergebnisse aus Enzym-Assays können somit zum einen die Ursache darin haben, dass das Protein keine Wirkung

zeigt oder dass aufgrund des MBP die Faltung nicht korrekt ist und damit katalytische Zentren nicht richtig agieren können. Diese Möglichkeit ist auch bei der Auswertung von Ergebnissen in Betracht zu ziehen, muss aber nicht zutreffen (s. Ausführungen unter 5.1.3). Für *in vitro*-Versuche werden zudem fast immer His-Fusionsproteine verwendet, die anschließend in Enzym-Assays erfolgreich eingesetzt wurden.^{91, 122, 124, 125}

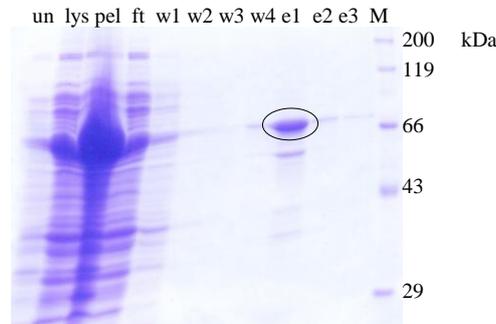


Abb. 5.15: Expression von PedC aus pMAL-c2X.

pH66 (*pedC*/pMAL-c2X) / *E. coli* BL21 DE3: 500 ml RM Amp¹⁰⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 22 h
M, Marker (RotiMark Standard); un, uninduzierte Kontrolle; lys, Probe von löslichen Überstand; pel, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w1 - w4, Waschfraktionen 1-4; e1 - e3, Elutionsfraktionen 1-3; Expression entsprechend 6.13; Aufreinigung entsprechend 6.13.1.1; SDS-PAGE: 12% Trenngel (6.13.4)

Die Klonierung von *pedC* erfolgte ursprünglich in die *Bam*HI-Seite von pMAL-c2X, indem das entsprechende TA-Konstrukt mit *Bg*III geschnitten und in den Expressionsvektor ligiert wurde. Dies ist aufgrund der Kompatibilität der Schnittstellen möglich (6.12.2.4). Ein Ausschneiden des Gens aus dem pMAL-c2X-Konstrukt ist so aber nicht mehr möglich. Da das verwendete TA-Konstrukt nicht mehr zur Verfügung stand, musste das Biosynthesegen für eine Klonierung in pHIS8-3 mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen neu amplifiziert werden. Hierzu wurde eine PCR (6.6) mit dem entsprechenden Cosmid (Tab. 6.1) und den spezifischen Primern für *pedC* (Tab. 6.5) durchgeführt. Nach TA-Klonierung und Sequenzierung (6.12.1) fand der entsprechende Positivklon für die Klonierung in den Expressionsvektor Verwendung. Als erstes erfolgte die Ligation nach 6.12.2 in pHIS8-3 zwischen die *Bam*HI- und *Sal*I-Seite unter Verwendung des TA-Konstrukts pKZ188-3 (Tab. 6.8), das mit *Bg*III und *Sal*I verdaut wurde. Der durch Restriktionskontrolle gefundene Positivklon war pKZ191-1 (Tab. 6.9). Ein weiterer Versuch war die Ligation zwischen die *Xma*I- und die *Sac*I-Stelle von pET52b(+) unter Nutzung des TA-Konstrukts pKZ195-1 (Tab. 6.8), was zum Positivklon

pKZ200-3 (Tab. 6.9) führte. Bei Verwendung des Expressionsvektors pET52b(+) enthält das exprimierte Protein einen N-terminalen His₁₀-tag und einen C-terminalen Streptag. Das Gen musste folglich ohne Start- und Stopcodon amplifiziert werden, um an beiden Enden einen fusionierten Rest für die Affinitätschromatographie zu erhalten (s. *pedC*-Primer für pET52b(+), Tab.6.5).

Die Expression des in pHIS8-3 klonierten Gens wurde unter verschiedenen Bedingungen in unterschiedlichen Expressionsstämmen durchgeführt (ohne Abb.). Jeder Versuch führte aber zu einer Überexpression von PedC als unlösliches Protein. Auch unter Verwendung von Chaperon-Plasmiden änderte sich dies nicht (ohne Abb.). Chaperone sind Proteine, die bei der korrekten Faltung des Proteins helfen können, jedoch muss die Wahl eines geeigneten Chaperons für jedes Protein individuell getestet werden. Die Verwendung der Chaperon-Plasmide pGro7, pTf16, pTf2 und pKJE7 (Tab. 6.2) entsprechend 6.13 führte allerdings nicht zu einer Überexpression von löslichem PedC. Auch die Nutzung von „Overnight Express Instant TB-Medium“ änderte das Ergebnis nicht (ohne Abb.). TB-Medium ist ein kommerziell erhältliches Autoinduktionsmedium, bei dem eine Zugabe von IPTG zum Initiieren der Expression nicht nötig ist. Das Medium enthält verschiedene Komponenten, die während der Fermentation unterschiedlich metabolisiert werden. Damit soll eine hohe Proteinausbeute erreicht werden, wobei gleichzeitig die *lac*-Promotor gesteuerte Expression induziert wird. Das Medium konnte schon erfolgreich zur Expression einer AT aus einer Typ-II-PKS eingesetzt werden, wobei dabei die Menge und Löslichkeit des Enzyms gesteigert werden konnte.¹²⁶ Im Fall von PedC zeigte es jedoch keine Wirkung. Das MBP scheint einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit von PedC zu haben, da es als MBP-Fusionsprotein löslich war. Diese Steigerung der Enzymmenge im Überstand durch Fusion mit dem MBP wurde auch schon in der Literatur herausgestellt.¹¹⁸

Daraufhin erfolgte die Proteinexpression von PedC aus pET52b(+) mit einer anschließenden Reinigung als His₁₀-Fusionsprotein über Ni-NTA-Harz. Allerdings konnte auch nach mehreren Versuchen weder eine Expression als lösliches Protein, noch als unlösliche inclusion bodies beobachtet werden. Weitere Versuche diesbezüglich, auch die Aufreinigung als Streptagfusionsprotein, wurden an dieser Stelle aus Zeitgründen nicht unternommen.

5.2.2 AT PedD

Für die zweite, im *ped*-Cluster vorkommende AT-Domäne *pedD* wurde zu Beginn der Arbeit das von Hong Chang konstruierte Plasmid pH2 (Tab. 6.8) verwendet. Dieses wurde mit *Bgl*III geschnitten und das Gen in die *Bgl*III-Seite von Vektor pRSETB ligiert (pKZ28-3, Tab. 6.9). Zahlreiche Versuche der Expression schlugen fehl (ohne Abb.), so dass das Biosynthesegen aus pH2 für eine Klonierung in die *Bam*HI-Seite von pMAL-c2X verwendet wurde (nach 6.12.2). Der entsprechende Positivklon (pKZ43-14, Tab. 6.9) zeigte in der Proteinherstellung das Enzym in der korrekten Größe (83,3 kDa, Tab. 6.14). In den Elutionsfraktionen befand sich daneben jedoch noch ein weiteres Protein bei etwa 45 kDa, das schon nach kurzer Expressionszeit vorlag (ohne Abb.). In anderen Versuchen mit pMAL-c2X-Konstrukten konnte dies nicht beobachtet werden. Auch häufigere Waschschriffe, andere Kultivierungsbedingungen oder Expressionsstämme zeigten keine Änderung. Es bestand daher die Vermutung, dass eine Protease während der Expression das entstehende MBP-Fusionsprotein spaltet. Dies konnte aber nicht bestätigt werden, da das Phänomen auch unter Zugabe des Proteaseinhibitors PMSF auftrat. Dabei muss berücksichtigt werden, dass PMSF ein Inhibitor für Serin-Proteasen ist, andere folglich nicht gehemmt werden.¹²⁷ Aufgrund des eigenartigen Verhaltens wurde diese Expression nicht weiter verfolgt. Das Gen wurde daher mit *Bam*HI aus pH2 ausgeschnitten und in die *Bam*HI-Seite von pHIS8-3 kloniert. Die Expression des so erzeugten Konstrukts pKZ175-44 (Tab. 6.9) zeigte jedoch auch unter diversen Kultivierungsbedingungen keine Überexpression der AT (ohne Abb.).

Aufgrund der diversen Probleme wurde ein neues TA-Konstrukt erzeugt (6.12.1). Dies erfolgte nach Amplifizierung des Gens mittels PCR (6.6) mit dem entsprechenden Cosmid (Tab. 6.1) und den spezifischen Primern für *pedD* (Tab. 6.5). Der Positivklon pKZ177-10 (Tab. 6.8) wurde im Anschluss mit *Eco*RI und *Hind*III verdaut und in dieselben Schnittstellen von pHIS8-3 ligiert. Die erhaltenen Klone wurden mittels Restriktionskontrolle überprüft und der Positivklon pKZ178-1 (Tab. 6.9) für eine Proteinexpression in *E. coli* BL21 DE3 und in *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS verwendet. Bei beiden erfolgte eine Überexpression der AT, wobei die Proteinmenge in *E. coli* BL21 DE3 aber bedeutend höher war (Abb. 5.16).

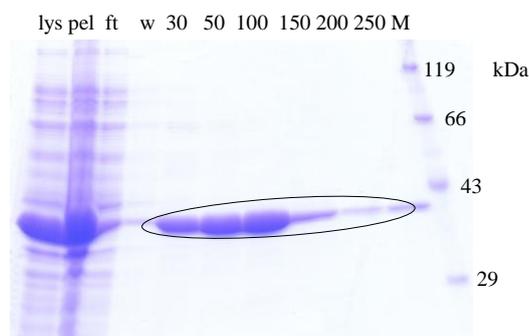


Abb. 5.16: Expression von PedD aus pHis8-3.

pKZ178-1 (*pedD* / pHis8-3) / *E. coli* BL21 DE3: 250 ml LB Kn⁵⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 25 h M, Marker (RotiMark Standard); lys, Probe von löslichen Überstand; pel, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w, Waschfraktion (Lysepuffer II); 30-250, Elutionsfraktion Lysepuffer II + 30-250 mM Imidazol; Expression entsprechend 6.13; Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II; SDS-PAGE: 12% Trenngel (6.13.4)

5.3 Expression der *O*-MT-Domänen

Im *ped*-Gencluster (Abb. 3.16) befinden sich drei *O*-MT (PedA, PedE, PedO), Pederin **23** weist aber vier *O*-Methylierungen auf. Zur Klärung der Frage, an welcher Stelle sie die *O*-Methylierung durchführen, sollten die exprimierten *O*-MT in Enzym-Assays eingesetzt werden. Als Substratanaloga fanden Mycalamid A **25** und B **32** Verwendung, da sie weniger methylierte Hydroxylgruppen besitzen. Die im *onn*-Gencluster vorkommende *O*-MT OnnD²¹ sollte ebenfalls exprimiert werden, um sie in einem Enzym-Assay mit Pederin **23** als Substrat einzusetzen. Dies sollte zur Klärung der Frage dienen, ob OnnD für die Methylierung der OH-Gruppe an C13 zuständig ist. Diese tritt zwar in Onnamid A **26** auf, jedoch nicht in Pederin **23**. Folglich sollte eine Überexpression der *O*-MT PedA, PedE, PedO und OnnD erfolgen, um sie für *in vitro*-Assays verwenden zu können.

5.3.1 MBP-Fusionsproteine aus pMAL-c2X

Als erstes wurde zur Herstellung der vier *O*-MT eine Expression aus dem Vektor pMAL-c2X angestrebt, um MBP-Fusionsproteine zu erhalten. Mit den entsprechenden Cosmiden (Tab. 6.1) und den spezifischen Primern (Tab. 6.5) erfolgte die Amplifizierung der Gene mittels PCR (6.6). Nach der TA-Klonierung und Sequenzierung (6.12.1) ergaben sich folgende Positivklone: pKZ90-1 (*pedA*), pKZ91-1 (*pedE*), pKZ156-1 (*pedO*) und pKZ149-1 (*onnD*). Diese wurden im

Anschluss mit den durch die Primer eingebrachten Restriktionsschnittstellen entsprechend verdaut und in die gleichen Stellen in pMAL-c2X ligiert (6.12.2, vgl. Tab. 6.9). Durch Restriktionskontrolle konnten die korrekten Konstrukte gefunden werden: pKZ96-1 (*pedA*), pKZ100-1 (*pedE*), pKZ158-1 (*pedO*) und pKZ157-1 (*onnD*). Mit diesen schloss sich dann eine Proteinexpression in *E. coli* ER2566 bzw. *E. coli* BL21 DE3 an. Dabei ergab sich für alle vier Enzyme eine erfolgreiche Überexpression (Abb. 5.17). Die Reduktion der Expressionstemperatur führte dabei zu einer Erhöhung der Enzymmenge im Überstand. Dies konnte in der Literatur¹¹⁸ und auch bei hier durchgeführten anderen Experimenten schon beobachtet werden.

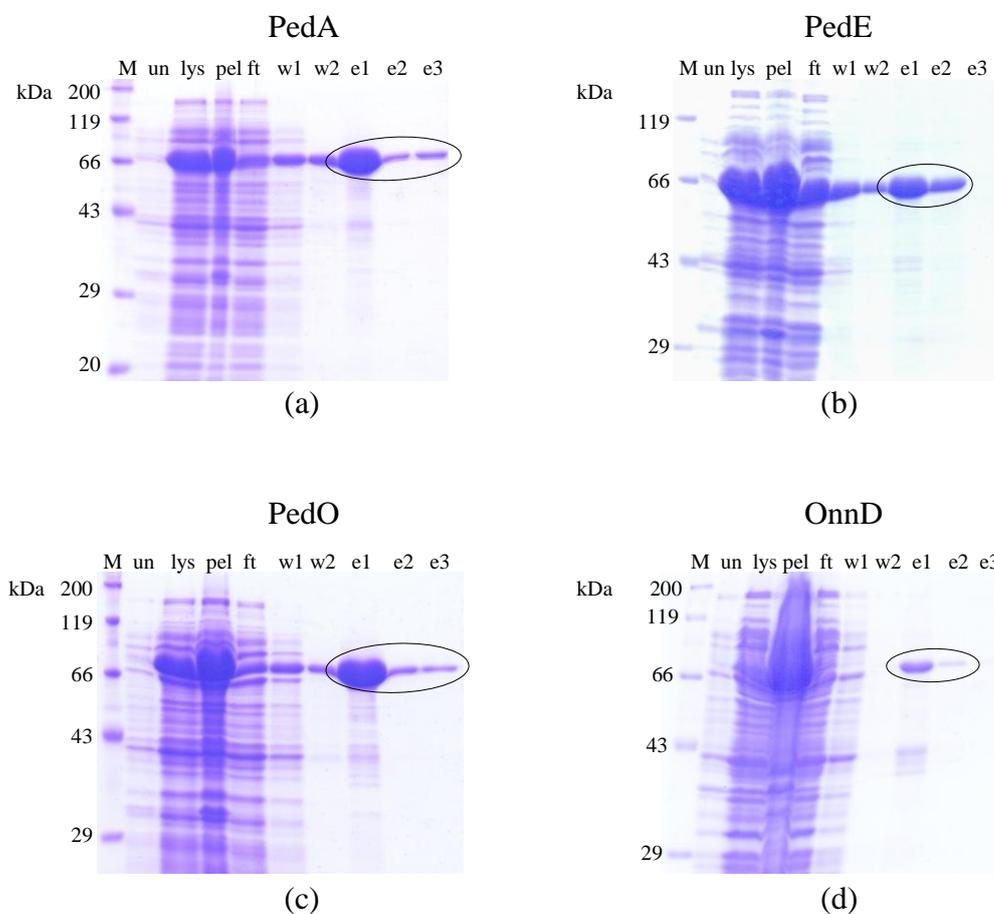


Abb. 5.17: Expression der O-MT aus pMAL-c2X.

(a) pKZ96-1 (*pedA* / pMAL-c2X) / *E. coli* ER2566: 0,5 mM IPTG, 15 h

(b) pKZ100-1 (*pedE* / pMAL-c2X) / *E. coli* ER2566: 1 mM IPTG, 23,5 h

(c) pKZ158-1 (*pedO* / pMAL-c2X) / *E. coli* ER2566: 1 mM IPTG, 15 h

(d) pKZ157-1 (*onnD* / pMAL-c2X) / *E. coli* BL21 DE3: 0,4 mM IPTG, 20 h

Expression jeweils in 200 ml RM Amp¹⁰⁰ bei 16 °C

M, Marker (RotiMark Standard); un, uninduzierte Kontrolle; lys, Probe von löslichen Überstand; pel, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w1, 2, Waschfraktion 1, 2; e1-e3, Elutionsfraktionen 1-3; Expression entsprechend 6.13, Aufreinigung nach 6.13.1.1; SDS-PAGE: 12% Trenngel (6.13.4)

Da die *O*-MT PedO im entsprechenden Enzym-Assay (5.6.1) ein positives Resultat zeigte, wurde eine ESI-FT-ICR-Messung durchgeführt. Die Elutionsfraktion mit der größten Enzymmenge wurde dazu nach 6.14.3 mittels Vivaspin 500 (MWCO 30000) entsalzt und vermessen (Abb. 5.18).

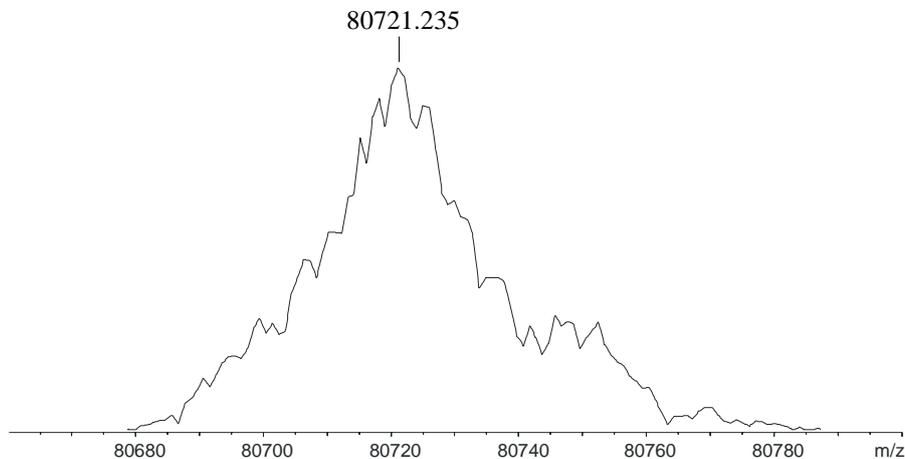


Abb. 5.18: ESI-FT-ICR-MS-Spektrum von PedO aus pMAL-c2X.

100 μ l der Elutionsfraktion e1 aus der Expression von pKZ158-1 (*pedO* / pMAL-c2X) in *E. coli* ER2566 wurde unter Nutzung von Vivaspin 500, MWCO 30000 entsprechend 6.14.3 entsalzt, mit Acetonitril und TFA versetzt und mittels ESI-FT-ICR-MS gemessen. Die Expression erfolgte nach 6.13 bei folgenden Bedingungen: 200 ml RM Amp¹⁰⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 22 h, die Aufreinigung nach 6.13.1.1.

Beim Vergleich mit dem theoretisch zu erwartenden Spektrum (Abb. A.3) kann festgestellt werden, dass es sich wie erwartet um das MBP-Fusionsprotein von PedO handelt. Bei der für Proteine dieser Größe verwendeten Auflösung konnte kein isotopenaufgetrenntes Spektrum erhalten werden, die Unregelmäßigkeiten in Abb. 5.18 resultieren aus Hintergrundrauschen. Das der Summenformel von PedO entsprechende theoretische Spektrum im Anhang wurde mit derselben Auflösung simuliert. Die Maxima der beiden Spektren sind unter Einbeziehung der Messgenauigkeit gleich.

5.3.2 His₈-Fusionsproteine aus pHIS8-3

Die Enzym-Assays sollten neben den MBP-Fusionsproteinen (5.3.1) auch mit den als His₈-Fusionsproteinen vorliegenden *O*-MT durchgeführt werden. Im Falle von positiven Resultaten des Assays mit beiden Fusionsproteinen kann somit gezeigt werden, dass definitiv das klonierte Gen verantwortlich ist und keine anderen Proteine eine Rolle spielen.

Für die Ligation in pHIS8-3 dienten zum einen die schon unter 5.3.1 verwendeten TA-Konstrukte (*pedA*, *pedE*, *pedO*) bzw. das pMAL-c2X-Konstrukt (*onnD*). Das Gen wurde mit entsprechenden Enzymen, deren Schnittstellen auch in pHIS8-3 vorkommen, aus dem Plasmid ausgeschnitten und jeweils in pHIS8-3 ligiert (6.12.2, genaue Beschreibung Tab. 6.9). Die durch Restriktion gefundenen und mittels PCR bestätigten Positivklone sind wie folgt: pKZ179-1 (*pedA*), pKZ181-3 (*pedE*), pKZ182-1 (*pedO*) und pKZ180-1 (*onnD*). Die anschließende Proteinexpression erfolgte in *E. coli* BL21 DE3 (Abb. 5.19). Für PedA, PedE und PedO zeigte sich dabei eine erfolgreiche Enzymproduktion.

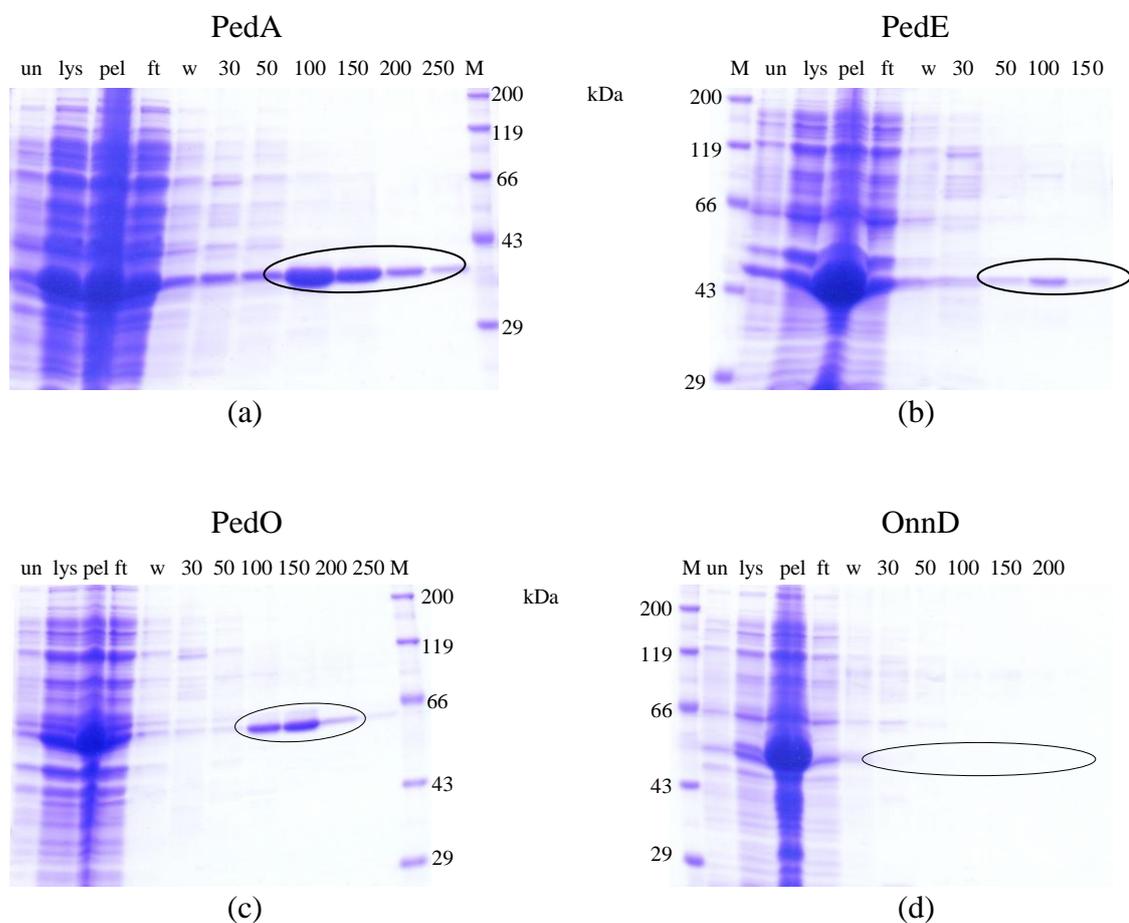


Abb. 5.19: Expression der *O*-MT aus pHIS8-3.

- (a) pKZ179-1 (*pedA* / pHIS8-3) / *E. coli* BL21 DE3
- (b) pKZ181-3 (*pedE* / pHIS8-3) / *E. coli* BL21 DE3
- (c) pKZ182-1 (*pedO* / pHIS8-3) / *E. coli* BL21 DE3
- (a) pKZ180-1 (*onnD* / pHIS8-3) / *E. coli* BL21 DE3

Die Expression erfolgte jeweils mit 200 ml LB Kn⁵⁰, 0,2 mM IPTG bei 15 °C, 24 h

M, Marker (RotiMark Standard); lys, Probe von löslichen Überstand; pel, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w, Waschfraktion (Lysepuffer II); 30-250, Elutionsfraktion Lysepuffer II + 30-250 mM Imidazol; Expression entsprechend 6.13, Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II; SDS-PAGE: 12% Trenngel (6.13.4)

Wie in Abb. 5.19 d erkennbar, erfolgt bei OnnD als His₈-Fusionsprotein keine Expression in löslicher Form, vielmehr liegt das Enzym in Form von inclusion bodies vor. Der in der Literatur¹¹⁸ und auch schon bei PedC (5.2.1) beobachtete positive Einfluss des MBP auf die Löslichkeit des Proteins zeigt sich auch hier wieder. Für vergleichbare Enzym-Assays wäre es aber sinnvoll, die *O*-MT aus dem *onn*-Gencluster auch aus pHIS8-3 als lösliches Protein exprimieren zu können. Die Expression in *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS und die Änderung der Kultivierungsparameter führte jeweils zum gleichen Resultat. Daraufhin wurde die Proteinherstellung unter Coexpression von Chaperon-Plasmiden durchgeführt (6.13). Dabei kamen die Plasmide pKJE7, pGro7, pTf16 und pG-Tf2 zum Einsatz (Tab. 6.2). Die Expression der Chaperone war erfolgreich, allerdings wurde OnnD wiederum nur als unlösliches Protein exprimiert (ohne Abb.). Weitere Versuche, das His₈-Fusionsprotein doch noch als lösliches Enzym zu erhalten, wurden an dieser Stelle nicht weiter verfolgt.

5.4 Expression weiterer Proteine

5.4.1 Oxidoreduktase PedB

Das auf dem *ped*-Gencluster (Abb. 3.16) als separates Gen codierte PedB weist Homologie zu Oxidoreduktasen auf, die FMN (Flavinmononukleotid) als Kofaktor verwenden. Dabei gehören die homologen Proteine ebenfalls zu *trans*-AT Typ-I-PKS-Cluster oder es handelt sich um ER aus FAS.³⁹ Auch der *pksX*-Gencluster zur Bacillalen-Biosynthese⁴⁴ codiert ein zu PedB homologes Enzym. Wie PedB handelt es sich dabei ebenfalls um ein separates Enzym, das nicht innerhalb eines Moduls codiert wird. Der *ped*- und der *pksX*-Gencluster weisen i. a. eine Vielzahl Ähnlichkeiten auf (vgl. 5.4.2), beide gehören zu modularen *trans*-AT Typ-I-PKS. Interessanterweise enthält Pederin **23** keine Strukturelemente, die das Vorhandensein einer Enoylreduktase erforderlich machen würden. Die „schwammähnliche“ Struktur **27** (Abb. 3.17), die sich durch die PKS/NRPS PedF ergeben würde, zeigt hingegen eine Doppelbindung, die durch eine ER-katalysierte Reaktion zur Einfachbindung reduziert werden könnte (vgl. Abb. 3.6). Wie die Onnamid A **26**-ähnliche Substanz **27** tatsächlich aussieht, konnte bisher nicht aufgeklärt werden, da die heterologe Expression des gesamten Clusters noch nicht erfolgreich war. Daher kann mit

vorhandenen Daten auf die Funktion von PedB nur spekuliert werden. Die Abfolge der Polyketidbiosynthese während der Bacillaen-Produktion konnte schon durch Massenspektrometrie der Intermediate bestimmt werden. Dabei konnte gesehen werden, dass die Reduktion der Einfachbindungen während der Polyketidbildung erfolgt und nicht in post-PKS-Reaktionen.⁴⁵ Die ER liegt wie bereits erwähnt aber nicht innerhalb eines Moduls vor.⁴⁴ Folglich liegt die Theorie nahe, dass diese zu PedB homologe ER *in trans* agiert, ähnlich wie die *trans*-AT. Um diese Theorie, die gegen Ende der Dissertationsarbeit entstand, zu untermauern, können diverse Enzymreaktionen durchgeführt werden, beispielsweise der Einsatz von PedB während der Bacillaen-Produktion und der massenspektrometrische Nachweis der Intermediate. Weiterhin können Enzym-Assays durchgeführt werden mit verschiedenen synthetisierten Intermediaten der Pederin- und Bacillaen-Biosynthese sowie unterschiedlichen ACP und den vermeintlichen ER aus den beiden PKS-Clustern. Dadurch kann herausgefunden werden, ob es sich tatsächlich um ER handelt und ob sie eine bestimmte Spezifität gegenüber Strukturen / Strukturelementen oder eher zu verschiedenen ACP aufweisen. Die Hypothese der *trans*-ER-PKS kann mittels dieser Experimente getestet werden. Der Beitrag der vorliegenden Arbeit liegt in der Bereitstellung verschiedener *holo*-ACP (5.1.4) und AT (5.2) sowie der putativen ER PedB.

Für die Proteinexpression von PedB erfolgte zu Beginn eine Klonierung in den Vektor pTYB1. Dazu wurde das Gen mittels PCR (6.6) mit dem entsprechenden Cosmid (Tab. 6.1) und den spezifischen Primern (Tab. 6.5) amplifiziert und eine TA-Klonierung durchgeführt (6.12.1). Der Positivklon pKZ11 (Tab. 6.8) wurde im Folgenden für die Ligation in den Expressionsvektor unter Nutzung der Schnittstellen *Nde*I und *Sap*I verwendet (6.12.2). Mittels Restriktionsanalyse wurde pKZ23-3 (Tab. 6.9) gefunden und die Proteinexpression in *E. coli* ER2566 durchgeführt. In der entsprechenden Höhe des zu erwartenden Proteins (Tab. 6.17) war aber trotz mehrerer Kultivierungsversuche kein Protein zu erkennen (ohne Abb.).

Daher wurde eine Expression aus dem Vektor pMAL-c2X angestrebt. Dazu wurde mit neuen Primern (Tab. 6.5) eine PCR (6.6) mit dem entsprechenden Cosmid (Tab. 6.1) durchgeführt. Nach TA-Klonierung und Sequenzierung (6.12.1) konnte

Konstrukt pKZ154-3 (Tab. 6.8) als Positivklon durch Restriktionsanalyse identifiziert werden. Die Klonierung in den Expressionsvektor pMAL-c2X erfolgte durch Schneiden des TA-Konstrukts mit *Bgl*III und Ligation in die *Bam*HI-Stelle von pMAL-c2X. Der durch Restriktionskontrolle gefundene Klon war pKZ159-15 (Tab. 6.9). Eine Expression in *E. coli* BL21 DE3 zeigte das Protein in der entsprechenden Höhe (Tab. 6.15), jedoch fast ausschließlich im Pellet. Änderungen der Kultivierungsparameter zeigten wenig Auswirkung auf ein erhöhtes Vorkommen von löslichem Protein. Auch die vorher schon als günstig herausgestellte Reduzierung der Expressionstemperatur brachte wie auch die Fermentation in *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS nur geringen Erfolg. Der Großteil des Enzyms befand sich weiterhin im Pellet (Abb. 5.20).

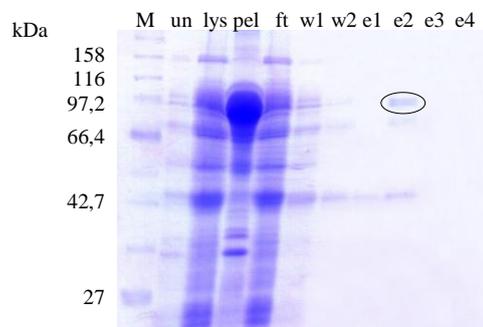


Abb. 5.20: Expression von PedB aus pMAL-c2X.

pKZ159-15 (*pedB* / pMAL-c2X) / *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS:
500 ml RM Amp¹⁰⁰ Tet^{12,5} Str⁵⁰ Cm³⁴, 0,4 mM IPTG, 16 °C, 28 h

M, Marker (Broad-Range); un, uninduzierte Kontrolle; lys, Probe von löslichen Überstand; pel, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w1, w2, Waschfraktion 1, 2; e1 - e4, Elutionsfraktionen 1-4; Expression entsprechend 6.13; Aufreinigung entsprechend 6.13.1.1; SDS-PAGE: 12% Trenngel (6.13.4)

Um eine Expression von PedB auch als His₈-Fusionsprotein durchführen zu können, erfolgte eine Umklonierung in pHIS8-3. Hierfür wurde dasselbe TA-Konstrukt wie für pMAL-c2X verwendet (pKZ154-3). Dieses wurde mit *Bgl*III verdaut und in die *Bam*HI-Seite von pHIS8-3 ligiert. Durch Restriktionskontrolle und PCR konnte pKZ192-1 (Tab. 6.9) als positiv identifiziert werden. Die bisherige Expression in *E. coli* BL21 DE3 zeigte jedoch nur unlösliches Protein. Für zukünftige Arbeiten mit dem Enzym sollte daher die Expression optimiert werden, ebenso besteht noch Potential, mehr lösliches MBP-Fusionsprotein zu erhalten. Dabei können beispielsweise Chaperon-Plasmide oder ein größeres Kultivierungsvolumen eingesetzt werden, wobei letzteres nicht immer zwangsläufig auch mehr lösliches Protein hervorbringt.

5.4.2 A-Domänen der NRPS

Da es sich beim *ped*-Gencluster (Abb. 3.16) um ein NRPS/PKS-Hybrid handelt, enthalten die Genomregionen *pedF* und *pedH* in ihren NRPS auch A-Domänen. Diese sind für die Umsetzung der Aminosäure zu ihrem Aminoacyladenylat zuständig und für die Übertragung dieser auf die PCP (Abb. 3.13 a und b). Wie bereits erwähnt, existiert ein nichtribosomaler Code, mit dem auf genetischer Ebene die Aminosäurespezifität der A-Domäne vorhergesagt werden kann.^{59, 60} Für die A-Domäne in *pedF* sollte daher der Einbau von Glycin stattfinden, was sich auch mit der Struktur von Pederin **23** deckt. Bei *pedH* ist es sehr wahrscheinlich, dass als Aminosäure Arginin verwendet wird.³⁹

Für zukünftige Enzym-Assays zum Beweis der Substratspezifität der A-Domänen müssen diese als lösliches Protein vorliegen. In dem Assay selbst wird ³²P-markiertes Pyrophosphat, die exprimierte A-Domäne und die zu testende Aminosäure eingesetzt. Der geplante Assay wurde sowohl bei NRPS als auch PKS/NRPS-Hybriden erfolgreich angewendet und zeigte dort oft eindeutig, für welche Aminosäure die untersuchte A-Domäne spezifisch war.^{63, 128} Die Reaktionsabfolge kann Abb. 5.21 entnommen werden. Ist die A-Domäne gegenüber der eingesetzten Aminosäure spezifisch, so katalysiert sie deren Aktivierung unter ATP-Verbrauch: es stellt sich ein chemisches Gleichgewicht ein. In diesem findet folglich auch die Rückreaktion zu ATP unter Pyrophosphat-Verbrauch statt. Wird dem Assay ³²P-markiertes Pyrophosphat zugesetzt, so wird auch dieses bei der Rückreaktion in ATP eingebaut. Durch eine Behandlung mit Aktivkohle wird das nun radioaktiv markierte ATP gebunden und kann dann in einem Szintillationszähler gemessen werden. Zeigt die A-Domäne keine Aktivität gegenüber der eingesetzten Aminosäure, so findet keine Hin- und damit auch keine Rückreaktion statt, der radioaktive Phosphor wird nicht in ATP eingebaut. Der Aktivkohleschritt muss durchgeführt werden, um im Szintillationszähler kein freies Pyrophosphat zu messen. Die Aktivkohle wird dabei mehrmals gewaschen und enthält am Ende nur gebundenes ATP. Diese Methode stellt eine sehr sensitive und doch recht simple Methode dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde sie jedoch aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt, sondern nur eine Expression der entsprechenden Enzyme angestrebt.

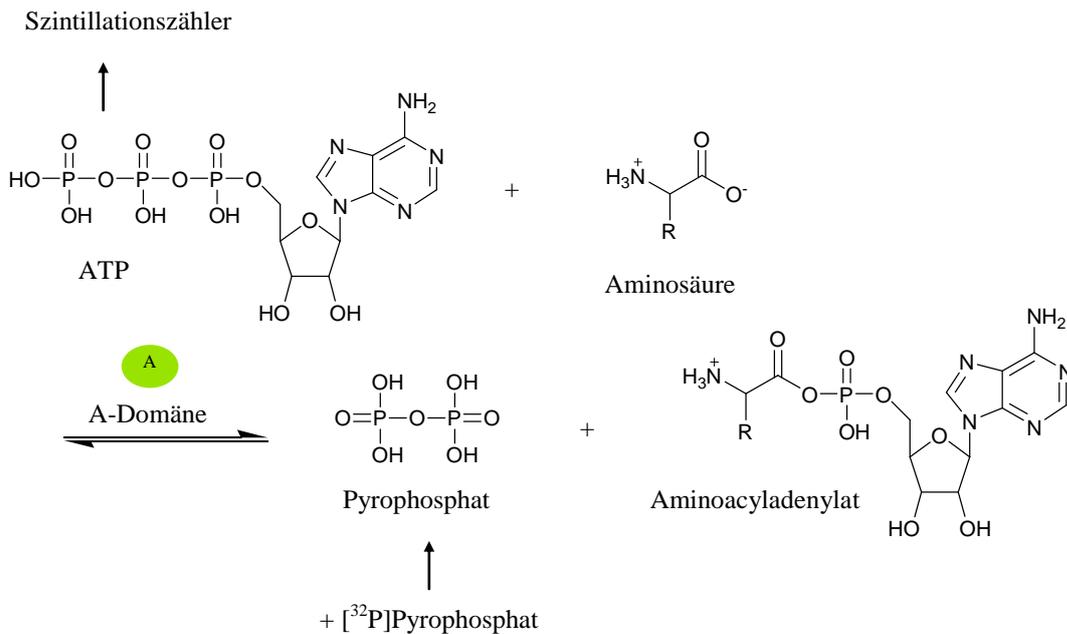


Abb. 5.21: Assay zur Aminosäurespezifität von exprimierten A-Domänen.

Für die Enzymherstellung wurde eine Amplifizierung der Gene durch PCR (6.6) unter Verwendung des entsprechenden Cosmids (Tab. 6.1) und der jeweiligen spezifischen Primer (Tab. 6.5) durchgeführt. Die anschließende TA-Klonierung (6.12.1) brachte als Positivklone pKZ168-1 (*pedF* (A-Domäne), Tab. 6.8) und pKZ171-1 (*pedH* (A-Domäne), Tab. 6.8) hervor. Für die Ligationen in pMAL-c2X und in pHIS8-3 fanden die gleichen TA-Konstrukte Verwendung und die Klonierung erfolgte jeweils zwischen *EcoRI* und *HindIII* (6.12.2). Folgende Positivklone wurden dabei durch Restriktionskontrolle erhalten (Tab. 6.9):

- pKZ172-2 (*pedF* (A-Domäne) / pMAL-c2X)
- pKZ173-1 (*pedH* (A-Domäne) / pMAL-c2X)
- pKZ183-1 (*pedF* (A-Domäne) / pHIS8-3)
- pKZ174-10 (*pedH* (A-Domäne) / pHIS8-3).

Nach Transformation der Konstrukte in den Expressionsstamm schloss sich die Proteinexpression und Aufreinigung an. Die angefertigten Proteingele zeigten jeweils eine große Menge des Proteins im Pellet, d. h. in der unlöslichen Fraktion. Zwar ist auch lösliches Enzym vorhanden, für zukünftige Experimente sollte aber noch eine Optimierung der Kultivierungsparameter erfolgen. Zum Beispiel könnten noch andere Expressionsstämme getestet werden. Die bisherigen Ergebnisse sind in Abb. 5.22 und 5.23 dargestellt.

Eine Spaltung des MBP-Fusionsproteins von PedH (A-Domäne) ist dabei nicht möglich, da sich im interessierenden Protein ebenfalls eine Faktor Xa-Erkennungssequenz befindet.

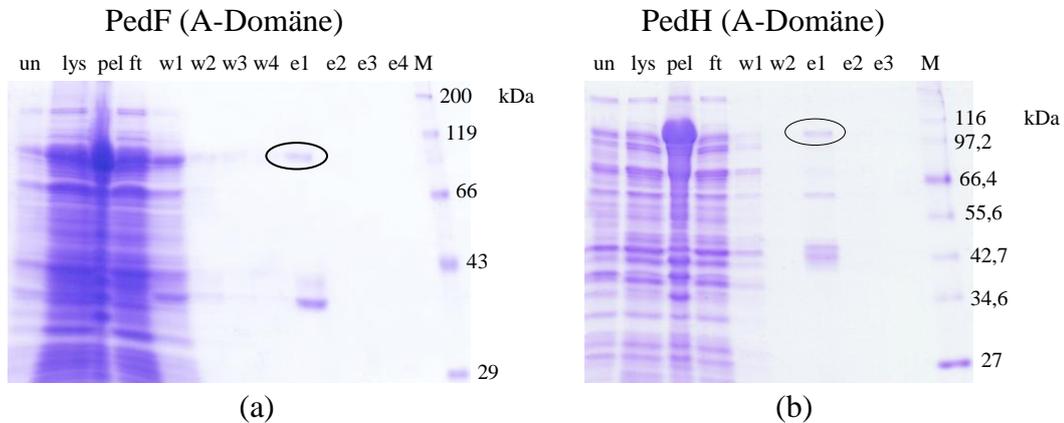


Abb. 5.22: Expression der A-Domänen aus pMAL-c2X.

- (a) pKZ172-2 (*pedF* (A-Domäne) / pMAL-c2X) / *E. coli* BL21 DE3
500 ml RM Amp¹⁰⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 70 h
(b) pKZ173-1 (*pedH* (A-Domäne) / pMAL-c2X) / *E. coli* BL21 DE3
250 ml RM Amp¹⁰⁰, 0,5 mM IPTG, 37 °C, 7 h

M, Marker (RotiMark Standard, Broad-Range); un, uninduzierte Kontrolle; lys, Probe von löslichen Überstand; pel, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w1-4, Waschfraktion 1-4; e1-e4, Elutionsfraktionen 1-4; Expression entsprechend 6.13; Aufreinigung nach 6.13.1.1; SDS-PAGE: 12% Trenngel (6.13.4)

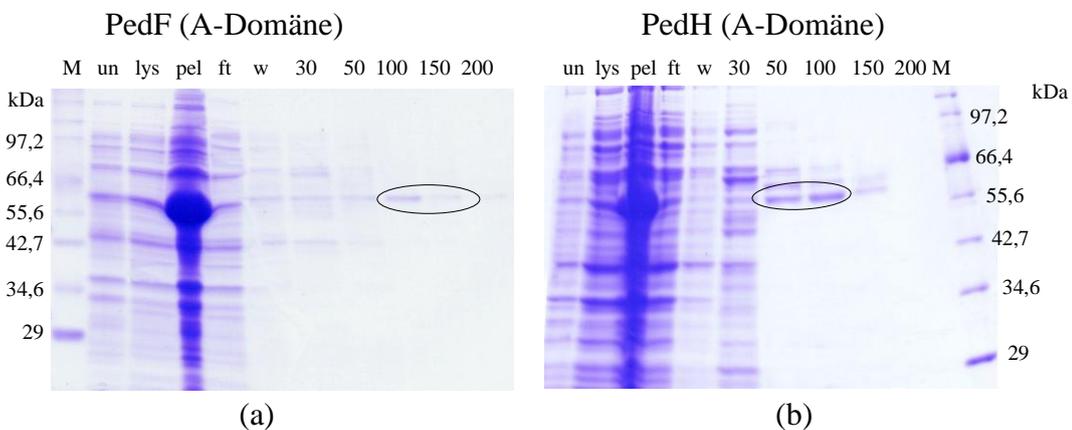


Abb. 5.23: Expression der A-Domänen aus pHIS8-3.

- (a) pKZ183-1 (*pedF* (A-Domäne) / pHIS8-3) / *E. coli* BL21 DE3
200 ml LB Kn⁵⁰, 0,2 mM IPTG, 15 °C, 24 h
(b) pKZ174-10 (*pedH* (A-Domäne) / pHIS8-3) / *E. coli* BL21 DE3
200 ml LB Kn⁵⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 24 h

M, Marker (Broad-Range); un, uninduzierte Kontrolle; lys, Probe von löslichen Überstand; pel, Probe von resuspendierten Pellet; ft, Durchfluss; w, Waschfraktion (Lysepuffer II); 30-200, Elutionsfraktion Lysepuffer II + 30-200 mM Imidazol; Expression entsprechend 6.13; Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II; SDS-PAGE: 12% Trenngel (6.13.4)

5.4.3 HMGCoA-Synthase PedP und KS PedM

Für ein genaueres Verständnis des Reaktionsmechanismus zur Bildung der Exomethylengruppe an C4 in Pederin **23** ist eine Expression der wahrscheinlich an der Reaktion beteiligten Enzyme notwendig. Hierzu zählen die AT (PedC und/oder PedD), das ACP PedN, die KS PedM, die HMGCoA-Synthase PedP und im Cluster vorhandene Crotonasen (im 3. Modul von *pedI* codiert und/oder PedL). Es existiert bereits eine Hypothese über die Rolle der einzelnen Enzyme in Analogie zu bereits studierten Homologen aus dem *pksX*-Gencluster zur Bacillalen-Biosynthese.^{44, 91} Derselbe Mechanismus wird auch im Falle des *ped*-Clusters postuliert (s. auch 3.8.2). Durch *in vitro*-Assays soll diese Hypothese getestet werden. Da die Bildung der Exomethylengruppe wahrscheinlich an den Enzymen des 3. Moduls von *pedI* erfolgt (Abb. 3.16), unter Beteiligung der oben erwähnten zusätzlichen Proteine, sollte eine Expression des gesamten Moduls erfolgen. Dabei müssen die ACP in ihrer aktiven *holo*-Form vorliegen, was mit der einzelnen Doppel-ACP (PedI3) aus diesem Modul schon gelungen ist (5.1.4). Die Expression des gesamten Moduls wurde von Holger Niederkrüger durchgeführt. Das für dieses Modul theoretisch erforderliche Pederin **23**-Intermediat (Abb. 3.17) wurde von Jana Moldenhauer chemisch synthetisiert.¹²⁹ Normalerweise erfolgt die Bindung eines Intermediats am ACP und wird an die darauffolgende KS weitergegeben. Um diese ACP-Bindung zu imitieren, erfolgte die Kopplung der Substanz an SNAC (*N*-Acetylcysteamin). Dies konnte schon erfolgreich für PKS angewendet werden.¹³⁰ Die Crotonase PedL wird ebenfalls durch Holger Niederkrüger exprimiert. Der Beitrag zu dem Experiment durch die vorliegende Arbeit liegt neben der Expression der AT (5.2) und der separaten ACP PedN (5.3) in der Bereitstellung der beiden Proteine PedP und PedM.

Für die Versuche sollten beide AT (PedC und PedD) getestet werden. Die Untersuchung der Produkte und Zwischenprodukte sollte massenanalytisch durchgeführt werden. Die einzelnen Schritte, die theoretisch zur Bildung der Exomethylengruppe führen, sind in Abb. 5.24 dargestellt. Dabei wird Malonyl-CoA **8** an das ACP PedN durch die AT PedC oder PedD übertragen und durch die KS PedM im Folgenden eine Decarboxylierung katalysiert. Die KS hat nur noch diese Funktion, eine Kondensationsreaktion kann durch PedM nicht durchgeführt werden. In die Aminosäuresequenz von PedM ist im katalytischen Motiv CSSS anstelle des Cysteins ein Serin eingebaut. Dieses Cystein ist jedoch entscheidend für die Katalyse

einer Claisen-Kondensation.⁹⁰ Im Folgenden wird durch das HMGC_oA-Synthase-Homologe PedP die Acetylgruppe an den β -Ketothioester des Polyketidintermediats übertragen. Die Crotonasen katalysieren dann wahrscheinlich eine Dehydrierung und eine Decarboxylierung. Solche Reaktionen wurden beispielsweise für Crotonasen gezeigt, die auf dem *pksX*-Gencluster codiert sind.⁹¹ Der Gencluster ist für die Bacillaen-Biosynthese verantwortlich.⁴⁴ Auch im Gencluster für die Biosynthese von Curacin A konnte eine durch Crotonasen katalysierte Dehydrierung und Decarboxylierung nachgewiesen werden.⁹² Bei den hier beteiligten Crotonasen kann es sich zum einen um die eigenständige CR PedL und zum anderen um die CR des 3. Moduls von *pedI* handeln. Die Darstellung in Abb. 5.24 ist dabei nur hypothetisch, die Versuche hierzu sollten Klarheit über den Mechanismus bringen.

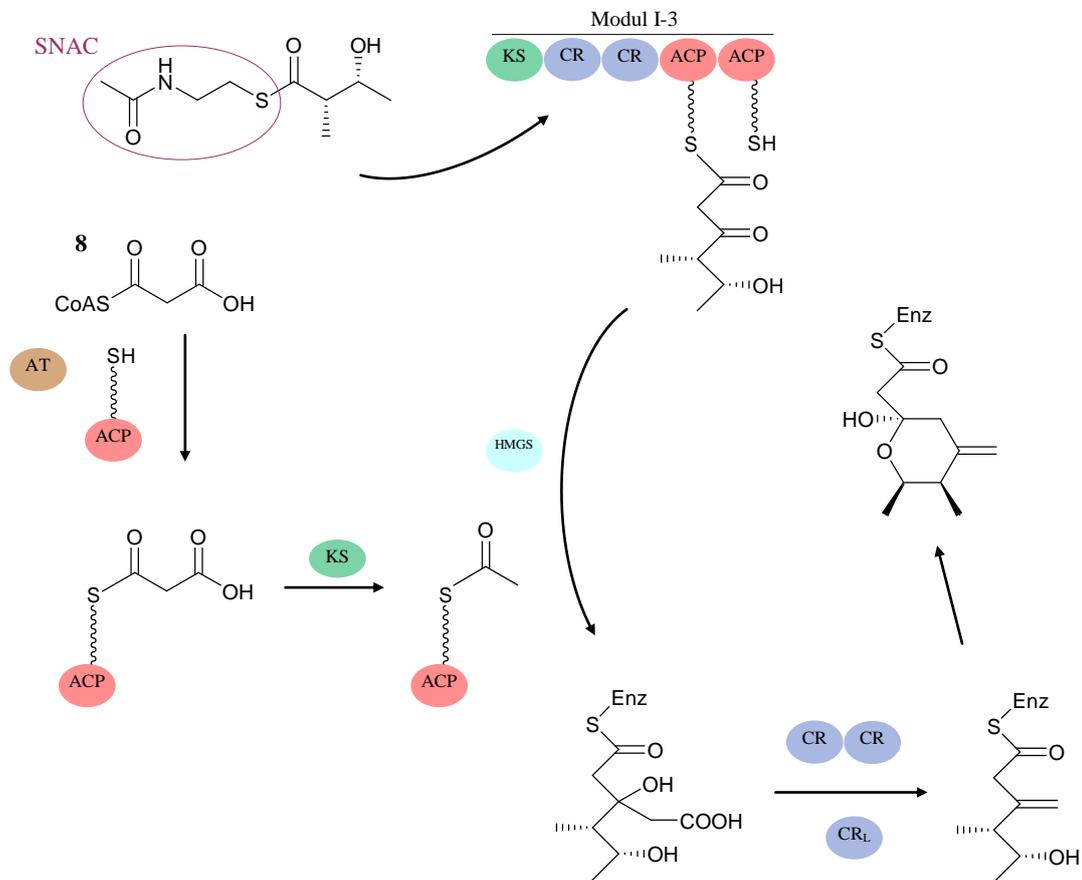


Abb. 5.24: Reaktionsabfolge zur Bildung der Exomethylengruppe in Pederin.

Die Bildung der Exomethylengruppe findet wahrscheinlich durch Enzyme des 3. Moduls von *pedI* statt. Dafür wird das chemisch synthetisierte Intermediat, gebunden an SNAC, als Substrat eingesetzt. Dieses bindet dann am ACP des Moduls, wobei nicht geklärt ist, welches der beiden verantwortlich ist. Die Exomethylengruppe wird dann durch Reaktionen gebildet, an denen folgende Enzyme beteiligt zu sein scheinen: eine oder beide AT (PedC oder/und PedD), das ACP PedN, die KS PedM, die HMGC_oA-Synthase (HMGS) PedP, die separate Crotonase (CR_L) PedL und die Crotonasen (CR) des 3. Moduls von PedI. Enz: ACP des 3. Moduls von PedI

Es stellt sich außerdem die Frage, welches der beiden ACP im 3. Modul von *pedI* tatsächlich die Intermediate trägt. Dies kann durch die Erzeugung von Knock-out-Mutanten ergründet werden. Im Leinamycin-Gencluster beispielsweise tritt ebenfalls eine solche Doppel-ACP (LnmJ) auf. Die entsprechenden Versuche zeigten, dass beide ACP funktionell sind und eine Polyketidproduktion auftritt, auch wenn eine der zwei ACP ausgeknockt wurde. Versuche mit den einzelnen Proteinen ergaben, dass das zweite ACP stärker beladen wird. Bei Vorhandensein beider wird dieses dann das bevorzugte sein.¹²¹ In der Abbildung wurden daher beide ACP in ihrer *holo*-Form dargestellt, jedoch nur eine (willkürlich) als Intermediat-Träger ausgewählt. Die Versuche zur Klärung dieses Mechanismus sollen jedoch nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit sein, sondern der Beitrag hierzu liegt in der Bereitstellung exprimierter Proteine.

Für die Expression von PedM und PedP erfolgte als erstes eine PCR (6.6) mit dem entsprechenden Cosmid (Tab. 6.1) und den spezifischen Primern (Tab. 6.5). Die anschließende TA-Klonierung (6.12.1) führte nach Restriktionskontrolle und Sequenzierung zu folgenden Konstrukten: pKZ155-1 (*pedM*) und pKZ147-1 (*pedP*) (Tab. 6.8). Mittels der Schnittstellen von *Bam*HI und *Pst*I erfolgte die Ligation in den Expressionsvektor pMAL-c2X (6.12.2). Die Positivklone wurden durch Restriktion als pKZ160-2 (*pedM*) und pKZ153-2 (*pedP*) ermittelt (Tab. 6.9). Die Expression der pMAL-c2X-Konstrukte in *E. coli* ER2566 zeigte das Protein in der richtigen Größe (Tab. 6.15), hauptsächlich aber als unlösliche inclusion bodies. Allerdings konnte durch Variation der Parameter auch etwas lösliches Protein erhalten werden (ohne Abb.). Dahingehend würde eine Optimierung der Bedingungen zu größeren Ausbeuten des Proteins führen.

Da in der Literatur schon ähnliche Versuche unternommen wurden,⁹¹ die Enzyme aber als His-Fusionsprotein eingesetzt wurden, fand auch hier eine Umklonierung in pHIS8-3 statt. Dazu wurden die vorher schon genutzten TA-Konstrukte genutzt und mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten, um eine Ligation (6.12.2) in den Expressionsvektor in dieselben Stellen zu ermöglichen. Die durch Restriktionskontrolle bestätigten Positivklone sind pKZ193-1 (*pedM*) und pKZ194-1 (*pedP*) (Tab. 6.9). Auch nach mehreren Fermentationsversuchen konnte kein lösliches Protein erhalten werden (ohne Abb.). Daher wurde versucht, durch die Coexpression von Chaperon-

Plasmiden lösliches Enzym zu erhalten. Dabei wurde entsprechend 6.13 eine Expression in *E. coli* BL21 DE3 durchgeführt und das Chaperon-Plasmid pKJE7 (Tab. 6.2) verwendet. Die Ausbeute an löslichem Protein konnte dadurch gesteigert werden (Abb. 5.25). Die durch das Plasmid codierten Chaperone haben eine Größe von 70, 40 und 22 kDa und sind im Proteingel ebenfalls deutlich zu sehen. Während der Expression binden die Chaperone (nicht-kovalent) an das exprimierte Protein. Dabei scheint es sich allerdings um eine sehr starke Wechselwirkung zu handeln, da die Chaperone auch in den Elutionsfraktionen auftauchen, obwohl sie eigentlich nicht an Ni-NTA binden. Erst durch die Denaturierung und SDS-Behandlung werden sie vom gewünschten Enzym getrennt. Experimente mit den Proteinen unter Chaperon-Coexpression (durchgeführt von Holger Niederkrüger) zeigten, dass eine Trennung der Proteine im nativen Zustand nicht trivial ist. Die Trennung durch FPLC scheint diesbezüglich unausweichlich. Jedoch ist noch nicht geklärt, ob die Chaperone einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Dies sollte zunächst getestet werden, da die Nutzung der FPLC immer mit einem Protein- und Aktivitätsverlust verbunden ist. Daher sollte der Assay zur Bildung der Exomethylengruppe erst durchgeführt und variiert werden, bevor weitere Versuche zur Chaperonabtrennung unternommen werden.

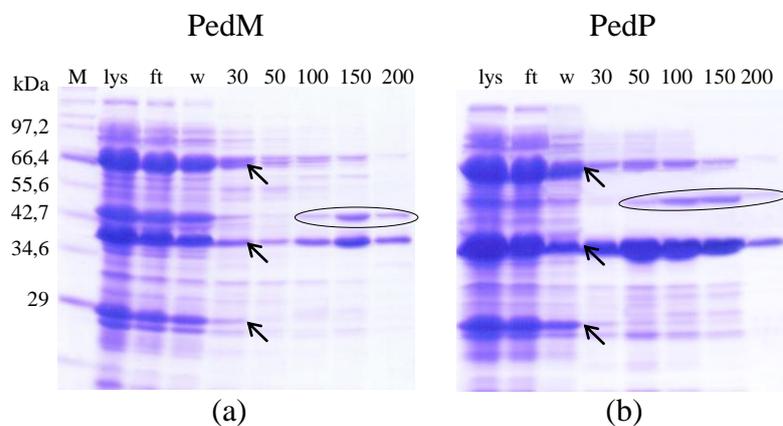


Abb. 5.25: Expression von PedM und PedP aus pHIS8-3.

- (a) pKZ193-1 (*pedM* / pHIS8-3) / *E. coli* BL21 DE3 + pKJE7
200 ml LB Kn⁵⁰ Cm³⁴ + 0,5 mg/ml Arabinose, 0,5 mM IPTG, 16 °C, 16 h
- (b) pKZ194-1 (*pedP* / pHIS8-3) / *E. coli* BL21 DE3 + pKJE7
200 ml LB Kn⁵⁰ Cm³⁴ + 0,5 mg/ml Arabinose, 0,5 mM IPTG, 16 °C, 16 h

Die aus pKJE7 coexprimierten Chaperone sind durch einen Pfeil gekennzeichnet und haben eine Masse von 22, 40 und 70 kDa.

M, Marker (Broad-Range); lys, Probe von löslichen Überstand; ft, Durchfluss; w, Waschfraktion (Lysepuffer II); 30-200, Elutionsfraktion Lysepuffer II + 30-200 mM Imidazol; Expression entsprechend 6.13, Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II; SDS-PAGE: 12% Trenngel (6.13.4)

In der oben zitierten Literaturstelle, die sich mit derselben Aufgabenstellung beschäftigte, wurden Gene des *pksX*-Clusters aus *Bacillus subtilis* näher beleuchtet.⁹¹ Es handelt sich dabei wie bei Pederin **23** um ein modulares *trans*-AT Typ-I-PKS/NRPS-Hybrid. Mittlerweile konnte herausgefunden werden, dass der Gencluster für die Bacillaen-Biosynthese zuständig ist.⁴⁴ Die Resultate der Studie⁹¹ bestätigen die hier postulierten Schritte zur Bildung der Exomethylengruppe. So treten im *pksX*-Cluster mehrere *in trans* agierende AT auf, eine Doppel-ACP-Domäne (PksL), ein separates ACP (AcpK), eine HMGC_oA-Synthase (PksG) und Crotonasen (PksH, PksI). Die KS PksF, dessen Analogon aus dem *ped*-Cluster PedM ist, besitzt ebenfalls nur eine Decarboxylierungsfunktion und keine Aktivität für eine Claisen-Kondensation. Die Ursache liegt im für PedM bereits erwähnten Fehlen des konservierten Cysteins⁹⁰ (vgl. Abschnitt 3.8.2). Durch Expression der aufgeführten Enzyme und Inkubation mit entsprechenden Substraten wurde herausgefunden, wie die Bildung einer β -Methyl-Verzweigung erfolgt.⁹¹ Bei der sonst üblichen α -Methylierung ist eine SAM-abhängige C-MT verantwortlich, während hier fünf Enzyme und ein separates ACP notwendig sind. Die Vorhersage dieses Strukturelements deckt sich mit der Struktur von Bacillaen.⁴⁴ Neuste Untersuchungen des Mupirocin-Genclusters deuten ebenfalls auf die Beteiligung der aufgeführten Enzyme an der Bildung einer β -Methyl-Verzweigung hin.¹³¹ Dabei handelt es sich ebenfalls um eine modulare *trans*-AT Typ-I-PKS. Die gleichen Reaktionen sollten dementsprechend auch bei Pederin **23** stattfinden, dort aber zur Exomethylengruppe führen.⁹¹ Durch Vergleich mit den schon bestätigten Daten des *pksX*-Clusters scheint die aufgestellte Theorie (Abb. 5.24) sinnvoll zu sein und muss durch zukünftige Experimente bestätigt werden. Die Massenspektrometrie scheint hierzu geeignet zu sein, da Reaktionen durch Massenverschiebungen mit hoher Genauigkeit detektiert werden können. Große Fortschritte bezüglich der Nutzung von ESI-FT-MS wurden hierzu in letzter Zeit erreicht.¹³² Auch die Nutzung von radioaktiv markiertem Substrat stellt eine ergänzende Variante dar. Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit für den ACP-AT-Assay verwendet (5.5.2).

5.5 ACP-AT-Assay

Im *ped*-Gencluster (Abb. 3.16) befinden sich zwei AT, die für die Auswahl des Substrates und dessen Übertragung auf das *holo*-ACP zuständig sind (Abb. 3.5 a) und *in trans* agieren (s. Abschnitt 3.5). Theoretisch reicht in solchen *trans*-AT-Systemen das Vorhandensein einer AT aus, wie dies beispielsweise im Leinamycin-Gencluster der Fall ist.^{1, 85} Andere *trans*-AT-PKS hingegen, wie zum Beispiel das zur Bacillaen-Biosynthese, besitzen drei separate AT.⁴⁴ Für den *ped*-Gencluster sollte daher herausgefunden werden, ob beide AT funktionell sind und ob sie gegenüber verschiedener ACP oder Substrate unterschiedliche Aktivität aufweisen. Interessant war auch die Frage, ob eine AT für das Starter- und eine AT für das Elongationssubstrat zuständig ist. Für modulare Typ-I-PKS konnte gezeigt werden, dass die AT für das Startersubstrat eher unspezifisch zu sein scheint, die für die Verlängerungseinheit zuständige AT aber hochspezifisch für das entsprechende Molekül ist.¹³³ Letzteres wurde am Erythromycin-Gencluster bewiesen.¹³⁰

Für den Assay erfolgte im Vorfeld eine Expression verschiedener ACP (5.1) und der beiden AT (5.2). Bei den ACP ist es dabei erforderlich, die aktivierte *holo*-Form des Proteins zur Verfügung zu haben (vgl. Abb. 3.4). Es standen die ACP *holo*-PedN und *holo*-PedI3 und die AT PedC und PedD zur Verfügung. Die *holo*-PedGNAT-ACP wurde erst am Ende der Arbeit einbezogen und sollte in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden. Die verwendete AT PedC wurde zum einen als MBP-Fusionsprotein und zum anderen als Mischung der mit Faktor Xa behandelten Probe eingesetzt (6.13.1.2). Versuche, das nach der Spaltung mit Faktor Xa vorliegende MBP vom interessierenden Protein zu trennen, waren trotz Nutzung verschiedener Methoden nicht erfolgreich. Die Elutionsfraktion mit dem Fusionsprotein wurde dafür mit der Protease Xa inkubiert und eine Dialyse durchgeführt. Dabei sollten die sehr viel kleineren Maltose-Moleküle durch die Dialysemembran wandern, während die Proteine in der Lösung verbleiben. Im Folgenden wurde die Proteinmischung wieder auf eine Säule mit Amyloseharz gegeben und da die enthaltene Maltose-Menge nun sehr gering sein sollte, hätte eine Bindung des MBP am Säulenmaterial stattfinden müssen. Durch Waschen der Säule sollte sich dann nur das gewünschte Enzym in der Fraktion befinden (die verwendeten Substanzen entsprechen 6.13.1.1). Die einzelnen Fraktionen wurden zusammen mit einer Probe der ursprünglich eingesetzten Lösung vor und nach der Spaltung auf ein SDS-PA-Gel (6.13.4)

aufgetragen. Bei den Versuchen mit unterschiedlichen Dialysemembranen musste jedoch festgestellt werden, dass die Prozedur nicht erfolgreich war. Zum einen war immer noch so viel Maltose in der Lösung vorhanden, dass das MBP nicht an der Säule binden konnte. Zum anderen war die Proteinmenge nach der Dialyse in allen Proben sehr viel kleiner als vorher, die Enzyme befanden sich folglich noch an der Dialysemembran. Auch die Verwendung einer Dialysemembran für Proteinapplikation verbesserte dies kaum. Daher musste in allen Assays mit aus pMAL-c2X-Konstrukten exprimierten Enzymen entweder das Fusionsprotein selbst oder die Mischung aus gespaltenem MBP und Enzym eingesetzt werden.

Für die ACP-AT-Assays wurden zum einen massenanalytische Methoden (5.5.1) und zum anderen Nachweise durch eingebaute Radioaktivität (5.5.2) angewendet. Am Ende der vorliegenden Arbeit wurde auch mit der kinetischen Untersuchung der Assays begonnen (5.5.3). In den Experimenten wurde jeweils DTT zugegeben: die aktivierten ACP enthalten einen Phosphopantetheinarm, der am Ende eine Thiol-Gruppe trägt (Abb. 3.4). Diese Thiol-Gruppe kann mit der anderen *holo*-ACP Dimere bilden, wodurch das Enzym inaktiv wird. DTT reduziert diese *holo*-ACP-Dimere. Ein anderes Reagenz zur Vermeidung dieser inaktiven Form ist TCEP, das hier für die Untersuchung der Kinetik eingesetzt wurde.¹³⁴

5.5.1 ACP-AT-Assay mit massenanalytischen Nachweisen

Die durch die AT katalysierte Reaktion der Substratübertragung auf das *holo*-ACP führt bei Verwendung von Malonyl-CoA **8** zur Bildung von Malonyl-*holo*-ACP (Abb. 3.5 a). Ziel der hier durchgeführten Experimente war es, das während der Reaktion entstandene Protein massenanalytisch zu bestimmen und somit Rückschlüsse auf die Aktivität der AT zu ziehen. Der Assay wurde hauptsächlich in Anlehnung an zwei verschiedene Protokolle durchgeführt (6.16.1 und 6.16.2), wobei insbesondere die Mengen an eingesetzten Protein variiert wurden.^{105, 121} Bei dem Assay nach 6.16.2 sollte entsprechend der Literatur Glycerin zugegeben werden, was sich nach einigen Versuchen aber als störend herausstellte. Für Messungen mittels MALDI-TOF-TOF mussten die Proben nach Aufgabe auf die Matrix komplett trocknen, was sich durch das Vorhandensein von Glycerin kaum realisieren lässt. Daher wurde in weiteren Versuchen, auf die Glycerin-Zugabe verzichtet.

Die Resultate der MALDI-TOF-TOF-Messungen (6.16.3) waren dennoch nicht aussagekräftig, da keine definierten Peaks in den Spektren erkennbar waren (ohne Abb.). Die Messungen wurden jeweils mit *holo*-ACP und zum Vergleich mit *apo*-ACP mit und ohne AT durchgeführt. Zwar konnte ein Unterschied zwischen *apo*-ACP, *holo*-ACP und vermeintlichen Malonyl-ACP erkannt werden, jedoch war eine genaue Bestimmung der Masse aus ungeklärten Ursachen nicht möglich. Die ermittelten Massen wichen sehr stark vom erwarteten Wert ab, obwohl vorherige Messungen der reinen ACP aus den Elutionsfraktionen z. T. erfolgreich waren (5.1.4). Daher wurde zu anderen Methoden übergegangen.

Zum einen wurde versucht, mittels HPLC das Malonyl-ACP vom *holo*-ACP unterscheiden zu können und die entsprechende Fraktion mittels ESI-FT-ICR-MS zu untersuchen. Für PedN zeigte sich im Vorfeld, dass es mit dieser Methode detektierbar ist (Abb. 5.10). Daher wurde für die Assays in der gleichen Weise vorgegangen (vgl. 6.14.2). Es zeigte sich jedoch, dass die gefundenen Peaks von *holo*-PedN und dem vermeintlichen Malonyl-PedN die gleiche Retentionszeit hatten (ohne Abb.). Da die Methode sowieso nur für PedN hätte Verwendung finden können (s. 5.1.4), wurden diesbezüglich auch keine weiteren Versuche unternommen.

Im Anschluss wurden die ACP-AT-Assays mittels Vivaspin 500 Zentrifugaleinheiten entsalzt und die Proben mittels ESI-FT-ICR-MS gemessen (6.16.3). Die erhaltenen Spektren zeigten jedoch nur Salze und einfach geladene Substanzen (Proteine sind mehrfach geladen). Auch eine zusätzliche Dialyse brachte keine Verbesserung der Ergebnisse (ohne Abb.). Dabei konnte u. a. auch beobachtet werden, dass die Proben nach der Entsalzung durch Zugabe von Acetonitril mit TFA trüb wurden. Auch die Verwendung von Methanol und Ameisensäure änderten dies nicht. Diese Methode musste folglich auch aufgegeben werden. ESI-FT-MS wurde schon erfolgreich zur Detektion von Malonyl-ACP angewendet, wobei die Entsalzung mittels HPLC realisiert wurde.¹²¹ Da dies für PedI3 nicht möglich war (s. 5.1.4), konnte auch diese Variante nicht angewendet werden und es wurde die LC-MS getestet.

Für die LC-MS wurden die schon für die HPLC von PedN verwendeten Parameter verwendet und der Lauf entsprechend dem Gerät angepasst. PedN konnte auf diese

Weise auch gemessen werden, PedI3 hingegen konnte nicht gut detektiert werden (ohne Abb.). Da aber beide ACP getestet werden sollten, musste auch eine genaue Analyse der Assays für beide erfolgen. Es wurde daher zu einer komplett anderen Nachweis-Methode gewechselt: die Verwendung von radioaktiv markierten Substrat und Detektion der Übertragung auf die Proteine (5.5.2).

5.5.2 ACP-AT-Assay mit radioaktiv markierten Substraten

Die AT ist neben der Auswahl des Substrates auch für dessen Transfer auf das ACP zuständig (vgl. Abb. 3.5 a). Durch Verwendung von radioaktiv markiertem Substrat sollte diese Übertragung nachvollziehbar sein. Hierzu wurde zum einen [1-¹⁴C]-markiertes Acetyl-CoA **7** und zum anderen [2-¹⁴C] markiertes Malonyl-CoA **8** eingesetzt. Bei Acetyl-CoA **7** handelt es sich um das Starter- und bei Malonyl-CoA **8** um das Elongationssubstrat. Auf die ACP in PedI-1 (Abb. 3.17) als Initiierungseinheit sollte dabei Acetyl-CoA **7**, auf alle anderen ACP Malonyl-CoA **8** übertragen werden. Für die *in trans* agierenden AT kommen PedC und PedD in Frage, wobei auch die GNAT-Domäne möglicherweise die Acetyl-Übertragung auf das direkt danach liegende ACP durchführen könnte.⁴¹

Für die Versuche wurden sowohl die *holo*-ACP als auch die *apo*-ACP von PedI3 und PedN eingesetzt sowie am Ende ebenfalls das putative *holo*-PedGNAT-ACP. Diese Enzyme waren dabei jeweils aus dem Vektor pHIS8-3 *svp* bzw. pHIS8-3 exprimiert (5.1.4). Bei den AT wurden das durch Induktion von pMAL-c2X hergestellte PedC (5.2.1) und das aus pHIS8-3 exprimierte PedD (5.2.2) genutzt. Für besser vergleichbare Resultate sollte PedC zwar ebenfalls als His-Fusionsprotein exprimiert werden, dies gelang jedoch trotz vieler Versuche bisher nicht (5.2.1). Die Assays mit den Enzymen und dem radioaktiven Substrat wurden auf ein Proteingel aufgetragen und dieses nach dem Färben und Trocknen auf einen Detektionsfilm gelegt. Das Autoradiogramm konnte dann mit einem Image-Reader eingelesen werden. Das Ergebnis eines Versuches ist in Abb. 5.26 dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass PedD einen Transfer von radioaktivem Malonyl-CoA **8** nur auf die *holo*-ACP katalysiert. Die *apo*-Enzyme weisen auch bei Gegenwart von PedD keine Radioaktivität auf, folglich wurde kein Malonyl-ACP gebildet. Die Negativkontrollen von *holo*-PedN und *holo*-PedI3 zeigen, dass kein Malonyl-CoA **8** übertragen wurde, das Vorhandensein von PedD folglich notwendig ist.

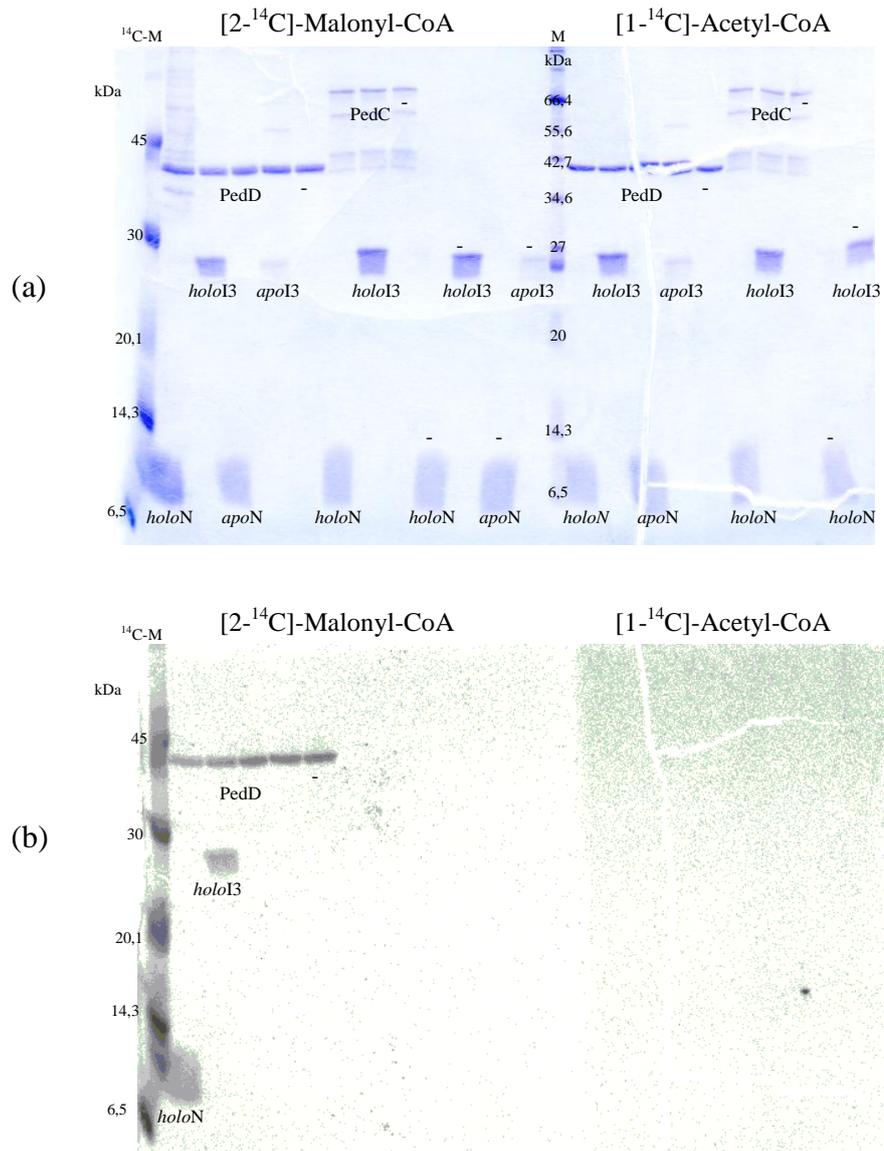


Abb. 5.26: Proteingel und Autoradiogramm des ACP-AT-Assays.

(a) Proteingel ACP-AT-Assay mit ^{14}C -markiertem Substrat

(b) Autoradiogramm von Proteingel des ACP-AT-Assays mit ^{14}C -markiertem Substrat

Der Enzym-Assay wurde entsprechend 6.16.4 durchgeführt und das Proteingel für 65 h auf dem Detektionsfilm belassen. Der Film wurde eingelezen und bearbeitet.

-, Negativkontrolle (Assay nur mit AT oder nur mit ACP); $^{14}\text{C-M}$, ^{14}C -markierter Proteinmarker Rainbow (CFA755); M, Marker (RotiMark Standard)

Expressionsbedingungen: PedD: pKZ178-1 / *E. coli* BL21 DE3, 200 ml LB Kn⁵⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 21,5 h; PedC: pH66 / *E. coli* ER2566, 200 ml RM Amp¹⁰⁰, 0,5 mM IPTG, 16 °C, 24 h; *holoN* = *holo*-PedN: pKZ124-17 / *E. coli* BL21 DE3, 1 l LB Kn⁵⁰, 0,4 mM IPTG, 16 °C, 22 h; *apoN* = *apo*-PedN: pKZ161-1 / *E. coli* BL21 DE3, 1 l LB Kn⁵⁰, 0,4 mM IPTG, 16 °C, 22 h; *holoI3* = *holo*-PedI3: pKZ123-19 / *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS, 1 l LB Kn⁵⁰ Tet^{12,5} Str⁵⁰ Cm³⁴, 0,4 mM IPTG, 16 °C, 22 h; *apoI3* = *apo*-PedI3: pKZ176-1 / *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS, 1 l LB Kn⁵⁰ Tet^{12,5} Str⁵⁰ Cm³⁴, 1 mM IPTG, 16 °C, 22 h; Expression nach 6.13; Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II; verwendete Elutionsfraktionen für Assay: His₈-Fusionsproteine: Lysepuffer II + 100 mM Imidazol, MBP-PedC: e1. Die Elutionsfraktionen von *holo*-PedN und *apo*-PedN wurden 1:10 mit Lysepuffer II verdünnt. SDS-PAGE: 15% Trenngel

Um einen Transfer des Substrates gewährleisten zu können, wird dieses vorher an die AT unter Bildung von Malonyl-AT gebunden.^{43, 91} Dies erfolgt daher auch, wenn keine Möglichkeit besteht, das Substrat weiterzugeben (wie bei der Negativkontrolle oder den *apo*-ACP). Daher erscheint in Höhe von PedD immer ein Signal auf dem Autoradiogramm. Aus den Ergebnissen des Autoradiogramms kann geschlossen werden, dass PedD als AT für die Übertragung des Elongationssubstrates Malonyl-CoA **8** sowohl auf *holo*-PedN als auch auf *holo*-PedI3 zuständig ist. Da das Substrat nicht an die *apo*-ACP weitergereicht wurde, obwohl die Bindung an PedD bestand, konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der ACP erforderlich ist.

Weiterhin ist aus Abb. 5.26 ersichtlich, dass die AT PedC keine Aktivität gegenüber Malonyl-CoA **8** aufweist. Es zeigt in keiner Spur eine Übertragung der Radioaktivität. In vorherigen Experimenten (ohne Abb.) wurde das MBP-Fusionsprotein von PedC auch nach der Spaltung mit der Protease Xa eingesetzt. Eine Trennung des MBP vom Enzym konnte nicht erfolgen (s. 5.5), daher wurde die Mischung aus ungespaltenem Protein, MBP und interessierendem Enzym eingesetzt. In den entsprechenden Autoradiogrammen erfolgte aber trotzdem kein Transfer auf das abgespaltene PedC. Es stellt sich daher die Frage, ob PedC tatsächlich inaktiv ist oder ob die Ursache in einer Fehlfaltung des exprimierten MBP-Fusionsproteins liegt. Selbst das Abspalten des MBP muss nicht zwangsläufig zur Wiedererlangung der Aktivität führen, da eine Fehlfaltung des Proteins schon während der Expression stattfinden kann. Erfolgreiche Enzym-Assays mit MBP-Fusionsproteinen in der vorliegenden Arbeit (vgl. 5.6.1) bzw. der Literatur^{116, 117} beweisen zwar das Gegenteil, jedes Protein verhält sich aber anders. Daher können hier keine endgültigen Schlussfolgerungen gezogen werden. Eine Klärung dieser Frage könnte erreicht werden, indem PedC als His-Fusionsprotein exprimiert wird. Dies schlug bisher trotz vieler Versuche fehl (5.2.1). Bei gleichem Resultat als His-Fusionsprotein würde dies zeigen, dass PedC nicht zur Übertragung von Malonyl-CoA **8** fähig ist.

Bei Betrachtung der Spuren für Acetyl-CoA **7** in Abb. 5.26 zeigt sich im Autoradiogramm, dass weder PedD noch PedC in der Lage sind, das Substrat zu binden und es dann zu übertragen. Für PedC ergibt sich bei der Auswertung wieder das oben diskutierte Problem, ob es am fusionierten MBP liegt oder auch hier keine

Aktivität vorliegt. Es könnte folglich lediglich noch als evolutives Relikt im Gencluster vorliegen, für die Polyketidproduktion aber keine Bedeutung haben. Für PedD hingegen kann eindeutig festgestellt werden, dass es keinerlei Aktivität für Acetyl-CoA **7** als Substrat aufweist. Da die Reaktion mit Malonyl-CoA **8** erfolgreich war, das Enzym also funktionstüchtig ist, hätte bei vorhandener Aktivität auch ein Signal detektiert werden müssen. Da dies nicht der Fall ist, ist PedD nur für Malonyl-CoA **8**, d. h. für das Elongationssubstrat, zuständig. Dabei erfolgt der Transfer nur auf die *holo*-ACP und zwar sowohl auf PedN als auch auf PedI3. Diesbezüglich scheint die AT PedD keine Unterschiede zu machen. Es liegt daher eine Substrat-, nicht aber eine ACP-Spezifität vor. Andere Studien zeigen eine hohe Substratspezifität der AT, die für die Verlängerungseinheit zuständig ist, und eine niedrige Spezifität der für die Startersubstanz verantwortlichen AT.^{130, 133} Da PedD eine hohe Substrat-Spezifität aufweist, sollte es sich um die AT für das Elongationssubstrat handeln. Im *pksX*-Gencluster zur Bacillaen-Biosynthese konnten drei *in trans* agierende AT gefunden werden, während aber nur eine für die Beladung mit Malonyl-CoA **8** zuständig ist. Diese AT (PksC) zeigt auch keine Substratspezifität gegenüber Acetyl-CoA **7** und Methylmalonyl-CoA **13**. Zu den anderen beiden AT sind momentan noch keine weiteren Untersuchungen veröffentlicht.^{44, 91} Die AT für das Elongationssubstrat im Erythromycin-Gencluster weisen ebenfalls hohe Substratspezifität auf, während dies für die Starter-AT weniger stark ausgeprägt ist.¹³⁰ Im Leinamycin-Gencluster hingegen existiert wie erwähnt nur eine AT, die alle im Cluster vorkommenden ACP mit Malonyl-CoA **8** belädt.⁴³

In vorherigen Versuchen der ACP mit den AT konnte festgestellt werden, dass bei längerer Inkubation und höherer Temperatur auch ein Transfer von Malonyl-CoA **8** auf das *holo*-ACP stattfindet, wenn keine AT anwesend ist. Hierbei handelt es sich um eine nichtenzymatische Substratbeladung, die auch schon bei der *holo*-ACP PksL aus dem *pksX*-Gencluster beobachtet wurde.⁹¹ Auch für ACP aus FAS wurde diese Selbstbeladung bei längeren Inkubationszeiten und hohen Substratkonzentrationen detektiert.¹⁰⁵ In einer anderen Studie zu FAS konnte bei bestimmten Bedingungen eine substratspezifische Selbst-Acylierung der ACP beobachtet werden, wobei die entsprechenden radioaktiven Signale bei AT-Anwesenheit aber bedeutend stärker waren.¹³⁵ In der natürlichen Umgebung der PKS herrschen andere Konditionen als

bei den durchgeführten *in vitro* Assays und sind im Labor nur ansatzweise imitierbar. Bei ACP, die zu Typ-II-PKS zählen, kann die Selbstmalonylierung ebenfalls beobachtet werden. Bei diesem PKS-Typ liegt häufig keine AT im Gencluster vor und es wurde vermutet, dass AT aus der Fettsäurebiosynthese für die Substratbeladung rekrutiert werden.⁹ *In vitro*-Studien mit chemisch synthetisierten ACP zeigten jedoch ebenfalls eine Malonylierung, obwohl eine AT-Kontaminierung ausgeschlossen werden konnte. Folglich haben diese ACP die Fähigkeit, sich selbst mit dem Substrat zu beladen.^{9, 136}

Die bisherigen Ergebnisse und Schlussfolgerungen werfen aber dann die Frage auf, wie das Startersubstrat Acetyl-CoA **7** auf das ACP im Lademodul PedI1 (vgl. Abb. 3.16 bzw. 3.17) übertragen wird. Wäre PedC tatsächlich inaktiv, ist der Transfer durch die GNAT-Domäne eine plausible Möglichkeit. In aktuellen Untersuchungen der GNAT-Domäne des Curacin A-Genclusters konnte gezeigt werden, dass das Enzym sowohl eine Decarboxylase- als auch eine Acetyltransferase-Aktivität besitzt.⁸⁶ Dabei wurde bewiesen, dass es in der Lage ist, zum Beispiel Malonyl-CoA **8** zu decarboxylieren und das gebildete Acetyl-CoA **7** auf das *holo*-ACP zu übertragen. Der Phosphopantetheinarm des Proteins spielt dabei eine entscheidende Rolle, was durch die Kristallstruktur von GNAT belegt wurde. Es scheint sich folglich um eine völlig andere Art der Ketteninitiierung zu handeln als bisher beschrieben. Homologien wurden auch zum *ped*- und zum *onn*-Gencluster gefunden. Die GNAT scheint in allen Fällen für den Start der Polyketidbiosynthese durch Acetyl-CoA **7**-Übertragung verantwortlich zu sein. Dabei ist es nicht erforderlich, dass dieses als Substrat vorliegt, da die erwähnte Umsetzung aus Malonyl-CoA **8** katalysiert werden kann.⁸⁶

Durch Expression der GNAT-ACP-Domäne sollte die Funktion der GNAT in der Pederin-Biosynthese geklärt werden. Jedoch wurde dies erst am Ende der Arbeit durchgeführt und dementsprechend waren nur begrenzt Versuche möglich. Die GNAT und das darauf folgende ACP wurden in einem Protein hergestellt, wodurch theoretisch das Acetyl-CoA **7** in jedem Fall am Protein gebunden sein müsste, unabhängig davon, ob schon der Transfer zum ACP stattgefunden hat oder nicht. Bei Malonyl-CoA **8** sollte ebenfalls eine Übertragung stattfinden, vorausgesetzt, die oben erwähnte Decarboxylierung findet statt. Da als Substrat [2-¹⁴C]-Malonyl CoA **8** genutzt wird, verbleibt die Radioaktivität auch bei CO₂-Abspaltung am Molekül. Ob

das auf das *holo*-ACP transferierte Substrat aber dann tatsächlich Acetyl ist, kann nur durch massenanalytischen Nachweis erfolgen.

Die GNAT-ACP-Didomäne wurde für den Assay aus pHIS8-3 *svp* exprimiert, das enthaltene ACP sollte folglich in der *holo*-Form vorliegen (bisher unbestätigt, s. 5.1.4). Das Protein wurde sowohl mit radioaktiv markiertem Acetyl-CoA **7** als auch Malonyl-CoA **8** inkubiert, ein Proteingel angefertigt und die übertragene Radioaktivität des Autoradiogramms dokumentiert. Aufgrund der geringen Enzymmenge in der Elutionsfraktion (vgl. Abb. 5.14) konnte die Didomäne nicht auf dem Proteingel gesehen werden. Auch das Autoradiogramm zeigte keine Signale. Dies liegt aber mit sehr großer Wahrscheinlichkeit an den geringen Enzymmengen. Der Versuch sollte wiederholt werden unter vorheriger Aufkonzentrierung der Probe und auch die Optimierung der Expression sollte zu höheren Proteinmengen führen. Aus Zeitgründen konnte dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr erfolgen.

Die bisherigen Ergebnisse bezüglich der Aktivität von Ped D für Malonyl-CoA **8** und der anscheinenden Inaktivität von PedC deuten auf die Funktion der GNAT als Ladedomäne für Acetyl-CoA **7** hin. Weitere Versuche mit radioaktiv markiertem Substrat und der exprimierten Domäne sollten aber noch durchgeführt werden, um diese Vermutung zu beweisen. Des Weiteren könnte auch eine erneute Klonierung des Genbereichs erfolgen mit einer längeren Genregion vor der GNAT. In der oben diskutierten Literaturstudie⁸⁶ wird auch von einer sogenannten Adapter-Domäne (AR) berichtet, die direkt vor der GNAT liegt und anscheinend für einen effizienten Acetyltransfer verantwortlich ist. Die der Klonierung von GNAT-ACP zugrunde liegende Sequenz wurde durch Alignment mit *onnB* ermittelt und vor dem vermuteten Startcodon von *pedI* noch 141 bp (47 Aminosäuren) zur Sicherheit hinzugenommen. Die AR-Domänen in der im Verlauf dieser Arbeiten erschienenen Veröffentlichung haben aber eine Länge von ca. 180 Aminosäuren und starten bis zu 500 Aminosäuren vor der GNAT.⁸⁶ Zwar scheint weder *onnB* noch *pedI* die AR-Domäne zu besitzen, allerdings sollte dennoch ein Alignment mit entsprechenden Sequenzen der in der Studie⁸⁶ aufgeführten Gencluster von Curacin A, Myxovirescin A und Rhizoxin durchgeführt werden. Dies sollte zeigen, ob eine längere Genregion vor der GNAT einer AR entspricht und mit kloniert werden sollte.

5.5.3 Kinetik der ACP-AT-Assays

Die Verwendung von radioaktiv markiertem Substrat zeigte, dass die exprimierte AT PedD eine Aktivität für die Übertragung von Malonyl-CoA **8** auf die ACP *holo*-PedN und *holo*-PedI3 besitzt (5.5.2).

Um die spezifischen Kenngrößen k_{cat} (Maß der Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung) und K_m (Substratkonzentration bei Halbsättigung) zu ermitteln, sollte daher noch eine Untersuchung der Kinetik der betrachteten Reaktionen angeschlossen werden. Dafür wurde PedD und das jeweilige ACP in einem Assay mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen eingesetzt. Im vorliegenden Fall wurde ein gekoppelter Assay genutzt¹³⁴ (Abb. 5.27). Dabei wird das bei der Reaktion von Malonyl-CoA **8** und *holo*-ACP zu Malonyl-ACP freiwerdende Coenzym A **14** für eine weitere Reaktion genutzt, die unter Coenzym A **14** -Verbrauch abläuft. Bei dieser wird gleichzeitig NAD^+ zu NADH reduziert, wobei Letzteres sein Absorptionsmaximum bei 340 nm hat. Die Extinktionszunahme bei dieser Wellenlänge ist dann ein Maß für den Umsatz bei der eigentlich betrachteten Reaktion. Sie kann in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt werden.

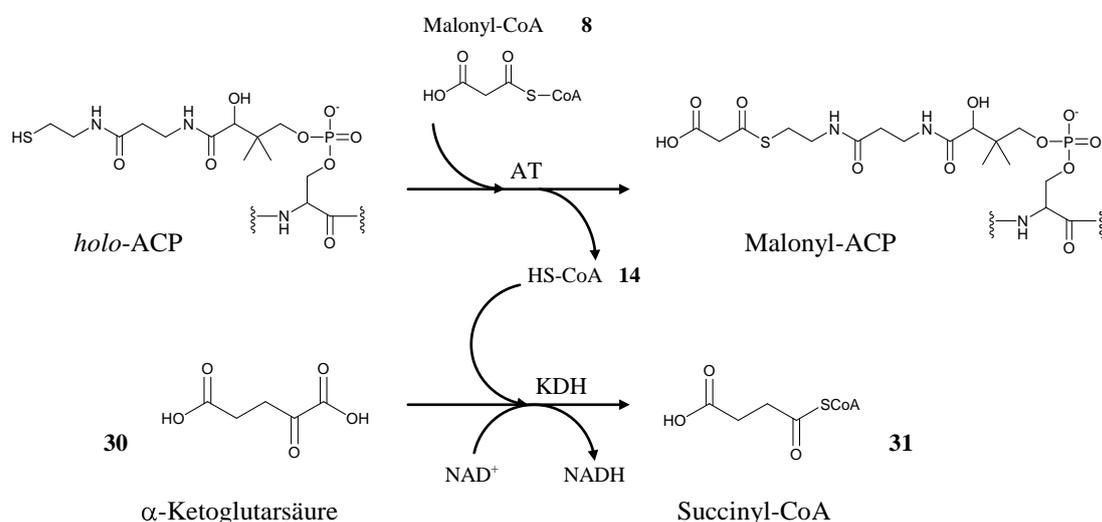


Abb. 5.27: Reaktionen des gekoppelten Assays für die ACP-AT-Kinetik.

Katalysiert durch die AT, wird das Substrat Malonyl-CoA **8** auf das *holo*-ACP übertragen und setzt dabei Coenzym A **14** frei (CoASH). Dieses wird genutzt für die durch die α -Ketoglutarate-Dehydrogenase (KDH) katalysierte Reaktion von α -Ketoglutarate **30** zu Succinyl-CoA **31**. Dabei wird gleichzeitig NAD^+ zu NADH reduziert, das bei 340 nm im Photometer gemessen werden kann.

Der Anstieg im linearen Bereich der ermittelten Kurve ist ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit und sollte abhängig von der eingesetzten Substratkonzentration sein. Der Assay wurde in Anlehnung an die Literatur^{125, 134} entsprechend 6.16.5 durchgeführt, wobei bei Vorversuchen festgestellt wurde, dass auch bei den Blindwerten ein Extinktionsanstieg zu verzeichnen war. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise im Vorhandensein von ungebundenem Coenzym A **14** im eingesetzten Substrat Malonyl-CoA **8**. Dabei kann freies CoASH **14** von 5-10% auftreten (persönliche Mitteilung von P. Beltran, University of Bristol, UK). Dieses würde dann ebenso zur NADH-Zunahme führen wie das freiwerdende CoASH **14** bei der Reaktion von *holo*-ACP zu Malonyl-ACP (s. Abb. 5.27). Um die dadurch stärkere Extinktionszunahme zu eliminieren, wurden auch zu den Blindwerten zeitabhängige Kurven aufgenommen. Die zu den jeweiligen Zeitpunkten bestimmten Extinktionswerte wurden dann entsprechend von der Größe abgezogen, die bei der eigentlichen ACP-Substrat-Reaktion bestimmt wurde. Dadurch sollte nur noch eine Absorption übrig bleiben, die dem tatsächlich bei der Reaktion freiwerdenden Coenzym A **14** entspricht. Diese Absolutwerte sind zeitabhängig für *holo*-PedN mit PedD bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen in Abb. 5.28 dargestellt. Wie in der Graphik erkennbar ist, haben die Absolutwerte der Messung relativ niedrige Werte. Bei Ermittlung einer Regressionsgeraden hätte diese jeweils einen Anstieg von 9×10^{-5} , jedoch für beide Substratkonzentrationen. Für die Bestimmung der kinetischen Kenngrößen müsste dieser Anstieg unterschiedlich sein. Bei der Durchführung der Versuche konnte außerdem festgestellt werden, dass die Daten kaum reproduzierbar sind und selbst die ermittelten Blindwerte stark voneinander abweichen. Die dargestellte Kurve ist folglich nicht repräsentativ, zumindest in Bezug auf die Zahlenwerte. Die Tendenz in den einzelnen Kurven hingegen konnte in allen Versuchen bestätigt werden. So lässt sich deutlich eine Aktivität der AT PedD gegenüber *holo*-PedN erkennen. In den Negativkontrollen, die entweder nur *holo*-PedN oder nur PedD enthielten, konnte dies nicht festgestellt werden. Wie auch schon in den Versuchen mit radioaktiv markiertem Substrat festgestellt wurde (5.5.2), erfolgte keine Beladung von *apo*-PedN mit Substrat durch die AT PedD. Diese Kurve gleicht denen der Negativkontrollen.

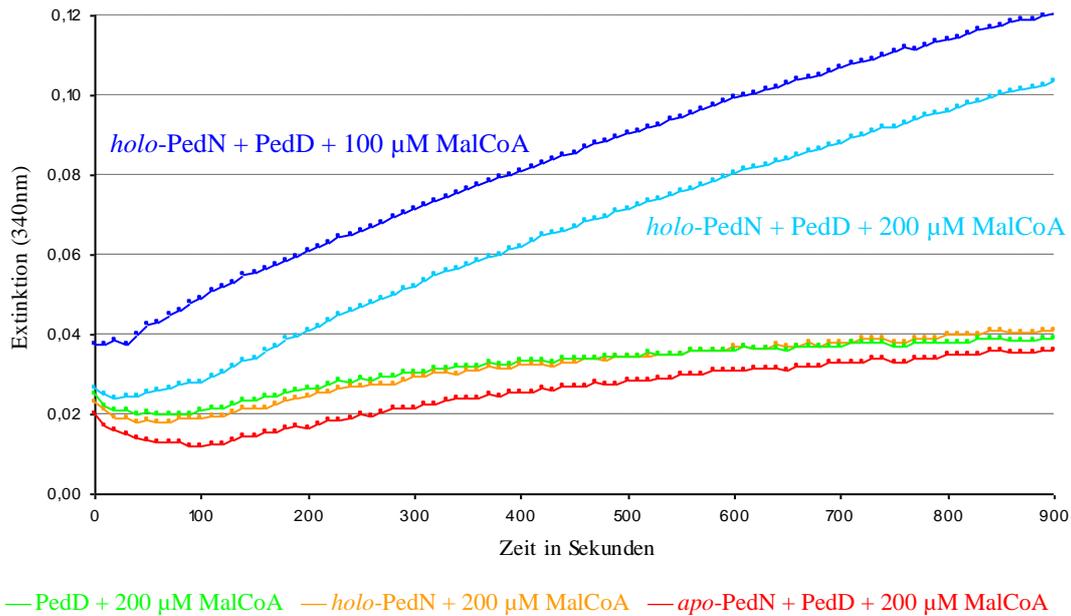


Abb. 5.28: Ergebnisse der Kinetikuntersuchung von PedN und PedD.

Die Untersuchung der Kinetik der ACP PedN und der AT PedD wurde entsprechend 6.16.5 bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen Malonyl-CoA **8** (MalCoA) durchgeführt. Die abgezogenen Blindwerte enthielten jeweils dieselbe Menge Substrat. Die so erhaltenen Extinktionswerte wurden gegen die Zeit aufgetragen. Von den Proteinen wurden jeweils die Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol verwendet, wobei 25 µl *holo*-PedN (2,5 mg/ml) bzw. *apo*-PedN (2,6 mg/ml) und 10 µl PedD (0,5 mg/ml) pro Ansatz genutzt wurden.

Expressionsbedingungen der eingesetzten Enzyme: *holo*-PedN: pKZ124-17 / *E. coli* BL21 DE3, 1 l LB Kn⁵⁰, 0,4 mM IPTG, 16 °C, 22 h; PedD: pKZ178-1 / *E. coli* BL21 DE3, 200 ml LB Kn⁵⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 21,5 h; *apo*-PedN: pKZ161-1 / *E. coli* BL21 DE3, 1 l LB Kn⁵⁰, 0,4 mM IPTG, 16 °C, 22 h; Expression entsprechend 6.13; Aufreinigung nach 6.13.2 mit Lysepuffer II

In den durchgeführten Versuchen konnte des Weiteren festgestellt werden, dass ein geringerer Anstieg der Kurve vorliegt, wenn *holo*-PedN und PedD älter als 1 Woche ist (Lagerung bei 4 °C). Für zukünftige Versuche sollte folglich darauf geachtet werden, dass sich kinetische Untersuchungen relativ rasch an die Proteinexpression anschließen. Die Durchführung des Assays unter Verwendung der ACP PedI3 und der AT PedD zeigte keinen Anstieg in allen Fällen. Dies liegt begründet in der Proteinkonzentration von *holo*-PedI3. In den weitaus sensitiveren Radioaktivversuchen wurde PedN jeweils 1:10 verdünnt, um eine ähnliche Größenordnung der Enzymkonzentrationen zu erreichen. Folglich wäre für die gleichen Kinetik-Ergebnisse der beiden ACP eine vielfach höhere Proteinkonzentration von PedI3 notwendig. Durch Aufkonzentrierung mittels Vivaspin 500-Zentrifugaleinheiten wäre dies zwar prinzipiell möglich, dabei ist aber

immer von einem Aktivitätsverlust auszugehen. Besser wäre ein etwas größerer Kultivierungsansatz unter Elution mit niedrigeren Volumina. Dies sollte eine höhere Konzentration des Proteins bewirken.

Aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und den bisher nicht aussagekräftigen Ergebnissen in Bezug auf unterschiedliche Malonyl-CoA **8**-Konzentrationen, wurde von der Bestimmung der Kenngrößen k_{cat} und K_m abgesehen. Für deren Ermittlung sind mehrere verschiedene Substratkonzentrationen erforderlich, die jeweils einen unterschiedlichen Anstieg aufweisen sollten. Dahingehend müssen noch weitere Überlegungen angeschlossen werden, wie die Versuchsdurchführung abgeändert werden kann, um insbesondere reproduzierbare Ergebnisse und höhere Absolutwerte zu erzielen. Theoretisch sollte sich auch eine Sättigung einstellen, die vom linearen Bereich der Kurve abgegrenzt werden kann. Ein weiterer großer Einflussfaktor stellt die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KDH) dar. Die vom Hersteller angegebene Enzymaktivität entspricht nicht immer der tatsächlich vorliegenden (persönliche Mitteilung von P. Beltran, University of Bristol, UK). Daher sollte im Vorfeld die Aktivität der KDH durch Verwendung von Coenzym A **14** getestet werden. Mit α -Ketoglutarat **30** als Substrat und NAD^+ als Cosubstrat sollte dann eine Extinktion bei 340 nm gemessen werden können. Möglicherweise hatte die verwendete KDH eine geringere Aktivität als angenommen und daher rühren die geringen Extinktionswerte. In einer Veröffentlichung, die denselben Assay zur Untersuchung von AT und ACP einer FAS nutzte, wurden die Bestandteile in einer bestimmten Reihenfolge zusammengegeben. Diese lagen jeweils als Stammlösungen in Puffer vor.¹³⁷ Die Verwendung von Stammlösungen i. a. sollte auch zur Reproduzierbarkeit beitragen. Ebenso ist es günstig, alle Reaktionspartner bis auf die Proteine zusammenzugeben und kurz zu inkubieren, damit das bereits erwähnte freie CoA **14** in Malonyl-CoA **8** abreagieren kann (persönliche Mitteilung von P. Beltran, University of Bristol, UK). Die Experimente sollten auch immer mit frisch exprimierten hoch konzentrierten Proteinen über einen längeren Zeitraum durchgeführt und einzelne Parameter geändert werden, um ihren Einfluss detektieren zu können. Die Messungen sollten dabei immer mindestens dreifach ausgeführt werden. Sehr günstig wäre auch die in der Literatur angewendete Nutzung von Mikrotiterplatten, da auf diese Art gleichzeitig viele Versuche durchgeführt werden können und somit Fehler minimiert werden.^{125, 134, 137}

Die Nutzung des gekoppelten Assays stellt prinzipiell eine geeignete Variante zur Bestimmung der kinetischen Parameter dar, durch diverse genannte Änderungen der Versuche sollte er aber noch optimiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte dies aus zeitlichen Gründen nicht mehr erfolgen.

5.6 O-MT-Assay

Für die Untersuchung der O-MT aus dem *ped*-Gencluster bot sich die Verwendung von Mycalamid A **25** und B **32** an, da die beiden zur Pederinfamilie zählenden Substanzen weniger O-Methylierungen aufweisen als Pederin **23**. Wie unter 3.8.2 erwähnt, werden im *ped*-Gencluster (Abb. 3.16) drei O-MT codiert (PedA, PedE und PedO), während Pederin **23** vier Methoxygruppen aufweist. Daher war ein Hauptaspekt der Arbeit, nähere Information über die Regioselektivität der drei Enzyme zu erfahren. Hierzu war eine Expression und Reinigung der Proteine notwendig, was für die drei O-MT aus dem *ped*-Gencluster sowohl als MBP- als auch als His₈-Fusionsprotein erfolgreich war (vgl. 5.3.1 und 5.3.2). Bei den verwendeten Substraten handelte es sich um reine Feststoffe, die der Extraktion des Schwammes *Mycale hentscheli* (Ordnung: Poecilosclerida, Familie Mycalidae) entstammen.^{71, 138, 139}

Die O-MT OnnD wurde durch Sequenzvergleiche mit den O-MT aus dem *ped*-Gencluster zu Beginn der Arbeit für die O-Methylierung an C13 verantwortlich gemacht. Diese Methoxygruppe kommt in Onnamid A **26** vor, jedoch nicht in Pederin **23**. Daher sollte für diese O-MT Pederin **23** als Substrat verwendet werden, um zu klären, ob die erwähnte O-Methylierung stattfindet. Das Enzym wurde als MBP-Fusionsprotein erfolgreich exprimiert (5.3.1), als His₈-Fusionsprotein konnte allerdings kein lösliches Protein erhalten werden (5.3.2). Pederin **23** wurde aus dem Ethanol-Extrakt von Käfern der Gattung *Paederus* gewonnen. In dem Lösungsmittel befanden sich neben dem Polyketid folglich auch andere Substanzen wie Lipide. Um Fehlerquellen durch zusätzliche Bestandteile im Extrakt auszuschließen, mussten diese vor der Durchführung des Assays entfernt werden. Dies erfolgte durch Ausschütteln mit *n*-Hexan und folgender Kieselgelchromatographie. Die Pederin **23**-enthaltenen Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie entsprechend 6.17.1 ermittelt, vereinigt und eingengt. Die Messung mittels ESI-FT-ICR-MS vor

und nach der Reinigung zeigte eine deutliche Verbesserung der Probenqualität (ohne Abb.).

Die für die *O*-MT-Assays relevanten Strukturen sind unter Hervorhebung der signifikanten Methoxygruppen in Abb. 5.29 dargestellt. Die Substanzen gehören alle zur Pederinfamilie.

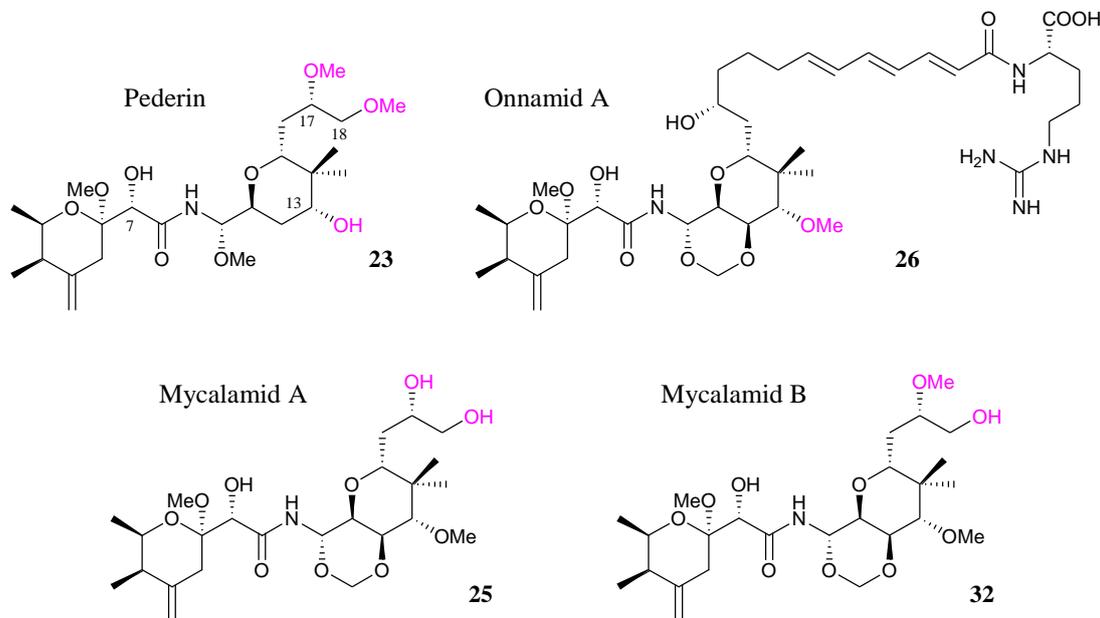


Abb. 5.29: Relevante Strukturen für die *O*-MT-Assays.

Die Hydroxylgruppen bzw. methylierten Hydroxylgruppen, die für die Betrachtung der *O*-MT-Assays von Bedeutung sind (an C13, C17 und C18), sind farbig hervorgehoben.

Die drei Substrate für die *O*-MT-Assays (Mycalamid A **25** und B **32**, Pederin **23**) wurden in Acetonitril (ACN) aufgenommen und mit Wasser verdünnt. Vorherige Versuche mit Pederin **23** zeigten, dass sich das Polyketid auch in Wasser/ACN-Mischungen löst (6.17.2, ohne Abb.). Da die drei Polyketide eine enge strukturelle Verwandtschaft aufweisen, lassen sich diese Resultate auch auf Mycalamid A **25** und B **32** übertragen. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der beiden letztgenannten Stoffe wurden die Experimente nicht mit ihnen wiederholt. Da die anschließenden Assays *in vitro* durchgeführt wurden, sollte die Lösungsmittelmenge so gering wie möglich gehalten werden, um keinen störenden Einfluss auf die Enzyme auszuüben.

5.6.1 O-MT-Assay mit PedA, PedE und PedO

Wie oben beschrieben lagen die drei O-MT PedA, PedE und PedO sowohl als MBP- als auch als His₈-Fusionsproteine vor. Die Enzyme wurden zunächst mit Mycalamid A **25** entsprechend 6.17.3 im O-Methylierungs-Assay mit S-Adenosylmethionin (SAM) als Kofaktor eingesetzt und mittels ESI-microQ-TOF-MS analysiert. Dabei wurde als Negativkontrolle das Polyketid ohne Protein verwendet. Die erhaltenen Massenspektren sind in Abb. A.4 dargestellt. Die verwendeten Proteinmengen wurden dabei so gewählt, dass in etwa gleiche Konzentrationen im Assay vorlagen, da die His₈-Fusionsproteine jeweils eine niedrigere Enzymkonzentration aufwiesen als die MBP-Fusionsproteine. Dadurch waren die erhaltenen Ergebnisse relativ gut miteinander vergleichbar. Dabei konnte festgestellt werden, dass PedO in der Lage ist, sowohl als MBP- als auch als His₈-Fusionsprotein Mycalamid A **25** an einer Position zu methylieren (Abb. A.4 e und f bzw. Abb. 5.30). Die Umsetzung erfolgte dabei nicht vollständig, da der entsprechende Peak für Mycalamid A **25** im Spektrum noch zu sehen ist. Die beiden anderen O-MT zeigten keine Aktivität gegenüber dem Substrat (Abb. A.4 a-d). Mit PedO wurde der Assay mehrfach wiederholt, um die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses zu prüfen. Dabei wurde das Enzym jeweils frisch exprimiert und eingesetzt. Abb. 5.30 zeigt ein so erhaltenes Massenspektrum.

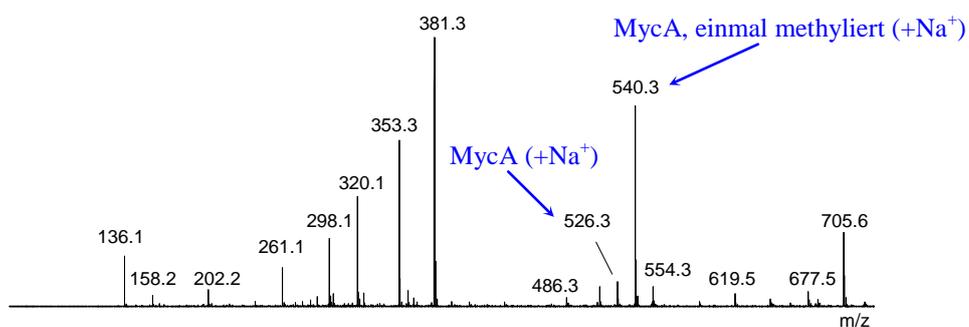


Abb. 5.30: Massenspektrum des Assays von PedO mit Mycalamid A.
MBP-PedO + Mycalamid A **25** (Enzym aus pKZ158-1 / *E. coli* ER2566)

Die Durchführung des Assays erfolgte entsprechend 6.17.3 mit 100 μ l der Elutionsfraktion e1 des Enzyms und 50 μ l Mycalamid A **25** (200 μ M). Die organische Phase wurde anschließend mittels ESI-microQ-TOF-MS gemessen. Expressionsbedingungen: pKZ158-1 / *E. coli* ER2566: 200 ml RM Amp¹⁰⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 24 h; Expression nach 6.13, Aufreinigung nach 6.13.1.1; MycA, Mycalamid A **25**

Bei Vergleich des Spektrums in Abb. 5.30 mit dem in Abb. A.4 e (jeweils MBP-PedO + Mycalamid A **25**) fällt auf, dass der Peak für das methylierte Mycalamid A **25** in Abb. 5.30 eine höhere Intensität aufweist. Die Ursache hierfür liegt darin begründet, dass bei dem erneut durchgeführten Assay (Abb. 5.30) das Enzym direkt nach der Aufreinigung eingesetzt wurde, während das Protein bei dem vorherigen Versuch (Abb. A.4 e) kurzzeitig bei 4 °C lagerte. Folglich verliert das Enzym sehr schnell an Aktivität und kann weniger Mycalamid A **25** methylieren. Es besteht folglich ein direkt beobachtbarer Zusammenhang zwischen dem eingesetzten Enzym und der Menge an methyliertem Mycalamid A **25**. Dies und die erfolgte *O*-Methylierung sowohl durch das MBP-Fusionsprotein als auch durch das His₈-Fusionsprotein von PedO zeigen eindeutig dessen Funktion als *O*-MT. Da die Molekülmassen der gemessenen Substanzen relativ klein sind, liegt in den Massenspektren nicht wie bei den Proteinen ein Isotopenmuster vor. Die bestimmten Massen entsprechen der monoisotopischen Masse.¹¹⁰

Um zu bestätigen, dass die im Massenspektrum (Abb. 5.30 bzw. A.4 e und f) zusätzlich auftauchende Masse von 540,3 Da tatsächlich der von methyliertem Mycalamid A **25** entspricht (vgl. Negativkontrolle Abb. 5.4 g), wurde eine Hochauflösung des Spektrums durch externe Kalibrierung mit Natriumformiat durchgeführt. Dadurch können korrektere Massen ermittelt werden, da die interne Gerätekalibrierung nur eine Genauigkeit von 0,1 Da zulässt. Durch Vergrößerung des Spektrum-Ausschnitts können auch die Peaks der Isotopen gesehen werden. Da die Substanzen aber wie erwähnt relativ geringe Massen aufweisen, entspricht der Hauptpeak der monoisotopischen Masse, die i. a. auch als exakte Masse bezeichnet wird. Die Hochauflösung der interessierenden Peaks konnte dann mit den zu erwartenden Spektren bei den jeweils vorliegenden Summenformeln verglichen werden (Abb. 5.31). Dabei zeigte sich im Fall des MBP-Fusionsprotein von PedO eine perfekte Übereinstimmung mit der Summenformel des monomethylierten Mycalamid A **25**. Der *O*-Methylierungsassay mit dem His₈-Fusionsprotein von PedO wurde ebenfalls massenanalytisch mit externer Kalibrierung untersucht (ohne Abb.). Diese Hochauflösung wies dieselben Ergebnisse auf, die schon mit MBP-Fusionsprotein erbracht wurden. In jedem Fall wird folglich das *O*-methylierte Mycalamid A **25** erzeugt.

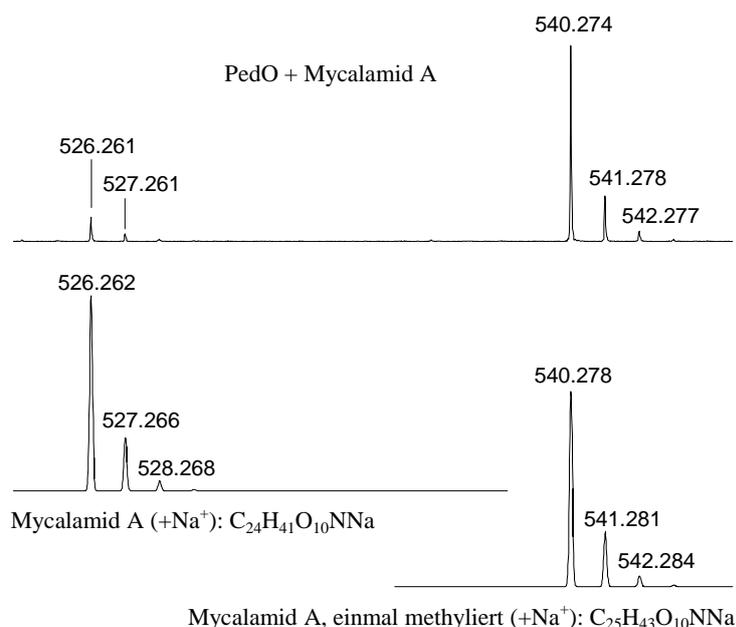


Abb. 5.31: Hochauflösung des Massenspektrums vom PedO-Mycalamid A-Assay.

Das Massenspektrum vom *O*-MT-Assay von MBP-PedO (aus pKZ158-1) mit Mycalamid A **25** (Abb. 5.30) wurde extern kalibriert mit Natriumformiat, um exaktere Massen zu erhalten. Vergleichend dazu wurde das theoretische Spektrum von Mycalamid A **25** (+ Na⁺) und von Mycalamid A **25** mit einer methylierten OH-Gruppe (+Na⁺) ermittelt und ebenfalls abgebildet. Die Durchführung des Assays, die entsprechenden Expressionsbedingungen zur Enzymherstellung und die Aufarbeitung sind in der Legende von Abb. 5.30 erläutert.

Durch die erhaltenen Ergebnisse lässt sich eindeutig zeigen, dass PedO in der Lage ist, eine Methylgruppe auf Mycalamid A **25** zu übertragen. Da **25** aber mehrere freie Hydroxylgruppen aufweist, können mit den bisherigen Massenbestimmungen keine Rückschlüsse auf die Regiochemie der *O*-Methylierung gezogen werden. Zum einen besitzt das Substrat an den Stellen C17 und C18 OH-Gruppen, zum anderen wäre auch eine *O*-Methylierung an C7 möglich. Weder Pederin **23** noch Mycalamid A **25** weisen an C7 eine Methoxygruppe auf, folglich sollten in den entsprechenden Biosynthesegenclustern auch keine *O*-MT codiert sein, die eine solche Methylierung durchführen. Trotzdem kann diese mögliche *O*-Methylierungsstelle nicht völlig ausgeschlossen werden.

Im Folgenden wurden die *O*-Methylierungsassays mit Mycalamid B **32** durchgeführt. Dabei zeigte keines der eingesetzten Enzyme eine Aktivität (Abb. A.5). Für PedA und PedE stellt dies kein überraschendes Ergebnis dar, da sie auch nicht in der Lage waren, Mycalamid A **25** zu methylieren. Für PedO könnte daraus geschlossen

werden, dass das Enzym eine *O*-Methylierung an C17 katalysiert. Da diese Position in Mycalamid B **32** keine freie Hydroxylgruppe trägt, könnte demnach PedO auch keine *O*-Methylierung durchführen. Dies würde bedeuten, dass PedO Mycalamid A **25** zu Mycalamid B **32** umsetzt. Jedoch ist die fehlende Enzymaktivität von PedO hierfür noch kein Beweis, da auch die Möglichkeit besteht, dass durch die schon vorhandene Methoxygruppe an C17 in Mycalamid B **32** die Reaktion an C18 sterisch gehindert wird.

Für eine genaue Lokalisierung der *O*-Methylierung wurden daher weitere Untersuchungen angeschlossen: durch eine Fragmentierung des Reaktionsproduktes sollte dabei versucht werden, anhand des Fragmentmusters Hinweise auf die Regioselektivität des Enzyms zu finden. In diesen MS-MS-Untersuchungen wird die entsprechende Substanz durch Elektronenbeschuss in seine Bestandteile zerlegt und die Fragmente im Massenspektrometer detektiert. Dafür wurde dasselbe ESI-microQQ-TOF-Massenspektrometer genutzt, das auch für die Aufnahme der vorherigen Spektren Verwendung fand. Zum Vergleich wurde dies auch mit den Negativkontrollen (Substrat ohne Enzym) durchgeführt und die Massenspektren verglichen. Im Fall von PedO wurden die Ionen der Masse 526,2 Da (= Masse Mycalamid A **25** + Na⁺) und 540,3 Da (= Masse einmal methyliertes Mycalamid A, + Na⁺) fragmentiert, für Mycalamid A **25** und B **32** die Ionen der Masse 526,2 Da und 540,3 Da. Bei der Masse von 526,2 Da ergab sich im MS-MS-Spektrum vom PedO-Mycalamid A **25**-Assay (ohne Abb.) dasselbe Fragmentmuster wie bei Mycalamid A **25**, es handelt sich folglich um nicht umgesetztes Substrat. Die Spektren der MS-MS-Messungen von Mycalamid A **25**, B **32** und der Masse 540,3 Da vom PedO-Mycalamid A **25**-Assay sind in Abb. 5.32 dargestellt.

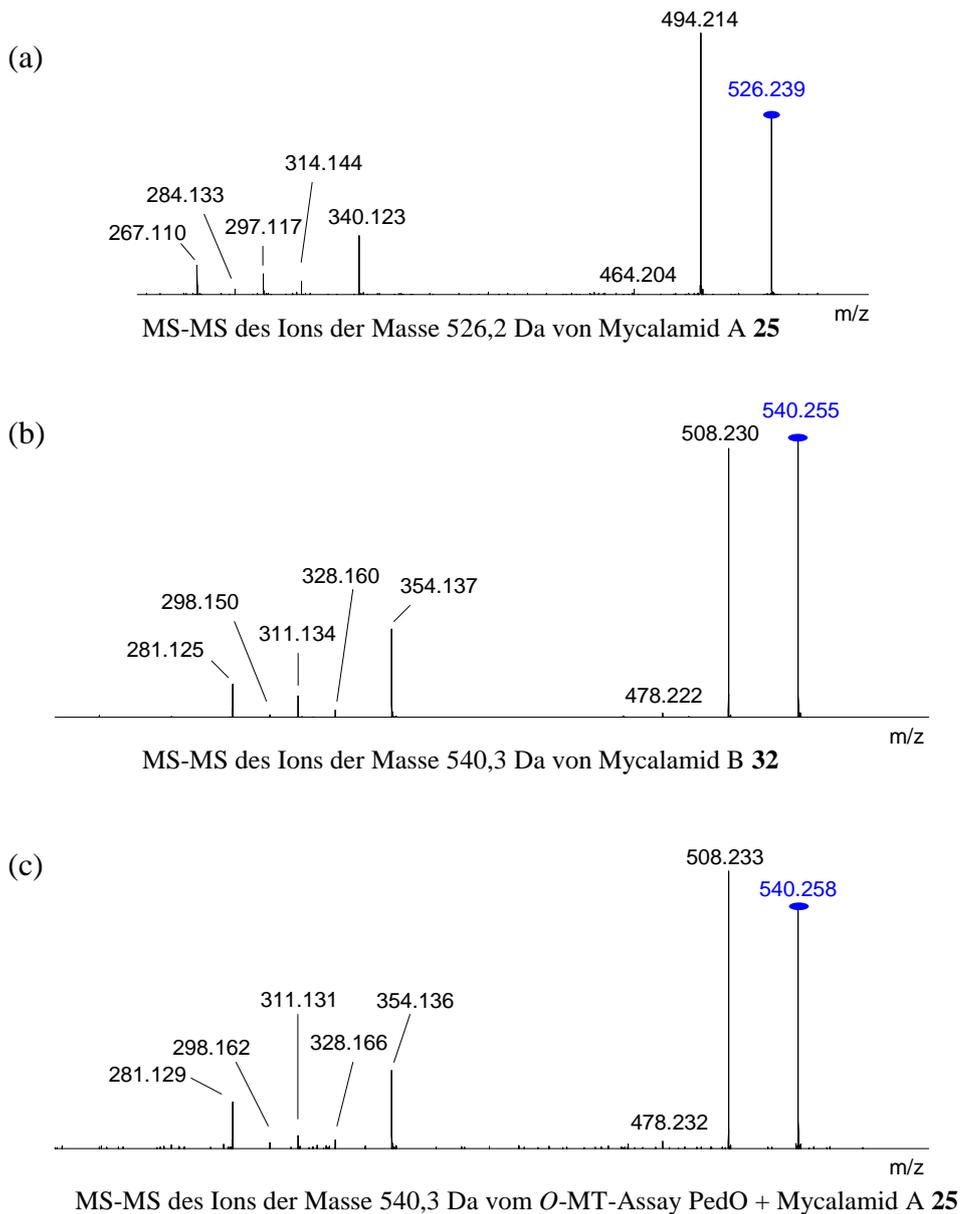


Abb. 5.32: MS-MS-Spektren von Mycalamid A und B und vom Reaktionsprodukt des Assays von PedO mit Mycalamid A.

(a) MS-MS von Mycalamid A **25**, fragmentiertes Ion: 526,2 Da

(b) MS-MS von Mycalamid B **32**, fragmentiertes Ion: 540,3 Da

(c) MS-MS von *O*-MT-Assay PedO + Mycalamid A **25**, fragmentiertes Ion: 540,3 Da

Der Assay von PedO mit Mycalamid A **25** bzw. die Negativkontrollen von Mycalamid A **25** und B **32** ohne Enzym wurden entsprechend 6.17.3 durchgeführt. Vom Enzym PedO (MBP-Fusionsprotein aus pMAL-c2X) wurden 200 μ l Elutionsfraktion e1 verwendet. Vom Substrat wurden jeweils 50 μ l einer 200 μ M Lösung (Wasser/ACN) eingesetzt. Die Messung erfolgte mittels ESI-microQ-TOF-MS und die interessierenden Peaks wurden mit Elektronen mit einer Energie von 10-35 eV beschossen und die Fragmente mit dem Massenspektrometer detektiert. Die Peaks der fragmentierten Ionen sind farbig hervorgehoben.

Expressionsbedingungen für PedO: pKZ158-1 / *E. coli* ER2566: 200 ml RM Amp¹⁰⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 15 h; Expression nach 6.13, Aufreinigung nach 6.13.1.1

Bei Vergleich des Fragmentierungsmuster von Mycalamid B **32** (Abb. 5.32 b) und dem Reaktionsprodukt aus PedO und Mycalamid A **25** (Abb. 5.32 c) kann eine Übereinstimmung festgestellt werden. Anhand der Fragmente wurde ein theoretisches Fragmentierungsmuster erstellt, um herauszufinden, ob zwischen einer *O*-Methylierung an C7, C17 und C18 anhand der Bruchstücke unterschieden werden kann (Abb. 5.33).

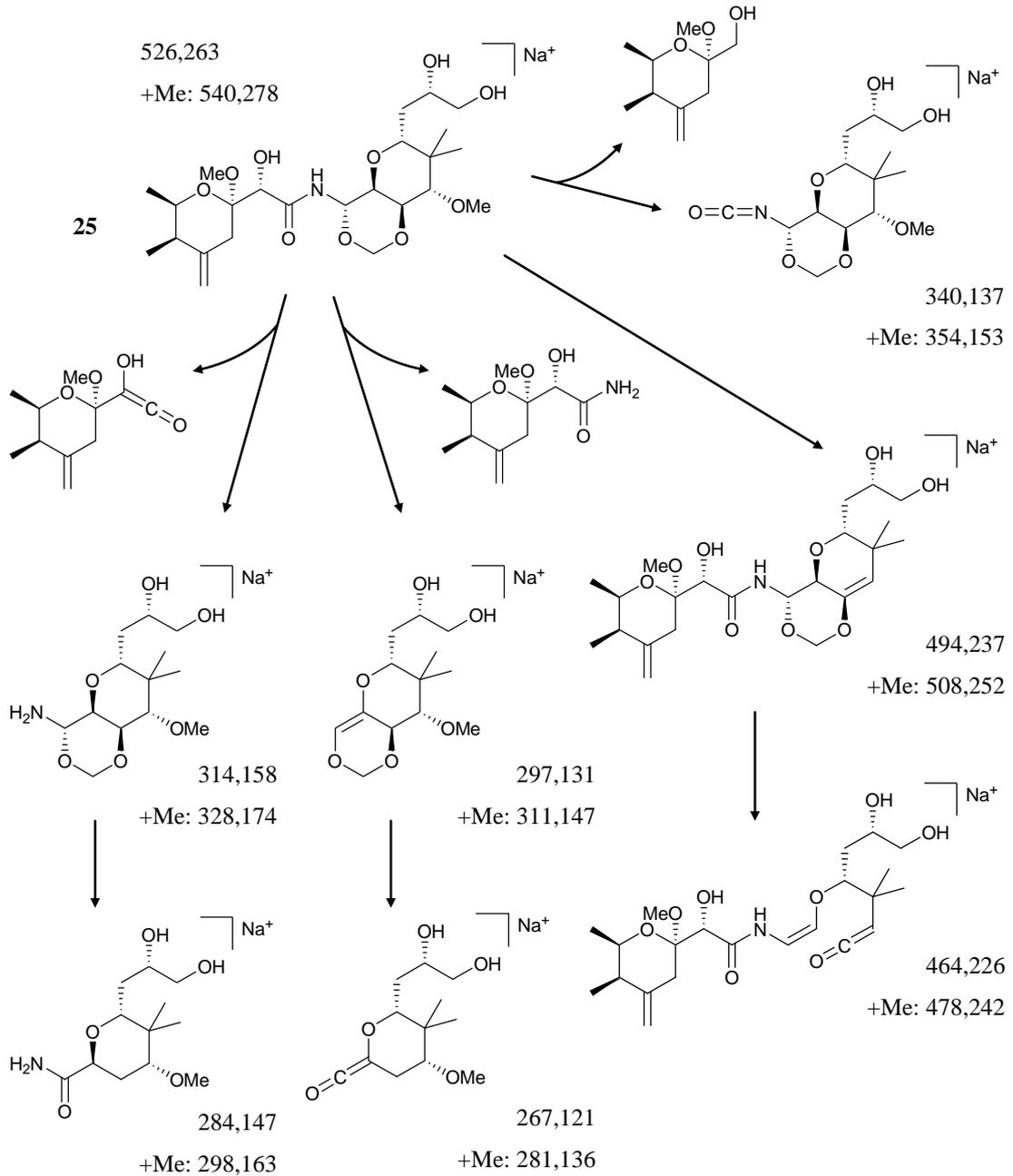


Abb. 5.33: Theoretische Fragmentierung von Mycalamid A und *O*-methyliertem Mycalamid A.

Bei Vergleich der MS-MS-Spektren (Abb. 5.32) mit dem theoretischen Fragmentierungsmuster (Abb. 5.33) kann festgestellt werden, dass alle theoretischen Bruchstücke auch in den MS-MS-Spektren auftauchen. Die erstellte Fragmentierungsabfolge ist folglich mit großer Wahrscheinlichkeit korrekt. Allerdings befinden sich die relevanten Positionen C17 und C18 immer zusammen in einem Fragment. Somit lässt sich damit nicht ermitteln, ob eine *O*-Methylierung an C17 oder an C18 stattfindet. Zwar gleichen sich die Fragmente von Mycalamid B **32** und dem PedO-Reaktionsprodukt, dies bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass es sich bei der umgesetzten Substanz um Mycalamid B **32** handelt. Da die Fragmentierung keine getrennten Bruchstücke mit C17 und C18 liefert, würde eine *O*-Methylierung von Mycalamid A **25** an C18 zum selben MS-MS-Spektrum führen wie die an C17 (= Mycalamid B **32**). Anhand der vorliegenden MS-MS-Daten kann jedoch eindeutig festgestellt werden, dass durch PedO keine *O*-Methylierung an C7 von Mycalamid A **25** erfolgt. In dieser Studie konnte zwar zweifelsfrei bewiesen werden, dass PedO Mycalamid A **25** an C17 oder C18 methyliert, eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen diesen beiden Varianten konnte aber nicht erzielt werden.

Im Folgenden wurde daher EI-MS eingesetzt, bei der eine Fragmentierung der Moleküle durch Elektronenstoß-Ionisation (EI) erfolgt. Ziel war es, Fragmente zu detektieren, die eventuell die Zuordnung der *O*-Methylierung an C17 oder C18 zulassen. Die Proben (Negativkontrollen der Substrate, Enzym-Assay von PedO mit Mycalamid A **25**) wurden entsprechend 6.17.4 behandelt und mittels EI-MS vermessen. Es konnte in allen Spektren eine Vielzahl von Fragmenten erhalten werden (ohne Abb.). Fast alle Bruchstücke kamen aber sowohl bei Mycalamid A **25** als auch bei Mycalamid B **32** vor. Einige konnten bekannten Weichmachern zugeordnet werden, stammten also nicht aus den Proben, sondern aus den Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen. Aus den verbleibenden Fragmenten war es nicht möglich, ein vollständiges Fragmentierungsmuster zu erstellen. Folglich war eine Unterscheidung zwischen den Positionen C17 und C18 durch Nutzung der EI-MS nicht möglich.

Anschließend wurde daher die LC-MS eingesetzt. Hierbei wird die zu untersuchende Probe mittels HPLC in ihre Bestandteile getrennt und bei den verschiedenen Retentionszeiten jeweils ein Massenspektrum aufgenommen, wobei dies wiederum mittels ESI-microQ-TOF-MS erfolgte. Für die Versuche wurde der Enzym-Assay

von PedO mit Mycalamid A **25** und zum Vergleich die Negativkontrollen nur mit den beiden Substraten verwendet. In die aufgenommenen Massenspektren der LC-MS wurde eine Massespur entsprechend der interessierenden Masse gelegt. Dadurch wird nur diese Masse herausgefiltert und es ist die Retentionszeit der entsprechenden Substanz ersichtlich. Dies erfolgte in allen Proben für die Massen $526,263 \pm 0,1$ Da (Mycalamid A **25** + Na⁺) und $540,279 \pm 0,1$ Da (Mycalamid B **32** bzw. einmal methyliertes Mycalamid A **25**, jeweils + Na⁺). Die Retentionszeiten der auftretenden Massen konnte im Folgenden verglichen werden (Abb. 5.34). Wie in Abb. 5.34 ersichtlich, unterscheiden sich die Retentionszeiten von Mycalamid A **25** und B **32** deutlich. Die Retentionszeit des Reaktionsproduktes von PedO und Mycalamid A **25** ist dieselbe wie für Mycalamid B **32**. Das aus pHIS8-3 exprimierte PedO zeigt eine geringere Umsetzung von Mycalamid A **25**. Die Ursache hierfür liegt in der geringeren Konzentration der *O*-MT als His₈-Fusionsprotein. Während das verwendete MBP-Fusionsprotein eine Konzentration von 4,6 mg/ml aufwies, erreichte das His₈-Fusionsprotein nach Aufkonzentrieren mittels den Zentrifugaleinheiten Vivaspin 500 gerade 1 mg/ml, wobei mit dem Aufkonzentrieren sicherlich noch ein Aktivitätsverlust verbunden ist. Trotz der geringeren Umsatzrate war das Ergebnis aber dasselbe. Die gleichen Retentionszeiten von Mycalamid B **32** und des Reaktionsproduktes könnten dafür sprechen, dass PedO Mycalamid A **25** zu Mycalamid B **32** umsetzt. Da aber zum Vergleich kein 18-*O*-Methylmycalamid A **35** zur Verfügung stand, konnte dessen Retentionszeit auch nicht ermittelt und vergleichend hinzu gezogen werden. In der Arbeitsgruppe Blunt/Munro, von der auch die eingesetzten Substrate stammen, wurden schon diverse Derivatisierungen von Mycalamid A **25** durchgeführt, so beispielsweise auch chemische *O*-Methylierungen.¹⁴⁰ Dabei wurden die Reaktionsprodukte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (DC) getrennt. Die in der *Thompson et al.* Studie¹⁴⁰ erhaltene Fraktion 1 lieferte Mycalamid A **25**, Fraktion 2 7-*O*-Methylmycalamid A, Fraktion 3 eine 2:3-Mischung aus 18-*O*-Methylmycalamid A **35** und 17-*O*-Methylmycalamid A (= Mycalamid B **32**) und Fraktion 4 reines 18-*O*-Methylmycalamid A **35**. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die hier interessanten 17-*O*- und 18-*O*-Methylmycalamide zumindest auf Silicagel in der DC nicht exakt die gleichen Retentionszeiten besitzen. LC-MS-Läufe in der Arbeitsgruppe Blunt/Munro unter ähnlichen Bedingungen wie in den hier durchgeführten LC-MS-Versuchen zeigten jedoch, dass bei Verwendung einer RP-Silicagelsäule das 18-*O*-

Methylmycalamid A **35** und Mycalamid B **32** die gleiche Retentionszeit haben (persönliche Mitteilung von Prof. Munro, University of Canterbury, NZ).

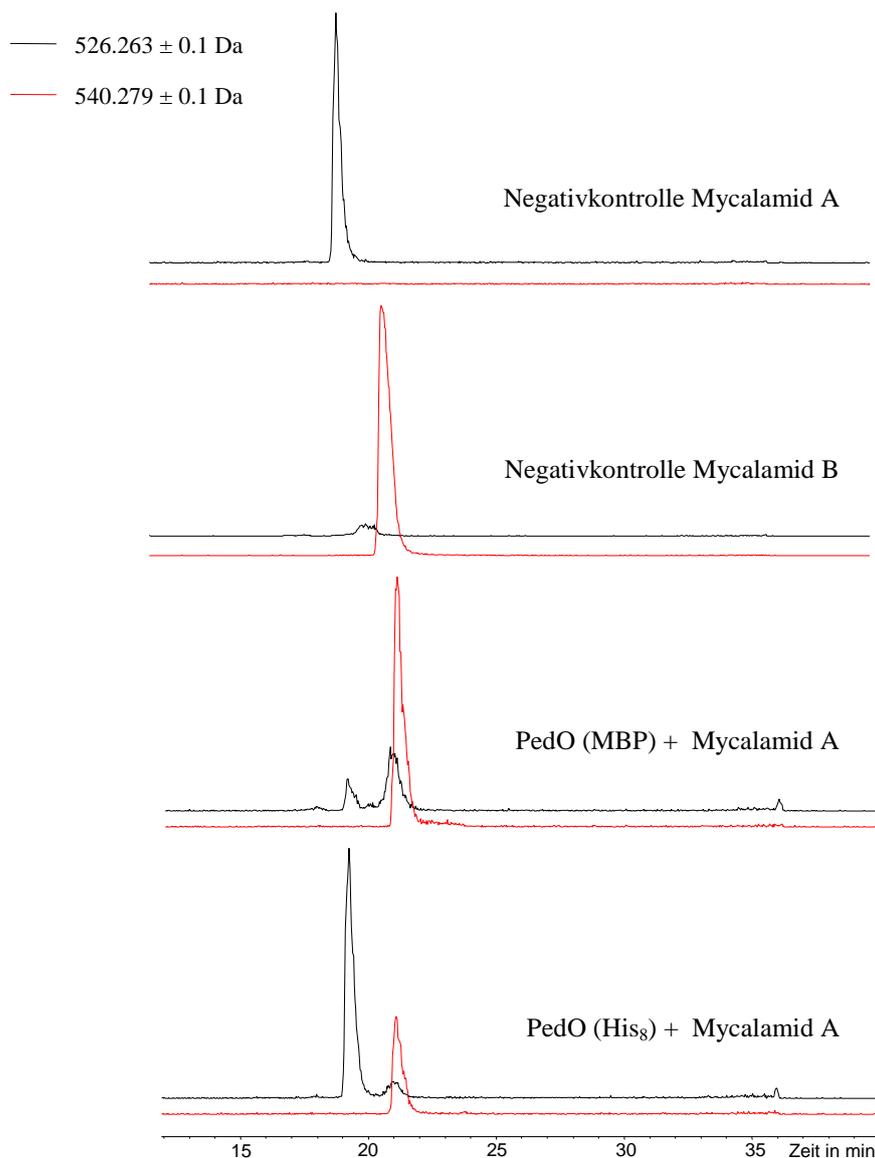


Abb. 5.34: LC-MS mit Mycalamid A und B und mit dem Reaktionsprodukt des Assays von PedO mit Mycalamid A.

Der Assay von PedO mit Mycalamid A **25** bzw. die Negativkontrollen von Mycalamid A **25** und B **32** ohne Enzym wurden entsprechend 6.17.3 durchgeführt. Vom Enzym PedO als MBP-Fusionsprotein (pKZ158-1) wurden 100 μ l Elutionsfraktion e1 (Proteinkonzentration: 4,6 mg/ml) verwendet. Die Elutionsfraktion bei 100 mM Imidazol von PedO als His₈-Fusionsprotein (pKZ182-1) wurde mit Vivaspin 500 MWCO 10000 nach 6.14.3 aufkonzentriert auf 1 mg/ml und davon 100 μ l eingesetzt. Vom Substrat wurden 50 μ l einer 200 μ M Lösung (Wasser/ACN) genutzt. Die Messung erfolgte mittels LC-MS nach 6.17.4. In die erhaltenen Massedaten wurde jeweils eine Massespur gelegt und in Abhängigkeit von der Retentionszeit dargestellt.

Expressionsbedingungen: pKZ158-1 / *E. coli* ER2566: 200 ml RM Amp¹⁰⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 24 h; pKZ182-1 / *E. coli* BL21 DE3: 300 ml LB Kn⁵⁰, 0,3 mM IPTG, 16 °C, 25 h; Expression nach 6.13, Aufreinigung nach 6.13.1.1 bzw. 6.13.2 mit Lysepuffer II

Mit den bisherigen Daten kann demnach nicht unterschieden werden, ob die *O*-Methylierung an Mycalamid A **25** durch PedO zu Mycalamid B **32** oder zu 18-*O*-Methylmycalamid A **35** führt.

In weiteren Versuchen sollte das *O*-Methylierungsprodukt identifiziert werden, indem diverse Derivatisierungen von Mycalamid B **32** und dem Assay-Produkt von PedO und Mycalamid A **25** durchgeführt wurden (6.17.5). Zum einen sollte dabei eine Schutzgruppe, die spezifisch an primäre Hydroxylgruppen bindet, getestet werden. Zum anderen sollte durch weitere Derivatisierungen der Substanzen und anschließender LC-MS ein Vergleich der Retentionszeiten der neu gebildeten Produkte erfolgen. Als Schutzgruppe diene Triphenylmethylchlorid, das wie erwähnt spezifisch für primäre Hydroxylgruppen ist. Für den Einsatz von Mycalamid B **32** würde dies eine Schützung an C18 bedeuten. Die entsprechende Masse sollte dann im ESI-microQO-TOF-Massenspektrum zu sehen sein. Handelt es sich bei dem Reaktionsprodukt von PedO mit Mycalamid A **25** um Mycalamid B **32**, würde folglich auch hier die Schützung stattfinden. Würde PedO aus Mycalamid A **25** jedoch 18-*O*-Methylmycalamid A **35** bilden, wäre in dem Molekül nur die sekundäre Hydroxylgruppe frei, die durch Triphenylmethylchlorid nicht geschützt wird.¹⁴¹ Die ermittelten Massen sollten demnach Auskunft über die Struktur des gebildeten Produktes liefern. In Vorversuchen hierzu wurden in den Massenspektren (ohne Abb.) zwar die Schutzgruppe und das eingesetzte Mycalamid B **32** gesehen, jedoch einzeln und nicht aneinander gebunden. Die Schützung hat folglich nicht funktioniert, was durchaus auch an der geringen Menge Mycalamid B **32** von nur 40 µg liegen kann, die für den Versuch verfügbar waren.

Eine zweite Variante zur Identifizierung des *O*-Methylierungsproduktes war die Oxidation des Reaktionsproduktes aus PedO und Mycalamid A **25** mit Tris(triphenylphosphin)-ruthenium-(II)-dichlorid.¹⁴² Durch schon in der Arbeitsgruppe Blunt/Munro durchgeführte Experimente mit Mycalamid A **25** und B **32** ist die Struktur der entstehenden Substanzen Normycalamid-A-Aldehyd **33** und Normycalamid B **34** bekannt¹⁴² (Abb. 5.35). Das Oxidationsprodukt von 18-*O*-Methylmycalamid A **35** muss nach diesen Erfahrungen eine andere Struktur besitzen als Normycalamid B **34**, falls überhaupt eine Reaktion stattfindet. In den eigenen Vorversuchen mit Mycalamid B **32** konnte jedoch kein Oxidationsprodukt

massenspektrometrisch nachgewiesen werden (ohne Abb.). Auch mittels LC-MS war Normycalamid B **34** nicht detektierbar (ohne Abb.). Auch hier werden die geringen eingesetzten Mengen die Ursache für das Ausbleiben der Reaktion darstellen. Von Mycalamid A **25** standen noch geringere Mengen zur Verfügung als von Mycalamid B **32**. Aufgrund der bisherigen Resultate der Oxidation wurde daher von einer Verwendung von Mycalamid A **25** in der Oxidationsreaktion abgesehen. Diese Methode führte ebenfalls nicht zum Erfolg.

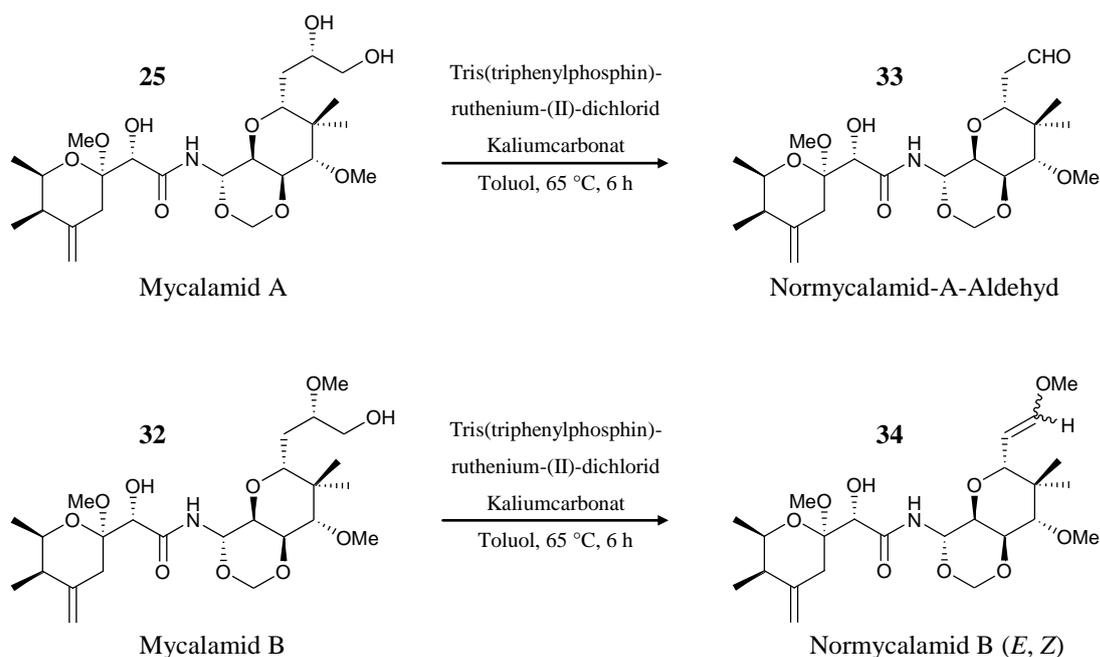


Abb. 5.35: Oxidation von Mycalamid A und Mycalamid B.¹⁴²

Als dritte Möglichkeit für die Identifizierung des *O*-Methylierungsproduktes wurde die Acetylierung in Betracht gezogen. Dabei bildet sich mit Mycalamid A **25** ein Triacetat, während bei Mycalamid B **32** und folglich auch bei 18-*O*-Methylmycalamid A **35** ein Diacetat gebildet wird.¹⁴⁰ Bei der Reaktion werden durch Essigsäureanhydrid alle freien Hydroxylgruppen acetyliert. Durch Analyse mittels LC-MS sollten die Retentionszeiten verglichen werden. Wäre die Retentionszeit des acetylierten Reaktionsproduktes von PedO mit Mycalamid A **25** und die von Mycalamid B **32** identisch, wäre dies ein starkes Indiz dafür, dass eine Bildung von Mycalamid B **32** stattgefunden hat. Wären die Retentionszeiten der gebildeten Struktur nach Acetylierung und von Mycalamid B **32**-Diacetat verschieden, wäre von der Umsetzung zu 18-*O*-Methylmycalamid **35** auszugehen. In Vorversuchen zeigte sich eine vollständige Umsetzung von Mycalamid A **25** zum Triacetat und von

Mycalamid B **32** zum Diacetat. Bei der Analyse der Substanzen mittels LC-MS zeigten sich für das Tri- und das Diacetat unter Verwendung eines neuen Laufmittel-Gradienten (6.17.5) unterschiedliche Retentionszeiten (ohne Abb.). Das ebenfalls analysierte acetylierte Assay-Produkt von PedO und Mycalamid A **25** zeigte jedoch nur Mycalamid A **25**-Triacetat (ohne Abb.). Folglich war die *O*-Methylierung des Substrates durch PedO nicht erfolgreich. Die Ursache hierfür lag in der gegenüber vorheriger *O*-Methylierungen geringeren Konzentration des exprimierten MBP-Fusionsproteins. Aus zeitlichen Gründen konnte eine erneute Expression von PedO, Durchführung des Enzym-Assays und Acetylierung nicht mehr erfolgen. Es standen zudem Ergebnisse der NMR-Analyse des *O*-MT-Assay-Produkts zur Verfügung, weshalb auf weitere Experimente verzichtet wurde. Die Acetylierung stellt jedoch prinzipiell eine geeignete Variante für die Analyse des *O*-MT-Assays dar, auch wenn endgültige Aussagen noch fehlen.

Wie erwähnt, wurde von dem Reaktionsprodukt von PedO und Mycalamid A **25** auch eine Analyse mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Blunt/Munro (University of Canterbury, NZ). Dafür wurde entsprechend 6.17.6 der *O*-Methylierungsassay von PedO mit Mycalamid A **25** durchgeführt und als Negativkontrollen der Assay jeweils mit Mycalamid A **25** und Mycalamid B **32** ohne Enzym angesetzt. Die Proben wurden anschließend mittels NMR-Spektroskopie (6.17.6) in deuteriertem Chloroform (CDCl_3) vermessen. Dabei wurden 1D- und 2D-Spektren (COSY, HSQC-DEPT) angefertigt. Bei COSY-Spektren werden gleichartige Kerne (^1H) korreliert, HSQC-Spektren zeigen die Korrelation der chemischen Verschiebung verschiedener Nuklide (zum Beispiel ^1H und ^{13}C), wobei bei DEPT-Spektren zusätzlich noch eine Unterscheidung der Signale von CH , CH_2 und CH_3 möglich ist. Für die Analyse des *O*-Methylierungsassays stellte sich heraus, dass die ^1H -NMR-Spektren schon aussagekräftige Ergebnisse lieferten, die zur Identifizierung der durch PedO hergestellten Substanz dienten. Das entsprechende ^1H -Spektrum des Enzym-Assays von PedO mit Mycalamid A **25** ist in Abb. 5.36 dargestellt mit dem vergrößerten Bereich, der für die Identifizierung relevant war. Die entsprechenden Spektren der Negativkontrollen befinden sich im Anhang (Abb. A.6 und A.7).

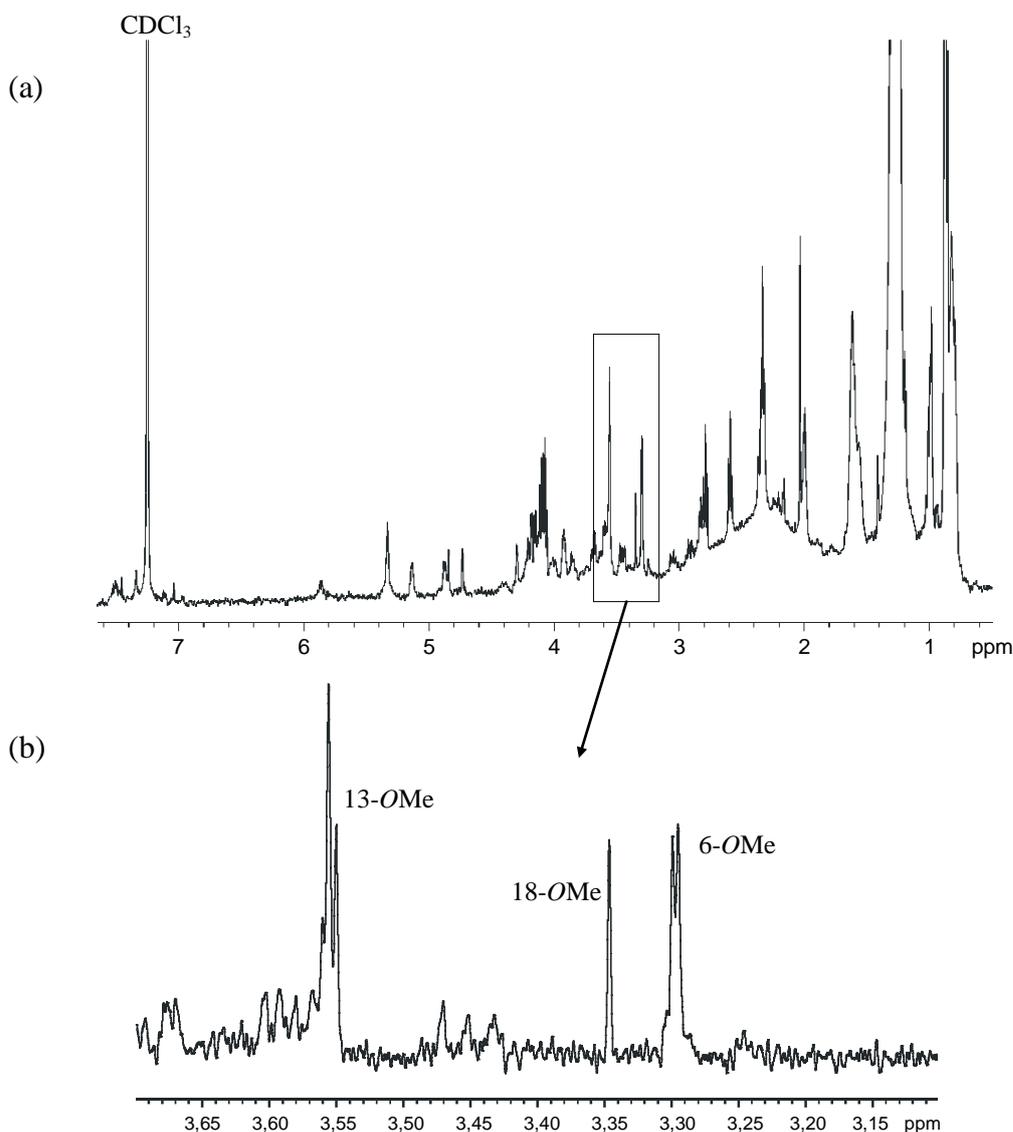


Abb. 5.36: $^1\text{H-NMR}$ vom PedO-Mycalamid A-Assay.

(a) Übersichtsspektrum $^1\text{H-NMR}$ vom PedO-Mycalamid A-Assay

(b) Ausschnitt aus $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom PedO-Mycalamid A-Assay

Der Enzym-Assay wurde mit dem MBP-Fusionsprotein von PedO (aus pKZ158-1) und Mycalamid A **25** durchgeführt und ein NMR-Spektrum angefertigt (6.17.6). Die Probe wurde in CDCl_3 gemessen und die relative chemische Verschiebung gegen δ_{H} (CHCl_3) 7,25 bestimmt. Expressionsbedingungen für pKZ158-1 / *E. coli* ER 2566: 200 ml RM Amp¹⁰⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 20,5 h

Bei den aufgenommenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurde der Bereich von 3,1 bis 3,7 ppm vergrößert. Dies erfolgte sowohl für die Negativkontrollen (Mycalamid A **25** (Abb. A.6 b) bzw. Mycalamid B **32** (Abb. A.7 b)) sowie für das Reaktionsprodukt des *O*-Methylierungsassays von PedO mit Mycalamid A **25** (Abb. 5.36 b). Dieser Bereich ist charakteristisch für die Methoxygruppen der betrachteten Moleküle und wurde schon eingehend in der Arbeitsgruppe Blunt/Munro untersucht, in der auch die vorliegenden Messungen durchgeführt werden.¹⁴⁰ In der Studie wurden u. a.

Methylierungen von Mycalamid A **25** und B **32** durchgeführt und von allen Substanzen NMR-Spektren aufgenommen. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Signale für Methoxygruppen deutlich unterscheiden (Tab. 5.1). Dieses Wissen konnte im Folgenden zur Analyse der aufgenommenen Spektren der vorliegenden Arbeit genutzt werden. Da alle Proben am selben Gerät unter den gleichen Bedingungen gemessen wurden, ist dieser Vergleich möglich. So ergibt sich in allen Spektren (Abb. 5.36 bzw. A.6 und A.7) eine eindeutige Zuordnung der Protonen der Methoxygruppe an C6 (6-OMe) und an C13 (13-OMe). Für Mycalamid B **32** kann in Abb. A.7 b desweiteren eine Zuordnung des Signals zu Protonen der Methoxygruppe an C17 (17-OMe) erfolgen. Die Negativkontrollen zeigten folglich die erwarteten Signale für die Methoxy-Protonen.

Tab. 5.1: ¹H-NMR-Daten.*

H	Mycal- amid A ^a	Mycal- amid B ^a	18- <i>O</i> - Methylmycal- amid A ^a	PedO + Mycalamid A ^b
6-OMe	3,29	3,29	3,30	3,29 3,30
13-OMe	3,55	3,54	3,55	3,55 3,56
17-OMe	-	3,24	-	-
18-OMe	-	-	3,35	3,35

*verwendetes Lösungsmittel jeweils CDCl₃, relative chemische Verschiebungen zu δ_H (CHCl₃) 7,25

^aDaten aus Literatur¹⁴⁰ ^b Ergebnisse der NMR-Messung der Probe

Bei Analyse des Spektrums des Reaktionsproduktes von PedO und Mycalamid A **25** (Abb. 5.36) lassen sich für 6-OMe und 13-OMe jeweils zwei Signale zuordnen (Tab. 5.1), obwohl es sich bei beiden um Singulets handelt und nicht um Dupletts. Die Ursache hierfür liegt im Vorliegen von unverbrauchtem Mycalamid A **25**. Da Mycalamid A **25** ebenfalls diese Methoxygruppen aufweist, tauchen sie neben denen des Reaktionsproduktes auf. Der für die NMR-Messung durchgeführte *O*-Methylierungsassay wurde entsprechend 6.17.6 zweimal angesetzt, wobei ein Ansatz für die NMR-Messung war und einer für die massenanalytische Untersuchung mittels ESI-microQ-TOF-MS diente. In dem entsprechenden Massenspektrum (ohne Abb.) konnte sowohl der Peak für Mycalamid A **25** als auch der für einmal methyliertes Mycalamid A **25**. Das Verhältnis der Intensitäten war dabei in etwa 1:1. Da die Ansätze identisch waren, befand sich auch in der für die NMR genutzten

Probe nicht umgesetztes Mycalamid A **25**, was im erhaltenen ^1H -Spektrum gesehen werden konnte. Im Spektrum des Produktes aus PedO und Mycalamid A **25** (Abb. 5.36) lässt sich desweiteren ein Signal bei 3,35 ppm erkennen (Tab. 5.1). Diese chemische Verschiebung ist laut den Literaturangaben charakteristisch für die Protonen der Methoxygruppe an C18 (18-OMe). Dies konnte durch Messung des chemisch hergestellten 18-*O*-Methylmycalamid A **35** bestimmt werden.¹⁴⁰ Ein Signal für 17-OMe, wie es in Mycalamid B **32** vorkommt, kann im ^1H -Spektrum des Reaktionsproduktes nicht gefunden werden. Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden ebenfalls aufgenommen und die chemischen Verschiebungen gegen die chemischen Verschiebungen der ^1H -Spektren aufgetragen (HSQC; ohne Abb.). Die Werte im charakteristischen Bereich entsprechen auch hier jeweils den in der Literatur¹⁴⁰ aufgelisteten. Folglich konnte durch Nutzung der NMR-Spektroskopie zweifelsfrei gezeigt werden, dass PedO Mycalamid A **25** an C18 methyliert und auf diese Weise 18-*O*-Methylmycalamid A **35** bildet. Durchgeführte Assays¹⁴⁰ bezüglich der biologischen Aktivität zeigte für das durch Derivatisierung von Mycalamid A **25** erzeugte 18-*O*-Methylmycalamid A **35** eine bessere Aktivität gegen die Maus-Leukämie P388-Zelllinie. So wurde ein IC_{50} -Wert von $0,5 \text{ ng/cm}^3$ für Mycalamid A **25** und $0,1 \text{ ng/cm}^3$ für 18-*O*-Methylmycalamid A **35** ermittelt. Mycalamid B **32** wies ebenso den Wert von $0,1 \text{ ng/cm}^3$ auf. Folglich konnte durch die *O*-MT PedO aus Mycalamid A **25** eine biologisch aktivere Substanz gebildet werden. Das so entstandene Produkt 18-*O*-Methylmycalamid A **35** ist ein neues Mitglied der Mycalamide und stellt einen bisher nicht bekannten Naturstoff dar, der durch kombinatorische Biosynthese erzeugt wurde (Abb. 5.37).

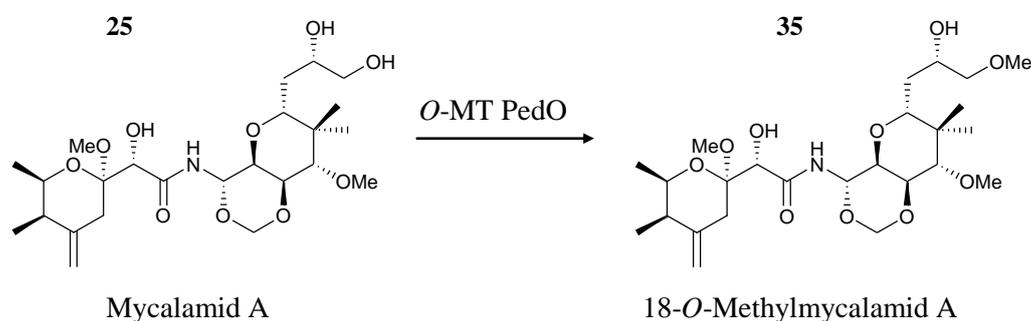


Abb. 5.37: Bildung von 18-*O*-Methylmycalamid A.

Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *O*-MT PedO in der Lage ist, eine spezifische *O*-Methylierung an C18 von Mycalamid A **25**

zu katalysieren. Aufgrund der hohen Strukturhomologie von Mycalamid A **25** und Pederin **23** kann daraus geschlussfolgert werden, dass PedO für die analoge *O*-Methylierung in Pederin zuständig ist. Die Ergebnisse stellen somit den ersten funktionellen Beweis dar, dass der *ped*-Gencluster für die Biosynthese von Pederin **23** verantwortlich ist. Weiterführende Experimente mit PedO könnten zum Beispiel darin liegen, einen zu SAM analogen Cofaktor in dem Assay einzusetzen, um auf diesem Weg neue Substanzen zu produzieren. Dies konnte schon erfolgreich durchgeführt werden für eine *O*-MT aus dem Rebeccamycin-Gencluster, ein Indolocarbazol-Alkaloid aus Actinomyceten.¹⁴³

Bezüglich der Regioselektivitäten von PedA und PedE konnten keine Aussagen getroffen werden, da sie sowohl für C17 als auch für C18 keine Aktivität aufwiesen (Abb. A.4 a-d). Folglich sollten sie die *O*-Methylierung an C6 bzw. C10 in Pederin **23** durchführen. Für die Bestätigung der Theorie stehen jedoch keine entsprechenden Substratanaloga zur Verfügung, weshalb keine näheren Untersuchungen an dieser Stelle möglich waren. Eine heterologe Expression des *ped*-Genclusters unter Knock-out von *pedA* bzw. *pedE* und Analyse der Reaktionsprodukte sollte Klarheit darüber schaffen, welche *O*-MT für welche Methoxygruppe verantwortlich ist. Dies ist zum momentanen Zeitpunkt noch nicht möglich. Jedoch bleibt die Frage offen, welches Enzym die *O*-Methylierung an C17 katalysiert, da PedO nur für C18 verantwortlich ist. Eine Analyse des vollständig sequenzierten Symbiontengenoms zeigte, dass keine weiteren *O*-MT codiert werden, die dafür in Frage kommen könnten. Demnach könnte vielleicht eine *O*-MT vom Wirt des Symbionten (Käfer der Gattung *Paederus* oder *Paederidus*) diese Reaktion übernehmen. Dafür stehen aber im Moment noch keine Nachweismöglichkeiten zur Verfügung. Eine heterologe Expression des *ped*-Clusters außerhalb des Käfers wird darüber Auskunft geben können.

5.6.2 *O*-MT-Assay mit OnnD

Für die Untersuchung der *O*-MT OnnD aus dem *onn*-Gencluster sollte, wie unter 5.6 erwähnt, Pederin **23** als Substratanaloga eingesetzt werden, um festzustellen, ob eine *O*-Methylierung an C13 durch das Enzym katalysiert wird. Das Substrat wurde aus einem Käferextrakt gewonnen und aufgereinigt (s. 5.6). Die *O*-MT konnte lediglich als MBP-Fusionsprotein exprimiert werden (5.3.1), während die Expression als His₈-Fusionsprotein trotz diverser Versuche kein lösliches Protein lieferte (5.3.2). Der

Enzym-Assay wurde mit OnnD und Pederin **23** durchgeführt und der Extrakt mittels ESI-microQ-TOF-MS analysiert. Das Massenspektrum des Assays (Abb. 5.38 a) zeigt bei Vergleich mit der Negativkontrolle (Abb. 5.38 b), dass keine Umsetzung von Pederin **23** durch die *O*-MT OnnD stattgefunden hat. Dies kann zum einen seine Ursache darin haben, dass OnnD nicht für die *O*-Methylierung an C13 zuständig ist oder das Pederin **23** als Substratanalogon nicht akzeptiert wird. Onnamid A **26** und Pederin **23** sind strukturell nur in ihrer westlichen Region identisch. Onnamid A **26** besitzt im östlichen Bereich weitaus mehr Strukturelemente als Pederin **23**, wodurch es möglich ist, dass das verwendete Substrat Pederin **23** als solches nicht von der *O*-MT erkannt wird.

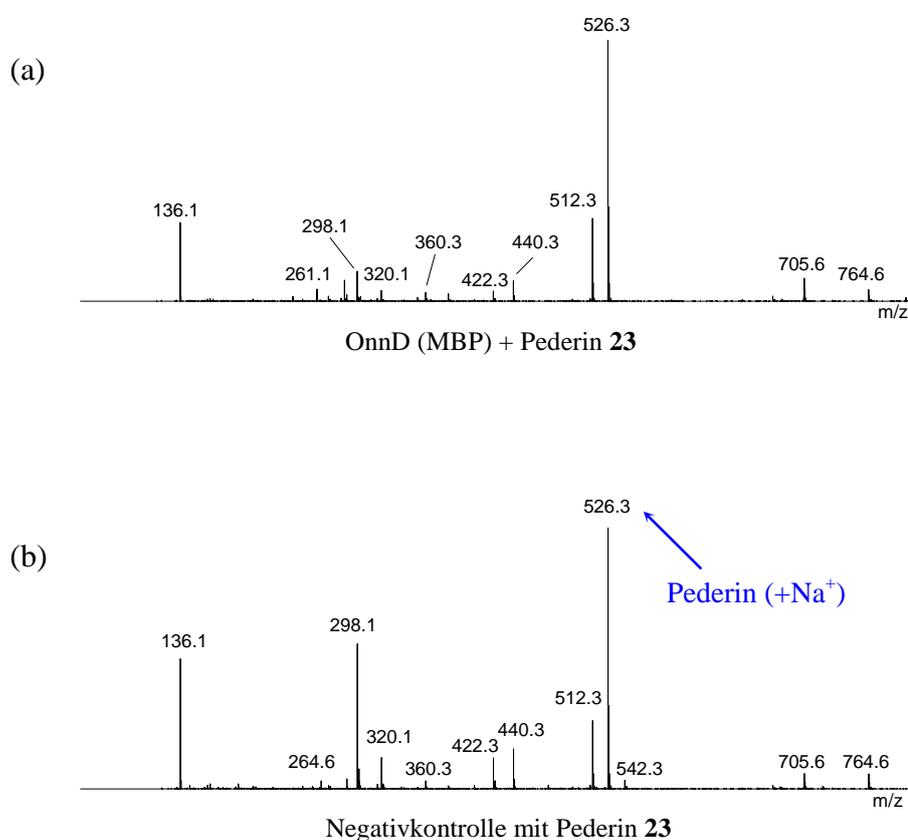


Abb. 5.38: Massenspektren von Pederin und vom OnnD-Pederin-Assay.

(a) MBP-OnnD + Pederin **23** (Enzym aus pKZ157-1 / *E. coli* ER2566)

(b) Negativkontrolle mit Pederin **23**

Die Durchführung des Assays erfolgte entsprechend 6.17.3 mit 400 μ l der Elutionsfraktion e1 des Enzyms und 50 μ l Pederin **23** einer 200 μ M Lösung (Wasser/ACN). Die organische Phase wurde anschließend mittels ESI-microQ-TOF-MS gemessen. Expressionsbedingungen: pKZ157-1 / *E. coli* ER2566: 200 ml RM Amp¹⁰⁰, 0,2 mM IPTG, 16 °C, 15 h; Expression entsprechend 6.13; Aufreinigung nach 6.13.1.1

Die *O*-Methylierung durch die als MBP-Fusionsprotein exprimierte *O*-MT PedO mit Mycalamid A **25** lieferte einen positiven Befund, d. h. die Enzymtätigkeit wird durch das anhängende MBP nicht beeinflusst (5.6.1). Dies könnte auch für das MBP-Fusionsprotein von OnnD der Fall sein. Wie schon erwähnt, besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass OnnD durch das anhängende MBP während der Proteinexpression eine Fehlfaltung erfahren hat und nicht in seiner aktiven Form vorliegt. Mit bisherigen Daten lässt sich jedoch weder das eine noch das andere ausschließen. Deshalb war auch eine Expression von OnnD aus pHIS8-3 gewünscht, um den Assay sowohl mit dem MBP- als auch dem His₈-Fusionsprotein durchführen zu können. Wie oben beschrieben, war das aus pHIS8-3 exprimierte Protein aber unlöslich und konnte daher nicht für die Verwendung in einem Enzym-Assay genutzt werden. Mit den vorliegenden Ergebnissen des Assays von OnnD mit Pederin **23** lassen sich keine eindeutigen Aussagen treffen. Um zu gewährleisten, dass das Substrat als solches erkannt wird, wäre eine Expression des gesamten *ped*-Genclusters hilfreich, d. h., dass auch PedH exprimiert wird und die Onnamid A-analoge Struktur **27** bildet (Abb. 3.17). Dies könnte durch heterologe Expression des Clusters erfolgen. Dabei müsste jedoch PedG inaktiviert werden bzw. ein Knock-out von *pedG* durchgeführt werden, da es ansonsten zur Bildung der Pederin-Vorstufe **28** kommen würde. Die so hergestellte Substanz **27** würde dann ebenfalls keine *O*-Methylierung an C13 tragen, in seiner Struktur aber sehr stark Onnamid A **26** ähneln. Wäre dann im Enzym-Assay keine Aktivität von OnnD zu verzeichnen, wäre dies ein sehr starkes Indiz, dass die *O*-MT für eine andere *O*-Methylierung zuständig ist. Bisher war eine heterologe Expression des *ped*-Genclusters allerdings noch nicht erfolgreich. Eine weitere Möglichkeit, aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, wäre in jedem Fall eine Expression der *O*-MT, zum Beispiel als His-Fusionsprotein. Somit könnte ausgeschlossen werden, dass die Inaktivität bezüglich der *O*-Methylierung an C13 beim Enzym selbst liegt. Eventuell kann das Protein auch mit anderen synthetischen Substraten eingesetzt werden, um zu prüfen, ob möglicherweise Aktivitäten an anderen Positionen vorliegen.

5.7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden Gene des *ped*-Genclusters in Expressionsvektoren kloniert und die Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Enzyme wurden im Anschluss in Assays eingesetzt, um damit Rückschlüsse auf ihre Funktion ziehen zu können. Bei Beginn der Arbeit wurde postuliert, dass der *ped*-Cluster für die Biosynthese der Antitumorsubstanz Pederin **23** verantwortlich ist. Er gehört zu modularen *trans*-AT Typ-I-PKS/NRPS. Pederin kann in Käfern der Gattung *Paederus* und *Paederidus* gefunden werden. Der tatsächliche Produzent scheint jedoch ein im Käfer lebender bakterieller Symbiont zu sein, der ein naher Verwandter von *Pseudomonas aeruginosa* ist.¹¹

Ein Hauptaspekt der Arbeit waren die ACP und AT. Im Falle der ACP gelang die Expression sowohl der *apo*- als auch der *holo*-Form der ACP PedN, codiert als separates Enzym, und PedI3, codiert als ACP-Domäne innerhalb eines Moduls. Die Enzyme wurden letztendlich als His₈-Fusionsproteine aus pHIS8-3 bzw. pHIS8-3 *svp* hergestellt (Abb. 5.6 bis 5.8). Das Gen *svp* im verwendeten Expressionsvektor codiert dabei für die PPTase Svp aus *Streptomyces verticillus* ATCC15003,¹⁰¹ die die *apo*-Form des ACP in seine aktive *holo*-Form umsetzt (Abb. 3.4). Der Nachweis der erfolgten Phosphopantetheinylierung gelang durch MALDI-TOF-TOF-MS (Abb. 5.9) und ESI-FT-ICR-MS (Abb. 5.11–5.13), wobei bei letztgenannter Methode eine Entsalzung der Proteinprobe durch HPLC (Abb. 5.10) bzw. durch Nutzung von Vivaspin-Zentrifugaleinheiten erfolgte. Im *ped*-Gencluster existieren darüber hinaus die zwei separaten AT PedC und PedD, die *in trans* agieren. PedC konnte als MBP-Fusionsprotein (Abb. 5.15) und PedD als His₈-Fusionsprotein (Abb. 5.16) exprimiert und mit den ACP in Enzym-Assays eingesetzt werden (Abb. 3.5 a). Es stellte sich heraus, dass die Verwendung von radioaktiv markiertem Substrat eine geeignete Variante zur Analyse der ACP-AT-Assays ist. Dabei wurde [2-¹⁴C]-Malonyl-CoA **8** und [1-¹⁴C]-Acetyl-CoA **7** verwendet. Malonyl-CoA **8** stellt das Elongations-, Acetyl-CoA **7** das Startersubstrat dar. In den Versuchen (Abb. 5.26) konnte gezeigt werden, dass PedD in der Lage ist, Malonyl-CoA **8** sowohl auf *holo*-PedN als auch *holo*-PedI3 zu übertragen, jedoch kein Transfer von Acetyl-CoA **7** durch PedD katalysiert wird. Es handelt sich folglich um die AT für das Elongationssubstrat. PedC zeigte in den durchgeführten Experimenten weder gegenüber Malonyl- **8** noch Acetyl-CoA **7** Aktivität. Zum Beweis dieser Inaktivität sollte PedC noch als His-

Fusionsprotein exprimiert werden, was trotz vieler Versuche nur unlösliches Enzym lieferte. Bisherige Erkenntnisse deuten aber darauf hin, dass für die Übertragung des Startersubstrates die GNAT verantwortlich ist. Die entsprechende Genregion wurde zur Überprüfung der Hypothese zusammen mit dem darauffolgenden ACP kloniert und aus pHIS8-3 *svp* exprimiert (Abb. 5.14). Aus zeitlichen Gründen war eine genaue Analyse des Proteins hinsichtlich der erfolgten Phosphopantetheinylierung und seiner Beteiligung in der Substratübertragung nicht möglich. Für zukünftige Versuche steht aber neben dem aus pHIS8-3 *svp* exprimierbaren Protein auch das Konstrukt zur Erzeugung der *apo*-Form aus pHIS8-3 zur Verfügung. Eine kinetische Untersuchung des Transfers von Malonyl-CoA **8** auf PedN durch PedD wurde begonnen (Abb. 5.28), konnte jedoch aus Zeitgründen nicht zu Ende geführt werden. Die vorliegenden Daten bekräftigen die Ergebnisse des Radioaktiv-Assays, müssen aber noch optimiert werden, um entsprechende kinetische Parameter zu erhalten.

Ein weiterer Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit waren die *O*-MT. Zum einen wurden dabei die *O*-MT PedA, PedE und PedO aus dem *ped*-Gencluster untersucht und zum anderen die *O*-MT OnnD aus dem *onn*-Gencluster, der wahrscheinlich für die Biosynthese von Onnamid A **26** aus dem Schwamm *Theonella swinhoei* verantwortlich ist.²¹ Pederin **23** enthält vier Methoxygruppen, der *ped*-Gencluster codiert jedoch nur für drei *O*-MT (Abb. 3.16 und 3.17). PedA, PedE und PedO konnten sowohl als MBP- als auch His₈-Fusionsprotein erfolgreich exprimiert werden (Abb. 5.17 bzw. 5.19). Die Proteine wurden für Enzym-Assays mit den aus dem Schwamm *Mycale hentscheli* isolierten Substratanaloga Mycalamid A **25** und B **32**^{71, 138, 139} eingesetzt. Die Polyketide ähneln Pederin **23** strukturell sehr stark, weisen jedoch weniger *O*-Methylierungen auf (Abb. 5.29). Die Assays wurden mittels ESI-microQ-TOF-MS analysiert und zeigten, dass PedO in der Lage ist, Mycalamid A **25** an einer Hydroxylgruppe zu methylieren (Abb. 5.30, Abb. 5.31). Anschließend MS-MS-Versuche bewiesen, dass es sich dabei um die *O*-Methylierung an C17 oder C18 handeln muss (Abb. 5.32). Die Verwendung der LC-MS brachte keine spezifischeren Aussagen über die Regioselektivität von PedO, ebenso wie durchgeführte Derivatisierungen von Mycalamid B **32** bzw. des Reaktionsproduktes. Es war daher zunächst noch unbekannt, ob PedO aus Mycalamid A **25** Mycalamid B **32** bildet oder 18-*O*-Methylmycalamid A **35**. Durch Verwendung von 1D- und 2D-NMR konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei dem gebildeten Produkt um 18-*O*-Methylmycalamid A **35** handelt (Abb. 5.36).

Damit konnte PedO als spezifische *O*-MT für C18 herausgestellt werden und lieferte somit den ersten funktionellen Beweis, dass der *ped*-Gencluster für die Biosynthese von Pederin **23** verantwortlich ist. Das durch PedO aus Mycalamid A **25** gebildete Polyketid 18-*O*-Methylmycalamid A **35** stellt ein durch kombinatorische Biosynthese gewonnenes neues Mitglied der Familie der Mycalamide dar (Abb. 5.37). Es wurde bisher nicht als Naturstoff isoliert, sondern lediglich durch chemische Umsetzung aus Mycalamid A **25** gebildet.¹⁴⁰ In der Studie¹⁴⁰ durchgeführte Bioaktivitätstests zeigten, dass 18-*O*-Methylmycalamid A **35** gegenüber Mycalamid B **32** die gleiche, gegenüber Mycalamid A **25** jedoch eine bessere biologische Aktivität aufweist. Folglich wurde durch PedO Mycalamid A **25** in eine biologisch aktivere Substanz umgesetzt. Die *O*-MT OnnD wurde als MBP-Fusionsprotein exprimiert (Abb. 5.17) und mit Pederin **23** als Substratanalogon eingesetzt. Das aus Käferextrakt stammende Pederin wurde hierzu durch Extraktion und Säulenchromatographie gereinigt. In dem ebenfalls mittels ESI-microOQ-TOF-MS analysiertem Assay fand keine *O*-Methylierung durch OnnD statt (Abb. 5.38). Die Durchführung des Assays mit OnnD als His₈-Fusionsprotein konnte nicht erfolgen, da trotz vieler Versuche die *O*-MT nicht als lösliches Protein exprimierbar war. Bisherige Daten lassen vermuten, dass OnnD die *O*-Methylierung an C13, die in Onnamid A **26**, jedoch nicht in Pederin **23** vorkommt, nicht katalysiert. Dies sollte in zukünftigen Experimenten durch Verwendung von OnnD als His-Fusionsprotein bestätigt werden. Eine andere Ursache könnte darin liegen, dass Pederin **23** nicht als Substrat akzeptiert wird. Hierzu sollte eine heterologe Expression des *ped*-Genclusters erfolgen zur Erzeugung der „schwammähnlichen“ Struktur **27** (Abb. 3.17), die dann in einem *O*-Methylierungsassay mit OnnD eingesetzt werden könnte. Die heterologe Expression war bisher jedoch nicht erfolgreich, so dass weiterführende Experimente an dieser Stelle noch nicht durchgeführt werden konnten.

Für ein genaueres Verständnis des Biosyntheseweges von Pederin **23** sollte auch eine Expression der OR PedB erfolgen. Diese wurde als MBP-Fusionsprotein exprimiert (Abb. 5.20), eine Klonierung in pHIS8-3 lieferte bisher nur unlösliches Protein. Das Enzym scheint die Funktion einer ER zu besitzen, die *in trans* agiert (vgl. Abschnitt 5.4.1). Zur Untermauerung der Theorie soll das Enzym in zukünftigen Versuchen während der Bacillaen-Biosynthese eingesetzt werden sowie in Assays mit Bacillaen- und Pederin-Intermediaten unter Verwendung verschiedener ACP aus den beiden Biosynthesegenclustern. Der Beitrag zu diesen Experimenten lag in der

Bereitstellung von PedB. Für zukünftige Arbeiten wurden ebenfalls die A-Domänen aus den NRPS des *ped*-Genclusters jeweils als MBP- und His₈-Fusionsprotein exprimiert (Abb. 5.22 und 5.23). Sie sind verantwortlich für die Auswahl und Aktivierung der Aminosäuren sowie der Übertragung auf die PCP (Abb. 3.13 a und b). Entsprechend des nichtribosomalen Codes⁵⁹ und bisherigen Erkenntnissen³⁹ handelt es sich dabei für die A-Domäne aus *pedF* um Glycin, bei der A-Domäne aus *pedH* um Arginin. Die A-Domänen sollen in einem spezifischen Assay unter Verwendung von [³²P]Pyrophosphat eingesetzt werden (Abb. 5.21). Dafür wurden sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Expressionsvektoren kloniert und liegen als exprimierbare Konstrukte vor. In allen Fällen konnten sie als lösliches Protein erhalten werden. Ein weiterer Aspekt der Arbeit war die Klonierung und Expression der Ketosynthase PedM und der HMGC_oA-Synthase PedP. Beide Enzyme sind wahrscheinlich an der Bildung der Exomethylengruppe an C4 in Pederin **23** beteiligt.^{41, 91} Sie konnten als MBP-Fusionsproteine exprimiert werden, lieferten als His₈-Fusionsproteine jedoch nur unter Coexpression von Chaperon-Plasmiden lösliches Protein (Abb. 5.25). In dem geplanten Assay (Abb. 5.24) sollen neben diesen beiden Enzymen auch die AT PedC und PedD sowie das ACP PedN eingesetzt werden, Alle anderen beteiligten Enzyme und das entsprechende Substrat wurden / werden von H. Niederkrüger und J. Moldenhauer hergestellt. Der Anteil der vorliegenden Arbeit an diesem Versuch lag in der Expression der aufgeführten Enzyme.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden verschiedene Gene des *ped*-Genclusters kloniert und erfolgreich exprimiert. Durchgeführte Enzym-Assays lieferten den ersten funktionellen Beweis, dass der *ped*-Gencluster für die Biosynthese von Pederin **23** verantwortlich ist. Die durch PedO katalysierte *O*-Methylierung von Mycalamid A **25** lieferte dabei die Substanz 18-*O*-Methylmycalamid A **35**. Dies stellt einen wichtige Grundlage dafür dar, dass eine heterologe Expression des *ped*-Genclusters tatsächlich zur Biosynthese von Pederin führen wird. Desweiteren konnte die Funktion der AT PedD als Überträger des Elongationssubstrates Malonyl-CoA **8** herausgestellt werden. Für geplante Experimente wurde eine Vielzahl von Proteinen zur Verfügung gestellt, die in Enzym-Assays eingesetzt werden können. Vorliegende und zukünftige Ergebnisse dienen dabei nicht nur zum besseren Verständnis des Biosynthesewegs von Pederin **23**, sondern auch von *trans*-AT-PKS im allgemeinen, deren Enzymologie bisher nur wenig untersucht wurde.

6. Material und Methoden

6.1 Verwendete Cosmide, Vektoren und Organismen

6.1.1 Verwendete Cosmide

Für die Amplifizierung der Biosynthesegene fanden vorhandene Cosmide Verwendung, die aus Cosmidbibliotheken stammen^{21, 39, 41} und in Tab. 6.1 aufgeführt sind.

Tab. 6.1: Verwendete Cosmide zur Amplifizierung der Biosynthesegene.

Cosmidname	Amplifizierung von
p23E7	<i>pedA, pedB, pedC, pedD, pedE, pedF</i> (A-Domäne)
pS9D2	<i>pedI2, pedI3, pedGNAT-ACP</i>
pS8F8	<i>pedM, pedN, pedO, pedP</i>
pTS1E4	<i>onnD</i>
pPD9F2	<i>pedH</i> (A-Domäne)

6.1.2 Verwendete Vektoren

Zur Klonierung der verschiedenen Biosynthesegene kamen diverse Vektoren zum Einsatz, die in Tab. 6.2 aufgelistet sind.

Tab. 6.2: Herkunft und Verwendung von Klonierungsvektoren.

Plasmid	Verwendung	Resistenzgen (verw. Konz.)	Herkunft
pBluescript SK(+)	Lagerung und Restriktion von	Ampicillin [*] (100 µg/ml)	Fa. Fermentas
	PCR-Fragmenten		
pCR2.1 TOPO,	Lagerung und Restriktion von	Kanamycin (50 µg/ml)	Fa. Invitrogen
pCR4Blunt-TOPO	PCR-Fragmenten		
pET52b(+)	Expression N-terminaler	Ampicillin [*] (100 µg/ml)	Fa. Novagen
	Strep- und C-terminaler		
	His ₁₀ -Fusionsproteine		

Fortsetzung Tab. 6.2

Plasmid	Verwendung	Resistenzgen (verw. Konz.)	Herkunft
pGEMTeasy	Lagerung und Restriktion von	Ampicillin*	Fa.
	PCR-Fragmenten	(100 µg/ml)	Promega
pGro7	Chaperon-Plasmid	Chloramphenicol	Fa.
	(L-Arabinose-induziert)	(34 µg/ml)	Takara
pG-Tf2	Chaperon-Plasmid	Chloramphenicol	Fa.
	(Tetracyclin-induziert)	(34 µg/ml)	Takara
pHIS8-3 <i>svp</i>	Expression N-terminaler His ₈ -Fusionsproteine unter Coexpression des <i>svp</i> -Gens	Kanamycin (50 µg/ml)	AK Prof. B. Moore
pKJE7	Chaperon-Plasmid	Chloramphenicol	Fa.
	(L-Arabinose-induziert)	(34 µg/ml)	Takara
pMAL-c2X	Expression N-terminaler	Ampicillin*	Fa. NEB
	Maltose-Binde- Fusionsproteine	(100 µg/ml)	
pQE60 <i>sfp</i> -pREP4	Expression des <i>sfp</i> -Gens als	Ampicillin*	J. May, AK Prof. M. A. Marahiel
	C-terminales His ₆ - Fusionsprotein	(100 µg/ml) Kanamycin	
	(pREP4 als Helferplasmid)	(50 µg/ml)	
pREP4 <i>sfp</i>	Expression des <i>sfp</i> -Gens	Kanamycin (50 µg/ml)	
pRSETB	Expression N-terminaler	Ampicillin*	Fa.
	His ₆ -Fusionsproteine	(100 µg/ml)	Invitrogen
pTf16	Chaperon-Plasmid	Chloramphenicol	Fa.
	(L-Arabinose-induziert)	(34 µg/ml)	Takara
pTYB1	Expression C -terminaler	Ampicillin*	Fa. NEB
	Intein-Fusionsproteine	(100 µg/ml)	

*anstelle von Ampicillin wurde häufig Carbenicillin in derselben Konzentration verwendet, da es stabiler ist, jedoch die gleichen Eigenschaften aufweist

6.1.3 Verwendete Organismen

Zur Transformation von Ligationen und Konstrukten sowie zur Lagerung der produzierten Plasmide wurden die Stämme *E. coli* XL1-Blue bzw. *E. coli* TOP10 (Tab. 6.3) genutzt. Für die Expression der Proteine wurden die Konstrukte in verschiedene Expressionsstämme transformiert, die ebenfalls Tab. 6.3 zu entnehmen sind.

Tab. 6.3: Eigenschaften verwendeter Stämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> BL21 DE3	F ⁺ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Fa. Invitrogen
<i>E. coli</i> ER2566	F ⁺ <i>fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10) (TetS) endA1 [dcm]</i>	Fa. NEB
<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' <i>[lac⁺ lacI^q pro] gor522::Tn 10 trxB pLysSRARE2</i> (Cam ^R , Str ^R , Tet ^R)	Fa. Novagen
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁺ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Fa. Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^q ZAM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Fa. Stratagene

6.2 Medien

Für die Versuche dienten Flüssig- und Festmedien, wobei zum einen LB- und zum anderen Rich Medium mit Glucose Verwendung fand. Entsprechend der Resistenzkassette der jeweils genutzten Plasmide wurde dem Medium jeweils Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml und / oder Carbenicillin bzw. Ampicillin in einer resultierenden Konzentration von 100 µg/ml zugefügt. Carbenicillin wurde häufig anstelle von Ampicillin genutzt, da diesem i. a. eine

längere Lagerzeit zugeschrieben wird, aber dieselbe Wirkweise besitzt. Bei Verwendung des Stammes *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS wurde dem Medium neben dem Antibiotikum entsprechend der Resistenz auf dem Plasmid noch Chloramphenicol, gelöst in Ethanol, in einer Endkonzentration von 34 µg/ml, Streptomycin in einer resultierenden Konzentration von 50 µg/ml und Tetracyclin mit einer Endkonzentration von 12,5 µg/ml zugefügt.

6.2.1 LB-Medium

Zur Anzucht von Stämmen wurde LB-Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet¹⁴⁴:

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1000 ml H₂O_{dest.}

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

6.2.2 Rich Medium mit Glucose

Zur Expression von MBP-Fusionsproteinen in Flüssigkultur wurde entsprechend der Vorschrift nach NEB Rich Medium mit Glucose eingesetzt:

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
2 g Glucose-Monohydrat
ad 1000 ml H₂O_{dest.}

6.3 Glycerinfrierkulturen

Für eine Langzeitlagerung von Stämmen dienen Glycerinfrierkulturen. Hierzu wurde eine Einzelkolonie von LB-Platte in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und die Kultur bei 37 °C und 200 rpm in einen Inkubationsschüttler gestellt. Von der Übernachtskultur wurden dann 750 µl in eine 2 ml-Mikroröhre überführt und 750 µl 30% (v/v) Glycerin zugegeben. Nach

dem Durchmischen der Glycerinkultur wurde diese noch einige Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Flexibilität der Zellmembran durch das Eindringen des Glycerins zu erhöhen. Nach dem Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff erfolgte die Lagerung der Glycerinkultur bei einer Temperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4 Herstellung kompetenter Zellen

6.4.1 Herstellung hitzeschockkompetenter Zellen

Zur Erzeugung chemisch kompetenter (hitzeschockkompetenter) Zellen wurde vom jeweiligen Stamm Zellmaterial aus der Glycerinfrierkultur bzw. von Platte in 5 ml LB-Medium überführt und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm über Nacht in einen Inkubationsschüttler gestellt. Von der Übernachtskultur dienten 2 ml zum Inokulieren von 100 ml LB. Die Kultur wurde bis zu einer OD von 0,4 bis 0,5 bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm geschüttelt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Photometer. Als Blindwert diente 1 ml LB-Medium in einer Halb-Mikroküvette, von der Probe wurde ebenfalls 1 ml in einer Küvette vermessen. Bei Erreichen der gewünschten Zelldichte wurde die Kultursuspension in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5000 rpm für 6 min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die vorsichtige Resuspendierung des Zellpellets auf Eis in 25 ml TFB I (Tab. 6.4). Die Zellsuspension konnte nach 10-minütiger Inkubation auf Eis bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5000 rpm 5 min abzentrifugiert werden. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen erneut resuspendiert, diesmal in 4 ml TFB II (Tab. 6.4), wobei die Zellen stetig auf Eis inkubierten. Die kompetenten Zellen wurden im Anschluss in eiskalte 1,5 ml-Reaktionsgefäße zu Aliquots von jeweils 100 μl aufgeteilt und nach dem Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tab. 6.4: Lösungen zum Herstellen von chemisch kompetenten Zellen.

Lösung	Zusammensetzung
TFB I	30 mM Kaliumacetat
	10 mM Calciumchlorid
	100 mM Kaliumchlorid
	50 mM Manganchlorid
TFB II	15% (v/v) Glycerin
	10 mM MOPS (steril filtriert)
	75 mM Calciumchlorid
	10 mM Kaliumchlorid
	15% (v/v) Glycerin

6.4.2 Herstellung elektrokompenter Zellen

Für eine Inokulation von 200 ml LB-Medium zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 5 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes genutzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte auch hier schüttelnd bei 200 rpm und 37 °C bis zu einer OD von 0,4 bis 0,7 (vgl. 6.4.1). Anschließend konnte die Zellsuspension in 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und die Zellen durch Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm in einer Tischzentrifuge über eine Dauer von 6 min vom Medium getrennt werden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in insgesamt 100 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin vorsichtig auf Eis resuspendiert und anschließend wieder bei 5000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Im Folgenden wurden die durchgehend auf Eis gekühlten Zellen noch mindestens dreimal mit jeweils einem Gesamtvolumen von 50 ml, 25 ml und 10 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin gewaschen. Nach Verwerfen des letzten Überstandes erfolgte die Resuspendierung der Zellen in maximal 1 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin. Daraus wurden Aliquots zu je 60 µl in kalte 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die elektrokompenter Zellen konnten nun nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert werden.

6.5 Transformation

Für das Einbringen von Fremd-DNA (Ligationsansätze, Plasmide, Vektorstrukture) in Zellen diente zum einen die Hitzeschocktransformation unter Verwendung chemisch kompetenter Zellen und zum anderen die Elektroporation unter Nutzung elektrokompetenter Zellen.

6.5.1 Hitzeschocktransformation

Die Transformation durch Hitzeschock fand insbesondere für Ligationsansätze Verwendung. Hierbei wurden bis zu 10 µl der unter 6.12.1.3 bzw. 6.12.2.6 hergestellten Ligationen zu jeweils 100 µl chemisch kompetenten Zellen (6.4.1) gegeben und mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Nach 1-minütigem Hitzeschock bei 42 °C in einem Wasserbad wurde die Mischung 2 min auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 900 µl LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm für 1 h schüttelnd inkubiert. Die Zellsuspension wurde teilweise bei 10000 rpm 30 s bis 1 min in einer Mikrozentrifuge abzentrifugiert und der Großteil des Überstandes verworfen, während die Zellen im verbleibenden Rest resuspendiert wurden. Die konzentrierte Mischung bzw. die ursprüngliche Suspension konnten dann auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert werden. Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum überführt. Die Kulturen standen nach Übernachtinkubation in einem Schüttler bei 200 rpm und 37 °C für weitere Arbeiten, zum Beispiel einer Plasmidpräparation, zur Verfügung.

Bei Verwendung von Klonierungsvektoren wie pBluescript SK(+), pCR2.1 TOPO und pGEM Teasy (s. Tab. 6.2) wurde bei der Transformation eine Blau/Weiß-Selektion durchgeführt. Dazu dienten LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum, die vor dem Ausstreichen der Zellsuspension mit 40 µl einer Lösung von 20 mg/ml X-Gal in DMF und 40 µl einer 20 mg/ml IPTG-Lösung imprägniert wurden.

6.5.2 Elektroporation

Bei dieser Methode erfolgt die Aufnahme der DNA über ein starkes elektrisches Feld, wodurch die Membran-Permeabilität zur Aufnahme von Fremd-DNA erhöht wird. Dies wird durch das Anlegen einer sehr hohen Spannung erreicht.

Für die Elektroporation wurden 1-2 µl Plasmid-DNA bzw. bis zu 8 µl Ligationsansatz (aus 6.12.1.3 bzw. 6.12.2.6) zu 60 µl elektrokompetenten Zellen (6.4.2) gegeben. Für die Transformation war im Vorfeld eine Bestrahlung der Elektroporationsküvetten (0,2 cm Dicke) mit UV-Licht in einem UV-Crosslinker für 10 min notwendig, um eine Sterilisation zu erzielen. Die Zellen mit DNA wurden in die sterilen, auf Eis gekühlten Küvetten überführt und diese im Elektroporator (Programm Ec2) einer kurzzeitigen Spannung von 2500 V ausgesetzt und sofort 900 µl LB-Medium zugegeben. Nach Überführen der Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß schloss sich eine 1-stündige Schüttelinkubation bei 37 °C und 200 rpm an. Nach Zentrifugation der Suspension bei 10000 rpm für 30 s bis 1 min in einer Mikrozentrifuge wurde der größte Teil des Überstandes verworfen und die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert. Teilweise fand auch die ursprüngliche Zellsuspension Verwendung. Die Zellen konnten dann auf einer LB-Agarplatte mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert werden. Im Falle einer Blau/Weiß-Selektion erfolgte vorher noch eine Imprägnierung der Platte mit X-Gal und IPTG (vgl. 6.5.1).

6.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der Biosynthesegene wurde die Polymerase Kettenreaktion (PCR) genutzt, wobei als Templat jeweils das entsprechende, unter Tab. 6.1 aufgelistete Cosmid Verwendung fand. Für Kontrollversuche, in denen die PCR als Nachweisexperiment diente, handelte es sich beim Templat um das jeweils zu untersuchende Plasmid. Im Falle von Kolonie-PCR wurde anstelle reiner DNA direkt die jeweilige Kolonie eingesetzt und die Bedingungen, bis auf eine verlängerte Denaturierungszeit von 5 min zu Beginn beibehalten. Der für die PCR zu verwendende Klon wurde mit einem Zahnstocher von Platte gepickt, Zellmaterial davon in das PCR-Gefäß überführt und anschließend auf eine LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platte konnte dann über Nacht bei

37 °C inkubiert werden, um im Falle eines positiven Resultats den Stamm für weitere Verwendungszwecke zur Verfügung zu haben. Die Reaktionsansätze hatten jeweils die unten aufgeführte Zusammensetzung, wobei die für das Gen entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer dienten (Tab. 6.5). Die Primer wurden entsprechend 6.6.1 auf eine Konzentration von 50 µM gebracht und für die PCR verwendet.

1 µl	Templat (Cosmid bzw. Plasmid)
1 µl	dNTP (10 mM je Nukleotid)
0,5 µl	Vorwärtsprimer (50 µM)
0,5 µl	Rückwärtsprimer (50 µM)
5 bzw. 10 µl	Puffer (10x bzw. 5x)
0,25 µl	DNA-Polymerase
ad 50 µl	MilliQ-H ₂ O _{dest.}

Für Nachweisexperimente, Kolonie-PCR oder A-tailoring (6.12.1.2) wurde die *Taq*-DNA-Polymerase und der entsprechende 10x ThermoPol-Puffer verwendet, während für die Amplifizierung der Biosynthesegene eine DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität genutzt wurde. Dabei kam die *Pfu*-DNA-Polymerase oder das Expand High Fidelity PLUS PCR System zum Einsatz. Bei letztgenanntem ist neben der proof-reading-DNA-Polymerase zusätzlich noch die *Taq*-DNA-Polymerase enthalten. Als Reaktionspuffer kamen die vom Hersteller, mit der Polymerase mitgelieferten Puffer zum Einsatz. Die jeweils mit angesetzten Negativkontrollen enthielten alle Bestandteile bis auf die DNA. Die Reaktionsmischungen wurden dann im Thermocycler dem unten aufgeführten Temperaturprogramm unterzogen. Die Ermittlung der Annealingtemperatur erfolgte in Anlehnung an die in Tab. 6.5 aufgelisteten Temperaturen der jeweiligen Primerpaare. Die Zeit zur Amplifikation des Gens richtete sich nach der entsprechenden Fragmentgröße (1 min Elongationszeit ist nötig für die Amplifizierung von circa 1000 bp).

Heizdeckel	105 °C		
Initiierung	96 °C	2 min	
Denaturierung	96 °C	30 s	} 35 Zyklen
Annealing		30 s	
Elongation	72 °C	30 s - 1 min	
Elongation	72 °C	5 min	
Abkühlung	4 °C		

Für die Kontrolle der Amplifizierung wurden 5 µl der PCR-Produkte bzw. der Negativkontrollen abschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (6.7).

6.6.1 Verwendete Primer

Für die PCR der Biosynthesegene mussten Primer mit geeigneten Schnittstellen entworfen werden. Dabei wurden jeweils Restriktionsstellen gewählt, die in verschiedenen Expressionsvektoren verwendet werden können und bei der Expression nicht zu einem Frameshift führen. Teilweise wurde eine Anpassung der Basenpaare an den Codon-Gebrauch (codon usage) in *E. coli* vorgenommen. Wenn es sich bei dem jeweiligen Gen nicht um eines mit eigenem ORF (open reading frame, offener Leseraster) im Cluster handelte und am Genende folglich kein Stopcodon vorhanden war, musste beim Rückwärtsprimer ein solches Translationsstoppsignal integriert werden. Bei Verwendung des Vektors pET52b(+) wurde weder ein Start- noch ein Stop-Signal in die Primer eingebracht, da bei diesem das exprimierte Protein sowohl einen N-terminalen Strep-tag als auch einen C-terminalen His₁₀-tag enthält. Im Falle des IMPACT-CN-Systems, das für die Erzeugung von Intein-Fusionsproteinen genutzt wird, wurden die Primer entsprechend der Herstellerangaben für pTYB1 mit den Schnittstellen *NdeI* und *SapI* kreiert. Die Wahl der vier Basenpaare, die nach der Erkennungssequenz des Enzyms *SapI* im Rückwärtsprimer variieren können, richtete sich nach den Herstellervorgaben. Durch die so gewählten Basenpaare im Rückwärtsprimer befinden sich nach der Spaltung des C-terminalen Chitinbinde-Fusionsproteins am Ende des klonierten Enzyms keine zusätzlichen Aminosäuren. Für die Überprüfung des Gens *sfp* im Vektor pREP4 *sfp* fanden spezifische Primer in der PCR Verwendung, wobei als Templat der Vektor diente. Die Primersequenz wurde in Anlehnung an die Literatur gewählt.^{100, 111}

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Zu den erhaltenen lyophilisierten Primern wurde jeweils TE-Puffer (Tab. 6.6) gegeben, so dass eine 500 µM Lösung entstand. Diese musste vor dem Einsatz in der PCR noch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt werden, um eine Konzentration von 50 µM zu erhalten. Alle verwendeten Primer sind in Tab. 6.5 aufgelistet.

Tab. 6.5: Verwendete Primer und ihre Eigenschaften.

Gen ^a	Primernamen	Sequenz in 5' → 3' (eingebaute Schnittstelle) ^b	Temp. ^c
<i>pedA</i>	pedAmalF	AAA <u>GAA TTC</u> CTT AAG CAA CGG CTA TTC GAA (<i>EcoRI</i>)	55°C
	pedAmalR	AAA <u>AAG CTT</u> CTA CTT TTG CGC GCA GAT GA (<i>HindIII</i>)	55°C
<i>pedB</i>	pedB_pRSETf	AAA <u>AGA TCT</u> ATT ACC GCT GAA AAA CTC GGC TCC (<i>BglII</i>)	67°C
	pedB_pRSETr	AAA <u>AGA TCT</u> TCA AGT TGA AAC TGC TGC ATG GTC (<i>BglII</i>)	65°C
<i>pedB</i> (pTYB1)	pedBtyb1f	GGT GGT <u>CAT ATG</u> ATT ACC GCT GAA AAA CTC GGC TCC CGC (<i>NdeI</i>)	63°C
	pedBtyb1r	GGT GGT <u>TGC TCT TCC GCA</u> AGT TGA AAC TGC TGC ATG GTC ATG (<i>SapI</i>)	65°C
<i>pedC</i> (pHIS8-3)	pedC_fp_BglII	<u>AGA TCT</u> AAA GAC TTG CAA AAT ATA CAG AAC A (<i>BglII</i>)	59°C
	pedC_rp_SalI	<u>GTC GAC</u> CTA ACG TTG GTC GAG TTC GAG (<i>SalI</i>)	59°C
<i>pedC</i> (pET52b(+))	pedC_FP_XmaI	<u>CCC GGG</u> AAA GAC TTG CAA AAT ATA CAG AAC (<i>XmaI</i>)	57°C
	pedC_RP_SacI	<u>GAG CTC</u> ACG TTG GTC GAG TTC GAG CA (<i>SacI</i>)	57°C
<i>pedD</i>	pedD_FP	AAA <u>GAA TTC</u> AAA TCG TAC CTT TTT CCC GGG (<i>EcoRI</i>)	57°C
	pedD_RP	AAA <u>AAG CTT</u> TCA CCA CAC CTT TTC AAC TAA A (<i>HindIII</i>)	55°C
<i>pedE</i>	pedEmalF	AAA <u>GGA TCC</u> CAG ACC GCT ATC GCT GAT G (<i>BamHI</i>)	55°C
	pedEmalR	AAA <u>CTG CAG</u> TTA CAG CTT TTT AGC CAT CAC G (<i>PstI</i>)	57°C

Fortsetzung Tab. 6.5

Gen ^a	Primername	Sequenz in 5' → 3' (eingebaute Schnittstelle) ^b	Temp. ^c
<i>pedF</i> (A-Domäne)	pedF_A-domain_FP	AAA <u>GAA TTC</u> CGG GAA CTG ACG ATG TTG AG (<i>EcoRI</i>)	57°C
	pedF_A-domain_RP	AAA <u>AAG CTT</u> TCA ACG CTC TAT ATC TGA GCA CGG (<i>HindIII</i>)	59°C
<i>pedGNAT-ACP</i>	GNAT-ACP_FP_Bam	<u>GGA TCC</u> CGG GCA GCG GAA TTG ATC AT (<i>BamHI</i>)	57°C
	GNAT-ACP_RP_Hind	<u>AAG CTT</u> TCA TCC AAA ATG CTG ATT AAG GTA GT (<i>HindIII</i>)	57°C
<i>pedH</i> (A-Domäne)	pedH_A-domain_FP	AAA <u>GAA TTC</u> GCT GAT CAG ACG TTA CTT TCA (<i>EcoRI</i>)	55°C
	PedH_A-domain_RP2	AAA <u>AAG CTT</u> TCA GAT TTC CAT TGA AGT ACG TGG (<i>HindIII</i>)	55°C
<i>pedI2</i>	pedI2_pRSETf	AAA <u>AGA TCT</u> AAA CAG GCC AGC TAT GTA CAT TTG A (<i>BglII</i>)	65°C
	pedI2_BglII_stop	AAA <u>AGA TCT</u> TCA CTG ATG CTC ACG AAT CAG ATA G (<i>BglII</i>)	67°C
<i>pedI2</i> (pTYB1)	pedI2tyb1f	GGT GGT <u>CAT ATG</u> AAA CAG GCC AGC TAT GTA CAT TTG (<i>NdeI</i>)	63°C
	pedI2tyb1r	GGT GGT <u>TGC TCT TCC GCA</u> CTG ATG CTC ACG AAT CAG ATA GTC (<i>SapI</i>)	65°C
<i>pedI3</i>	ped I3_pRSETf	AAA <u>AGA TCT</u> GAG CAG AAG GTA TAT GCG GTC ATT (<i>BglII</i>)	65°C
	pedI3_pRSETr	AAA <u>AGA TCT</u> TCA TAT CAG GCT CCG TAC GTA CTG (<i>BglII</i>)	67°C
<i>pedI3</i> (pTYB1)	pedI3tyb1f	GGT GGT <u>CAT ATG</u> GAG CAG AAG GTA TAT GCG GTC ATT CGC GAT (<i>NdeI</i>)	85°C
	pedI3tyb1r	GGT GGT <u>TGC TCT TCC GCA</u> TAT CAG GCT CCG TAC GTA CTG A (<i>SapI</i>)	61°C

Fortsetzung Tab. 6.5

Gen ^a	Primername	Sequenz in 5' → 3' (eingebaute Schnittstelle) ^b	Temp. ^c
<i>pedM</i>	pedMmalF	AAA <u>GGA TCC</u> TAC AGT GAT AGA AAT ACC ACC G (<i>Bam</i> HI)	57°C
	pedMmalR	AAA <u>CTG CAG</u> TCA TCG ATC TTG CTT TGG GC (<i>Pst</i> I)	55°C
<i>pedN</i>	pedN_pRSETf	AAA <u>AGA TCT</u> ATC CGC GAA CGC ATT TTC AAT GTG ATT GCG AGA AAT ACG CTT GAA GTC CTT (<i>Bgl</i> III)	65°C
	pedN_pRSETr	AAA <u>AGA TCT</u> TCA CTG TAC ATA CTG GCT GAG (<i>Bgl</i> III)	61°C
<i>pedN</i> (pTYB1)	pedNtyb1f	GGT GGT <u>CAT ATG</u> ATC CGC GAA CGC ATT TTC AAT GTG ATT GCG AGA AAT ACG CTT GAA GT (<i>Nde</i> I)	53°C
	pedNtyb1r	GGT GGT <u>TGC TCT TCC GCA</u> CTG TAC ATA CTG GCT GAG TGT ATC (<i>Sap</i> I)	63°C
<i>pedO</i>	pedOmalF	AAA <u>GGA TCC</u> TCT ATA TCC GCA CCT GAT TTT G (<i>Bam</i> HI)	57°C
	pedO_mal_RP	AAA <u>CTG CAG</u> TCA TTT TTG TGC AGA TAC GAA AAG (<i>Pst</i> I)	59°C
<i>pedP</i>	pedPmalF	AAA <u>GGA TCC</u> CCA GTT GGG ATT GAA GCG AT (<i>Bam</i> HI)	55°C
	pedPmalR	AAA <u>CTG CAG</u> CTA CTC AAT CCA TTC ATA ATG G (<i>Pst</i> I)	55°C
<i>onnD</i>	onnDmalF	AAA <u>GGA TCC</u> ACA GTA ACA CAA TAC GAA TTC AA (<i>Bam</i> HI)	55°C
	onnDmalR	AAA <u>CTG CAG</u> CTA CTT CTG TCC GAA AGT AAA A (<i>Pst</i> I)	55°C

Fortsetzung Tab. 6.5

Gen ^a	Primername	Sequenz in 5' → 3' (eingebaute Schnittstelle) ^b	Temp. ^c
<i>sfp</i>	Sfp-f (EcoRI)	ATA <u>GAA TTC</u> GGC TTT GTT TTT TTA TTT TC (<i>EcoRI</i>)	67°C
	Sfp-r (EcoRI)	TAA <u>GAA TTC</u> TTC CTC AGG ATC TGC C (<i>EcoRI</i>)	67°C

^a = zu amplifizierendes Gen

Konnte der entsprechende Primer für das Gen nur für einen ganz bestimmten Vektor verwendet werden, so wurde dieser in Klammern hinter das Gen geschrieben.

^b Die jeweiligen Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen hervorgehoben. Die Stopcodons in den Rückwärtsprimern sind kursiv dargestellt und wurden bei Nichtvorhandensein im zu amplifizierenden Gen/Genfragment im Rückwärtsprimer bei Bedarf eingefügt. Die letzten 4 Basen der *SapI*-Erkennungssequenz im Rückwärtsprimer (für pTYB1-Klonierungen) sind durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Diese Nukleotide können i. a. variieren, im Falle der hier vorliegenden Klonierung entsprechen sie den Herstellerangaben (s. Text).

^c = Annealing-Temperatur des Primers

Die Berechnung erfolgte entsprechend der allgemeinen Regel, dass pro bindendem Guanin oder Cytosin 4 °C und bei Ausbildung der 2 H-Brücken bei Adenin oder Thymin 2 °C aufsummiert werden, vom Ergebnis wurden dann 5 °C abgezogen. Für die Berechnung wurden nur direkt am Templat bindende Basen einbezogen. Restriktionsschnittstellen und davor liegende Basen, die aufgrund des Codon-Gebrauchs (codon usage) geändert wurden, flossen nicht in die Ermittlung ein. Die Annealing-Temperatur der Primerpaare für die PCR wurden aus den einzelnen Temperaturen der Primer abgeleitet.

6.7 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese von DNA wurde 1% (w/v) Agarose in 1x TAE (0,12% (v/v) Eisessig, 0,48% (w/v) Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) durch Kochen in einer Mikrowelle gelöst und anschließend 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Nach dem Gießen und Erhärten des Gels konnten die Proben in die Taschen gegeben werden. Diese wurden vorher mit der entsprechenden Menge Ladepuffer versetzt, wobei sich die Wahl des Puffers nach der zu erwartenden Fragmentgröße richtete. Nur bei sehr kleinen Fragmenten wurde ein 6x Xylencyanol-Ladepuffer (0,25% (w/v) Xylencyanol, 30% (v/v) Glycerin) eingesetzt, ansonsten fand ein 6x Bromphenolblau-Ladepuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau, 30% (v/v) Glycerin) Verwendung. Für kleine Fragmente wurde teilweise auch 1,5% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer verwendet. Als Marker dienten entweder 0,6-1 µl eines 1 kb- oder eines 100 bp DNA-Markers (s. 6.18). Nach dem Auftragen lief das Gel in 1x TAE-Elektrophoresepuffer bei einer angelegten Spannung von 90-100 V und die Banden wurden abschließend unter UV-Licht mit Hilfe einer Geldokumentation ausgewertet.

6.8 Aufreinigung von Gelfragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die entsprechende Probe auf ein Agarosegel aufgetragen (6.7), wobei in eine Tasche 5 µl der Probe und in einer größeren Tasche 30-45 µl der Probe gegeben wurden. Nach dem Laufen des Gels (6.7) konnten die beiden Teile des Gels mit der größeren bzw. kleineren Tasche mit einem Skalpell auseinander geschnitten und nur das Stück mit der geringeren aufgetragenen Menge unter UV-Licht betrachtet werden. In Höhe des interessierenden Fragments wurden entsprechend der Bandenstärke mit dem Skalpell zwei Schnitte angedeutet. Die beiden o. g. Teile des Gels wurden anschließend außerhalb der UV-Kammer nebeneinander gelegt und durch die angedeuteten Schnitte konnte das korrekte Fragment aus dem nicht dem UV-Licht ausgesetzten Teil des Agarosegels mit dem Skalpell ausgeschnitten werden und der Gelblock in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt werden. Das Gelstück mit dem enthaltenen Fragment wurde im Folgenden mit dem Geextraktionskit der Fa. Qiagen entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt und am Ende in 30 µl des zum Kit gehörenden Elutionspuffer aufgenommen. Die erfolgte Elution konnte durch Auftragen von 3-5 µl der DNA auf ein Agarosegel (vgl. 6.7) überprüft werden.

6.9 Plasmidpräparation

Zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen diente eine Plasmidpräparation aus Übernachtskulturen. Dazu wurde eine Einzelkolonie von LB-Agarplatte bzw. Zellmaterial aus einer -80 °C-Glycerinkultur (6.3) in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und die Kultur über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in einem Inkubationsschüttler gestellt. Von der Übernachtskultur wurden 1,5 ml in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellsuspension bei 14000 rpm für 1 min in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Die Resuspendierung des Zellpellets erfolgte in 200 µl Puffer I (Tab. 6.6). Die Suspension wurde dann etwa 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um den Abbau der RNA durch die im Puffer enthaltene RNase weitestgehend vollständig zu erreichen. Anschließend wurden 200 µl Puffer II (Tab. 6.6) zugegeben, durch Drehen des Gefäßes die Flüssigkeiten gemixt und 200 µl Puffer III (Tab. 6.6) zugefügt. Nach dem Mischen der Lösung und 3-minütigen Zentrifugieren bei 14000 rpm in einer Mikrozentrifuge wurde der klare

Überstand zu 500 µl Chloroform gegeben, kräftig geschüttelt und erneut bei 14000 rpm zentrifugiert für eine Dauer von 5 min. Die obere (wässrige) Phase konnte dann zu 350 µl Isopropanol gegeben werden und nach kräftigem Schütteln schloss sich eine Inkubation bei -20 °C für mindestens 20 min an. Nach anschließender 20-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm in einer Kühlmikrozentrifuge wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% (v/v) kaltem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde abschließend 20 min in einer Speedvac getrocknet und in 50 µl MilliQ-Wasser aufgenommen.

Tab. 6.6: Puffer für die Plasmidpräparation.

Puffer	Zusammensetzung
	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Puffer I	10 mM EDTA, pH 8,0 100 µg/ml RNase A, gelöst in TE-Puffer*
Puffer II	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
Puffer III	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
TE Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0

*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.

6.10 DNA-Konzentrationsbestimmung

Für die Analyse der Reinheit von DNA aus Plasmidpräparationen (6.9) und deren Konzentrationsermittlung wurde eine photometrische Bestimmung gewählt. Hierzu dienten 5 µl der Probe, die zu 95 µl MilliQ-Wasser in einer Mikroküvette (70-850 µl) gegeben (= 1:20-Verdünnung) und im Biophotometer gegen MilliQ-Wasser als Blindwert gemessen wurden. In dem entsprechenden voreingestellten Programm werden u. a. die Absorptionen bei 260 nm (= Maximum der DNA-Absorption) und bei 280 nm (= Maximum der Proteinabsorption) bestimmt. Als Basiswert wird angenommen, dass eine Absorption von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer DNA-Menge von 50 µg entspricht. Dieser Wert stellt einen empirisch ermittelten und allgemein verwendeten Erfahrungswert dar. Des Weiteren wird der Quotient aus

den Absorptionen bei 260 und 280 nm unter Berücksichtigung eines systematischen Fehlers berechnet. Je höher der Anteil an DNA gegenüber Protein in der Probe ist, desto näher befindet sich der Wert an 2. Folglich gibt dieser Quotient den Grad der Reinheit der DNA an. In dem Programm werden direkt die DNA-Konzentration der verdünnten Probe und der oben erwähnte Quotient angegeben. Die Konzentrationsangabe musste durch die vorhergehende Verdünnung noch mit 20 multipliziert werden: $c_{\text{Probe}} [\mu\text{g/ml}] = c_{\text{gemessen}} [\mu\text{g/ml}] \times 20$

6.11 Restriktion von DNA

Für die Restriktion von DNA fanden diverse Endonukleasen Verwendung, die entsprechend der Herstellerangaben zusammen mit dem geeigneten Puffer und -falls erforderlich- unter Zugabe von BSA (Bovin Serum Albumin) eingesetzt wurden. In der Regel dienten pro μg Plasmid-DNA 5 units des Restriktionsenzymes. Nach Zugabe des entsprechenden Puffers und (eventuell) BSA wurde mit destilliertem Wasser zum jeweiligen Volumen aufgefüllt. Für präparative Zwecke hatte der Ansatz ein Volumen von insgesamt 50 μl , während für Kontrollverdaus das Gesamtreaktionsvolumen 5 μl betrug und davon in der Regel 1 μl DNA war. Die DNA, die aus Plasmidpräparationen stammte, hatte meist etwa eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Bestimmung der Konzentration s. 6.10). Da nicht für jeden Verdau gesondert vorher eine DNA-Konzentrationsbestimmung durchgeführt wurde, wurde i. a. von diesem Mittelwert ausgegangen und entsprechend hatten die Restriktionsansätze jeweils die mengenmäßig gleiche Zusammensetzung. Nach Zusammengabe der Reaktionspartner wurde die Probe bei der für das Enzym vorgegebenen Temperatur für 2 h inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung erfolgte nicht, wenn sich eine weitere Aufreinigung der entsprechenden Banden aus dem Agarosegel (6.8) anschloss oder es sich um einen Kontrollverdau handelte. Ansonsten wurde das Enzym entsprechend den Herstellerangaben hitzeinaktiviert.

In jedem Fall erfolgte aber die Kontrolle der Restriktion durch Auftragen auf ein Agarosegel (6.7). In der Regel wurden dabei 5 μl des Ansatzes verwendet, für präparative Zwecke entsprechend Abschnitt 6.8 ein größeres Volumen genutzt.

6.12 Klonierung

6.12.1 Klonierung der PCR-Produkte und Sequenzierung

Zur Lagerung, Restriktion und ständigen Verfügbarkeit der Biosynthesegene wurden die erhaltenen PCR-Produkte in die Vektoren pGEMTeasy, pCR2.1 TOPO oder in pBluescript SK(+) ligiert (Tab. 6.2). Dies erfolgte über eine TA-Klonierung (6.12.1.3). Hierzu waren PCR-Produkte mit A-Überhängen notwendig, die -falls erforderlich- über ein A-tailoring angefügt wurden (6.12.1.2). Bei Verwendung des Expand High Fidelity PCR Systems war ein Anfügen von A-Überhängen an die amplifizierten Gene nicht notwendig, da es sich hierbei um ein Gemisch von proof reading Polymerase und *Taq*-Polymerase handelt (s. 6.6).

In jedem Fall mussten die PCR-Produkte aufgereinigt werden (6.12.1.1). Da für die Expression der Biosynthesegene kein Fehler in der Nukleotidsequenz auftreten darf, schloss sich nach erfolgreicher Klonierung eine Sequenzierung an (6.12.1.5).

6.12.1.1 Reinigung der PCR-Produkte

Nach Amplifizierung des interessierenden Gens mittels PCR (6.6) wurde dieses vor der Klonierung mittels dem PCR-Purification Kit der Fa. Qiagen gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt oder entsprechend Abschnitt 6.8 aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gereinigt und auf einem Agarosegel kontrolliert (6.7).

6.12.1.2 A-Tailoring

Da die PCR-Produkte bei der Amplifizierung unter Verwendung der *Pfu*-DNA-Polymerase glatte Enden (blunt ends) haben, war vor der TA-Klonierung in die entsprechenden Vektoren noch ein A-tailoring notwendig. Dabei werden an die glatten Enden der amplifizierten Gene 3'-dATP-Überhänge angefügt, wobei hierfür die *Taq*-DNA-Polymerase mit dem entsprechenden Puffer Verwendung fand. Das PCR-Produkt wurde entsprechend 6.12.1.1 aufgereinigt und in der folgenden Reaktion eingesetzt:

2 µl	PCR-Produkt, gereinigt
2 µl	dATP (1 mM)
1 µl	ThermoPol-Puffer (10x)
0,25 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 u/µl)
ad 10 µl	H ₂ O _{dest.}

Das Reaktionsgemisch wurde bei 72 °C für 30 min inkubiert und anschließend für die Ligation in die Vektoren mit dTTP-Überhängen genutzt, wobei 2-7 µl der nun erhaltenen Reaktionsmischung verwendet wurden.

6.12.1.3 TA-Klonierung

Im Fall der kommerziell erhältlichen TA-Klonierungsvektoren pGEMTeasy bzw. pCR2.1 TOPO befinden sich an den 3'-Enden schon dTTP-Überhänge, wodurch keine weitere Behandlung dieser vor dem Einbringen der PCR-Produkte mit dATP-Überhängen in die Vektoren erfolgen muss. Bei der Klonierung wurde entsprechend den Herstellerangaben vorgegangen, wobei entweder direkt das gereinigte PCR-Produkt Verwendung fand (6.12.1.1) oder eine weitere Behandlung mit dATP notwendig war und das dann erhaltene PCR-Produkt mit 3'-dATP-Überhängen eingesetzt wurde (6.12.1.2).

Bei Nutzung von pBluescriptSK(+) als TA-Klonierungsvektor musste dieser erst zu einem offenen Plasmid mit dTTP-Überhängen abgewandelt werden. Als erstes wurde dazu die Plasmid-DNA isoliert (6.9) und nach der Konzentrationsbestimmung (6.10) mit *EcoRV* geschnitten (6.11). Nach der Hitzeinaktivierung bei 80 °C für 20 min konnten im Folgenden 3'-dTTP-Überhänge angefügt werden, indem *Taq*-DNA-Polymerase mit einer Menge von 0,25 units pro µg DNA und dTTP in einer Endkonzentration von 2 mM eingesetzt wurden. Nach zweistündiger Inkubation bei 70 °C erfolgte die Zugabe des doppelten Volumens Chloroform. Die Probe wurde kräftig geschüttelt und bei 13000 rpm für 5 min in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Die obere Phase wurde dann zu 0,7 Volumen (gerechnet vom Ausgangsvolumen) Isopropanol gegeben und wiederum kräftig geschüttelt. Nach dem Einfrieren bei -20 °C für etwa 30 min erfolgte die DNA-Fällung durch zentrifugieren bei 13000 rpm und 4 °C über eine Dauer von 20 min in einer Mikrozentrifuge. Nach Entfernen des Überstandes wurde mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen, die DNA in der Speedvac für 20 min getrocknet und

anschließend im selben Volumen MilliQ-Wasser aufgenommen, wie zu Beginn von der Plasmidpräparation eingesetzt wurde. Eine Lagerung des selbst hergestellten TA-Klonierungsvektors war bei -20 °C möglich. Die Ligation mit dem PCR-Produkt wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt, wobei die Reaktion folgende Zusammensetzung hatte:

- 7 µl PCR-Produkt, gereinigt, mit 3'-dATP-Überhang
- 1 µl pBluescriptSK(+), *EcoRV*, mit 3'-dTTP-Überhang
- 1 µl T4 DNA-Ligase-Puffer (10x)
- 1 µl T4 DNA-Ligase

6.12.1.4 Transformation und Überprüfung

Nach dem Transformieren des Ligationsmixes aus 6.12.1.3 in *E. coli* XL1-Blue bzw. *E. coli* TOP10 über eine Hitzeschocktransformation (6.5.1) bzw. Elektroporation (6.5.2) wurden entsprechend der Blau/Weiß-Selektion die weißen Kolonien gepickt und jeweils eine LB-Übernachtskultur (6.2.1) mit dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt (Tab. 6.2).

Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung in pCR2.1 TOPO bzw. pGEMTeasy konnte die Restriktion mit der Endonuklease *EcoRI* durchgeführt werden (6.11). Da sich eine *EcoRI*-Schnittstelle vor und nach der Klonierungsstelle bei den Vektoren befindet, ist folglich beim Auftragen des Verdau auf ein Agarosegel (6.7) das klonierte Fragment in der entsprechenden Höhe sichtbar. Bei Nutzung des Vektors pBluescriptSK(+) wurden die durch die Primer in das PCR-Produkt eingebauten Restriktionsschnittstellen genutzt (Tab. 6.8), um durch einen Verdau mit diesen (6.11) die erfolgreiche Klonierung nachzuweisen.

6.12.1.5 Sequenzierung

Zur Kontrolle der korrekten Basenabfolge wurde der Vektor mit Insert zum Sequenzieren geschickt (Durchführung durch die Fa. GATC). Dabei fanden die Sequenzierungsprimer M13 Forward und M13 Reverse im Falle von pCR2.1 TOPO bzw. die Primer T7 Forward und SP6 Reverse bei dem Vektor pGEMTeasy Verwendung. Bei Nutzung von pBluescriptSK(+) wurden die Primer T7 Forward und T3 Reverse eingesetzt (Tab. 6.7). Die erhaltenen Sequenzen konnten im

Folgenden mit der theoretischen Nukleotidsequenz des amplifizierten Gens im Programm Seqman (DNASTar) verglichen werden.

Tab. 6.7: Verwendete Sequenzierungsprimer.

Primername	Sequenz (5'→3')
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
T7 Forward	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6 Reverse	GATTTAGGTGACACTATAG
T3 Reverse	ATTAACCCTCACTAAAGGGA

Bei korrekter Sequenz des Inserts wurde von der jeweiligen Übernachtskultur entsprechend 6.3 eine Glycerinfriekultur angelegt und für weitere Arbeiten gelagert (Tab. 6.8).

Tab. 6.8: Konstrukte der klonierten PCR-Produkte.

Name	Konstrukt	codiertes Enzym	Schnittstellen Gen
pH2*	<i>pedD</i> / pCR4 blunt TOPO	Acyltransferase	<i>Bam</i> HI / <i>Bam</i> HI
pKZ8	<i>pedI3</i> / pCR2.1 TOPO	Acylcarrierprotein	<i>Nde</i> I / <i>Sap</i> I
pKZ9	<i>pedN</i> / pCR2.1 TOPO	Acylcarrierprotein	<i>Nde</i> I / <i>Sap</i> I
pKZ11	<i>pedB</i> / pCR2.1 TOPO	Oxidoreduktase	<i>Nde</i> I / <i>Sap</i> I
pKZ16	<i>pedI2</i> / pCR2.1 TOPO	Acylcarrierprotein	<i>Nde</i> I / <i>Sap</i> I
pKZ32	<i>pedN</i> / pCR2.1 TOPO	Acylcarrierprotein	<i>Bgl</i> II / <i>Bgl</i> II
pKZ57-1	<i>pedI3</i> / pCR2.1 TOPO	Acylcarrierprotein	<i>Bgl</i> II / <i>Bgl</i> II
pKZ79-1	<i>pedI2</i> / pCR2.1 TOPO	Acylcarrierprotein	<i>Bgl</i> II / <i>Bgl</i> II
pKZ90-1	<i>pedA</i> / pCR2.1 TOPO	Methyltransferase	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III

Fortsetzung Tab. 6.8

Name	Konstrukt	codiertes Enzym	Schnittstellen Gen
pKZ91-1	<i>pedE</i> / pCR2.1 TOPO	Methyltransferase	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I
pKZ147-1	<i>pedP</i> / pGEMTeasy	HMGCoA-Synthase	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I
pKZ149-1	<i>onnD</i> / pGEMTeasy	Methyltransferase	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I
pKZ154-3	<i>pedB</i> / pGEMTeasy	Oxidoreduktase	<i>Bg</i> II / <i>Bg</i> III
pKZ155-1	<i>pedM</i> / pGEMTeasy	Ketosynthase	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I
pKZ156-1	<i>pedO</i> / pGEMTeasy	Methyltransferase	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I
pKZ168-1	<i>pedF</i> (A-Domäne) / pBluescriptSK(+)	A-Domäne der NRPS	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III
pKZ171-1	<i>pedH</i> (A-Domäne) / pGEMTeasy	A-Domäne der NRPS	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III
pKZ177-10	<i>pedD</i> / pBluescriptSK(+)	Acyltransferase	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III
pKZ188-3	<i>pedC</i> / pBluescriptSK(+)	Acyltransferase	<i>Bg</i> II / <i>Sal</i> I
pKZ195-1	<i>pedC</i> / pBluescriptSK(+)	Acyltransferase	<i>Xma</i> I / <i>Sac</i> I
pKZ196-1	<i>pedGNAT-ACP</i> / pBluescriptSK(+)	Acylcarrierprotein	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III

* Das Plasmid pH2 wurde von Hong Chang konstruiert und für diese Arbeit anfänglich mit genutzt.

6.12.2 Klonierung in den Expressionsvektor

6.12.2.1 Restriktion der Fragmente

Zur Klonierung des interessierenden Gens in den Expressionsvektor wurden die Restriktionsschnittstellen genutzt, die durch die Primer an das Fragment angefügt wurden (Ausnahmen sind in Tab. 6.9 ^{d, e, f} erläutert). Hierzu wurde aus dem jeweiligen Vektor pGEMTeasy, pCR2.1 TOPO bzw. pBluescriptSK(+) das Biosynthesegen entsprechend 6.11 ausgeschnitten. Die genutzten Konstrukte und

Restriktionsendonukleasen können bis auf die erwähnten Ausnahmen Tab. 6.8 entnommen werden. Nach Auftragen auf ein Agarosegel konnte das jeweilige Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt werden (6.8).

6.12.2.2 Restriktion der Vektoren

Die Expressionsvektoren wurden entsprechend 6.11 mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten wie die Fragmente (Ausnahmen s. Kompatibilität der Schnittstellen: 6.12.2.4). Die nun lineare Vektor-DNA konnte im Folgenden aus dem Gel aufgereinigt (6.8) und der geschnittene Vektor für die Ligation eingesetzt werden.

Nach mehrmaligen Testverdaus wurde für den Vektor pTYB1 festgestellt, dass eine sequentielle Restriktion notwendig ist. Hierfür wurde ein 100 µl-Reaktionsansatz mit 20 µl Vektor (aus Plasmidpräparation, s. 6.9) und dem Enzym *NdeI* mit entsprechenden Puffer für den Verdau bei 37 °C verwendet (6.11) und 5 µl zur Kontrolle der nun linearen DNA auf ein Agarosegel aufgetragen (6.7). Zu den verbleibenden 95 µl wurde das 0,7-fache Volumen Isopropanol zugegeben, kräftig gemixt und die DNA bei 13000 rpm und 4 °C für 20 min in einer Mikroköhlzentrifuge gefällt. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte das Waschen des Pellets mit 50 µl kalten Ethanol und der geschnittene Vektor konnte in der Speedvac getrocknet werden. Nach Zugabe von 50 µl MilliQ H₂O wurden 10 µl abgenommen und in einem 50 µl-Reaktionsansatz mit *SapI* gemäß 6.11 verdaut und entsprechend den Herstellerangaben hitzeinaktiviert. Der nun zweifach geschnittene Vektor wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgereinigt (6.8) und konnte im Folgenden für die Ligation mit den Biosynthesegenen eingesetzt werden (s. unten).

Der Vektor pHIS8-3 *svp* fand für die Klonierung der ACP Verwendung, bei denen eine Coexpression der PPTase (codierendes Gen: *svp*) erforderlich war, um eine Aktivierung der Proteine zu *holo*-ACP zu erreichen (Abb. 3.4). Für die Klonierung von Genen, die keine Coexpression der PPTase benötigen, wurde der Vektor ohne das entsprechende *svp*-Gen eingesetzt. Hierzu musste pHIS8-3 *svp* in einem 50 µl-Ansatz mit *NotI* entsprechend 6.11 verdaut werden, da sich das *svp*-Gen mit ribosomaler Bindestelle in der *NotI*-Stelle des Vektors befindet. Nach Auftragen auf ein Agarosegel konnte die Bande des Vektors ohne das *svp*-Gen aus dem Gel

ausgeschnitten und aufgereinigt werden (6.8). Von dem nun linearen Vektor wurden 1-2 μl für eine Elektroporation in *E. coli* XL1-Blue verwendet (6.5.2). Durch die gleichen klebrigen Enden der *NotI*-Schnittstelle religiert das Plasmid. Die Selektion der Klone erfolgte auf LB-Agarplatte mit Kanamycin (resultierende Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$). Nach Durchführung einer Plasmidpräparation (6.9) wurde folglich der Vektor pHIS8-3 erhalten, der nun kein *svp*-Gen mehr in der *NotI*-Schnittstelle enthält. Dieser konnte für Klonierungen eingesetzt werden und lieferte His₈-Fusionsproteine ohne eine Coexpression der PPTase.

6.12.2.3 Dephosphorylierung der Vektoren

Bei Verwendung derselben klebrigen Enden an beiden Seiten des Fragments (Tab. 6.8) wurde der Vektor folglich auch nur mit diesem Enzym geschnitten (6.11), danach aber noch einer Dephosphorylierung unterzogen, um eine Religation zu vermeiden. Vor der Entfernung der Phosphatgruppe am 5'-Ende der DNA wurde der geschnittene, mittels Gelextraktion gereinigte Vektor (6.12.2.2) noch für eine photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung genutzt (6.10), um die Menge einzusetzender Phosphatase zu ermitteln. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

x μg	Vektor (geschnitten, gereinigt)
1 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ DNA	Antarctic Phosphatase (5 u/ μl)
1-2 μl	10x Puffer Antarctic Phosphatase
ad 10-20 μl	H ₂ O _{dest.}

Die Reaktionsmischung wurde gevortext, kurz abzentrifugiert und dann bei 37 °C über eine Dauer von 60 min inkubiert. Teilweise erfolgte die Inkubation auch zwei- bis dreimal für 20min, wobei jedes Mal wieder Phosphatase in der entsprechenden Menge zugegeben wurde. Abschließend schloss sich eine Hitzeinaktivierung der Phosphatase bei 65 °C für 5 min an. Der dephosphorylierte Vektor konnte in dieser Mischung direkt für die Ligation mit dem Biosynthesegen eingesetzt werden.

6.12.2.4 Kompatibilität der Schnittstellen

Da *BglIII* und *BamHI*-Schnittstellen kompatibel sind, ist auch die Ligation eines *BglIII*-geschnittenen Fragments in die *BamHI*-Stelle des Vektors möglich bzw. umgekehrt. Dadurch kann auch ein *BamHI*-geschnittenes Fragment in die *BglIII*-Stelle von pRSETB kloniert werden, da eine Ligation in die *BamHI*-Seite des

Vektors zu einem Frameshift führen würde und keine Proteinexpression des Biosynthesegens mehr möglich wäre. Da der Vektor pHIS8-3 *svp* bzw. pHIS8-3 in seiner MCS keine geeignete *Bgl*III-Stelle besitzt, aber eine im Frame befindliche *Bam*HI-Erkennungssequenz besitzt, war auch hier eine Klonierung eines *Bgl*III-geschnittenen Fragmentes möglich. Des Weiteren ist ebenso die Klonierung eines Gens mit *Bgl*III-Flanken in die *Bam*HI-Schnittstelle von pMAL-c2X möglich, da sich in der MCS des Vektors keine *Bgl*III-Schnittstelle befindet. Dadurch war es möglich, dieselben Fragmente zur Klonierung in unterschiedliche Expressionsvektoren (pMAL-c2X, pRSETB, pHIS8-3 *svp* bzw. pHIS8-3) zu nutzen, um letztendlich eine Proteinexpression zu verzeichnen. Folglich war es nicht nötig, für jedes Expressionssystem eigene Primer für die Amplifizierung der Gene zu kreieren, vielmehr konnten durch geschickte Wahl der Schnittstellen verschiedene Expressionssysteme genutzt werden.

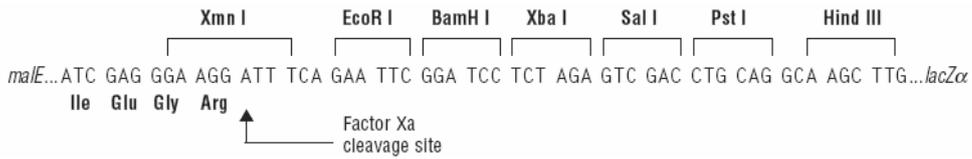
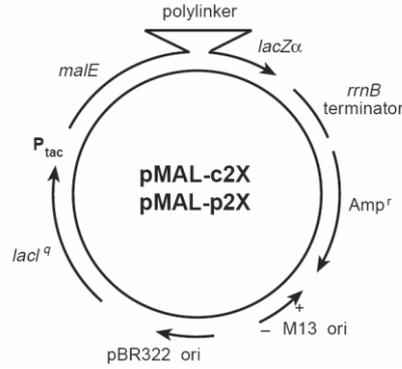
6.12.2.5 MCS und Vektorkarten der Expressionsvektoren

Die verwendeten Expressionsvektoren erzeugen unterschiedliche Fusionsproteine, die sich mittels Affinitätschromatographie von anderen Proteinen trennen lassen. Die Induktion der Proteinherstellung erfolgt bei allen Vektoren durch die Zugabe von IPTG, das den T7-Promotor (pTYB1, pRSETB, pHIS8-3 *svp* bzw. pHIS8-3) oder den Ptac-Promotor (pMAL-c2X) reguliert. Nach der Expression des Fusionsproteins kann eine Trennung des interessierenden Enzyms vom jeweiligen Bindeprotein während der Aufreinigung (Intein-Fusionsprotein aus pTYB1) oder nach der Aufreinigung (MBP-Fusionsprotein aus pMAL-c2X) erfolgen. Im Fall des kurzen His-tags des His-Fusionsproteins aus pRSETB oder pHIS8-3 / pHIS8-3 *svp* ist eine Spaltung nicht erforderlich.

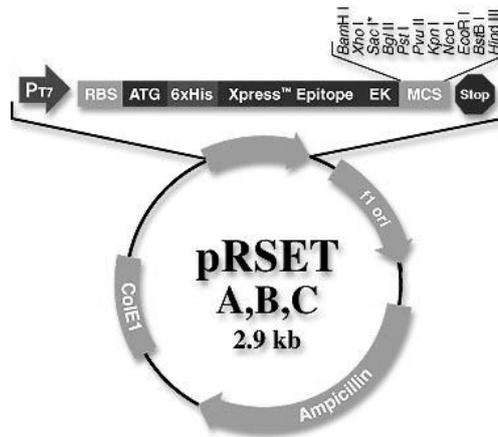
Im Fall von pHIS8-3 *svp* findet durch IPTG-Induktion neben der Expression des His₈-Fusionsproteins noch eine Coexpression der PPTase Svp statt, da das Gen *svp* ebenfalls unter Kontrolle des T7-Promotors liegt. Der Vektor pREP4 *sfp* diente nur zur Coexpression der PPTase, eine Klonierung in den Vektor selbst erfolgte nicht.

Die Vektorkarten und MCS (falls erforderlich) sind im Folgenden dargestellt (Abb. 6.1).

pMAL-c2X



pRSETB



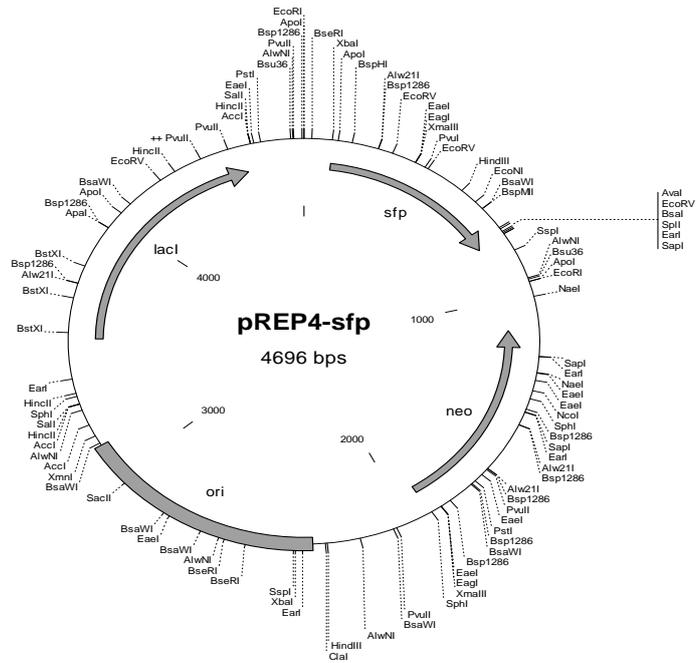
T7 promoter RBS
 AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG GTTTCCTCT AGAAATAATT TTGTTAACT TTAAGAAGGA

Polyhistidine (6xHis) region
 GATATACAT **ATG** CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
 Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

T7 gene 10 leader Xpress™ Epitope BamH I Xho I Sac I
 GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CCG AGC TCG
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Pro Ser Ser
 EK recognition site EK cleavage site

Bgl II Pst I Pvu II Kpn I Nco I EcoR I BstB I Hind III
 AGA TCT GCA GCT GGT ACC ATG GAA TTC GAA GCT TGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC
 Arg Ser Ala Ala Gly Thr Met Glu Phe Glu Ala ***

pREP4-*sfp*



pTYB1

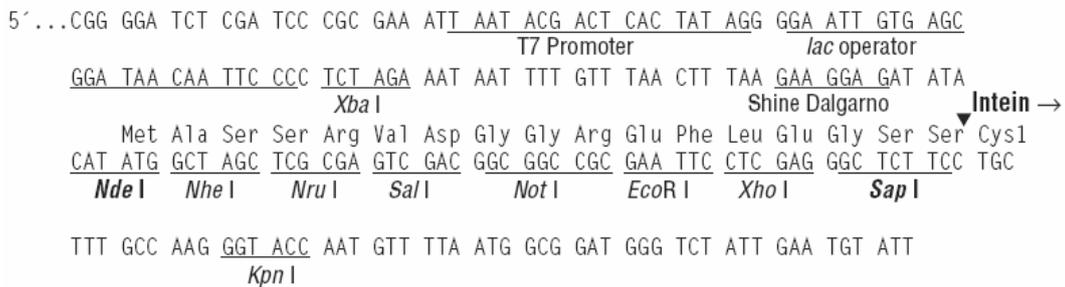
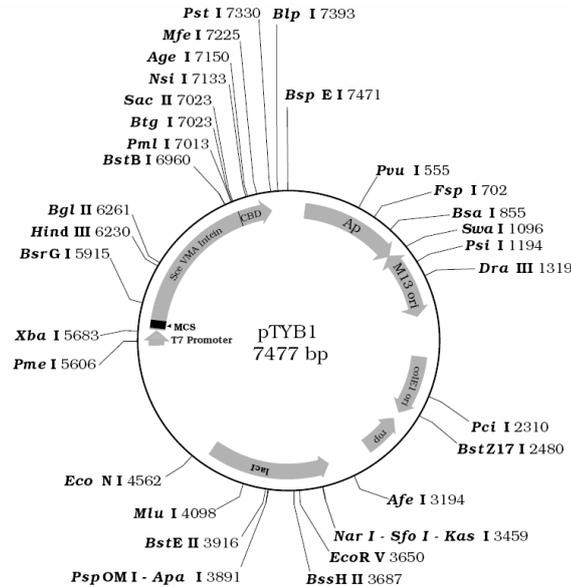


Abb. 6.1: MCS und Vektorkarten der Expressionsvektoren.

Der Vektor pHIS8-3 *sfp* ist ein Derivat des Plasmids pET-28a(+), das u. a. in der *NotI*-Seite ein *sfp*-Gen mit eigener ribosomaler Bindestelle (rbs) besitzt. Die Informationen zur Erstellung der Vektorkarte wurden der Literatur entnommen.^{101, 145, 146} Der Vektor pREP4-*sfp* wurde zur Coexpression des *sfp*-Gens verwendet. Eine Klonierung in den Vektor selbst erfolgte nicht.

6.12.2.6 Ligation und Transformation

Für die Ligation in den Expressionsvektor wurde zum einen das entsprechende geschnittene Fragment (6.12.2.1) verwendet und zum anderen der geschnittene, aus dem Gel eluierte und -falls erforderlich- dephosphorylierte Vektor (6.12.2.2 und 6.12.2.3) eingesetzt. Der Ansatz hatte dabei die folgende Zusammensetzung und wurde nach dem Mischen kurz zentrifugiert und dann bei 4 °C im Kühlschrank mindestens über Nacht inkubiert.

5-7 µl	Fragment, geschnitten, aufgereinigt
1 µl	Vektor, geschnitten, aufgereinigt, dephosphoryliert (wenn nötig)
1 µl	T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)
1 µl	T4-DNA-Ligase
ad 10 µl	H ₂ O _{dest}

Danach erfolgte die Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65 °C für 10 min, und es schloss sich die Transformation in *E. coli* XL1-Blue über Hitzeschock (6.5.1) bzw. über Elektroporation (6.5.2) an. Die Selektion erfolgte über die auf dem jeweiligen Vektor codierte Antibiotikaresistenz (Tab. 6.2). Für eine Isolierung des Konstrukts wurden Einzelkolonien gepickt und mit der jeweiligen Übernachtskultur eine Plasmidpräparation durchgeführt (6.9).

Im Folgenden konnte durch Restriktion (6.11) und PCR (6.6) die erfolgreiche Klonierung untersucht werden. Bei Nutzung der gleichen Schnittstellen an beiden Seiten des Gens wurde durch geeignete Wahl von Restriktionsenzymen oder Verwendung entsprechender Primer die korrekte Richtung des klonierten Stücks geprüft. Bei Nachweis durch PCR diente das entsprechende Plasmid als Templat und es wurden die auch schon für die Amplifizierung des Gens verwendeten Primer genutzt. Bei zusätzlicher Überprüfung der korrekten Klonierungsrichtung erfolgte die PCR mit dem T7-Primer (Tab. 6.7), der jeweils an den T7-Promoter des Expressionsvektors bindet (nicht möglich bei pMAL-c2X-Konstrukten) und dem entsprechenden Rückwärtsprimer des klonierten Gens (Tab. 6.5). Bei erfolgter Amplifizierung war folglich das Gen in korrekter Richtung im Plasmid, im Falle der falschen Richtung lieferte die PCR keine Bande. Die PCR wurde entsprechend den Bedingungen unter 6.6 durchgeführt und die jeweils den spezifischen Primern entsprechenden Annealingtemperaturen verwendet (Tab. 6.5).

Bei der hier durchgeführten Klonierung in pTYB1 mit den Schnittstellen *NdeI* und *SapI* geht bei der Ligation die *SapI*-Erkennungssequenz verloren. Deshalb wurde durch Wahl geeigneter Schnittstellen die erfolgte Klonierung bestätigt.

Im Fall der ACP (*pedN*, *pedI2*, *pedI3*, *pedGNAT-ACP*) erfolgte auch eine Verwendung des Vektors pHIS8-3 *svp*. Für den Vergleich der exprimierten ACP mit und ohne Coexpression des *svp*-Gens wurde dieses mit *NotI* aus dem pHIS8-3 *svp* - Konstrukt ausgeschnitten. Dabei wurde genauso vorgegangen wie zur Erzeugung des Vektors pHIS8-3 aus pHIS8-3 *svp* (6.12.2.2). Durch Verdau mit *NotI* (6.11) konnte das Ausschneiden des Gens kontrolliert werden. Dies lieferte dann folglich nur lineare Vektor-DNA (pHIS8-3 mit ACP-Gen). Als weiterer Nachweis diente die Kolonie-PCR (6.6), bei der Vorwärts- und Rückwärtsprimer des entsprechenden Gens eingesetzt wurden (Tab. 6.5).

Handelte es sich jeweils um einen korrekten Klon, wurde von der entsprechenden Kultursuspension eine Glycerinfrierkultur nach 6.3 angelegt (Tab. 6.9).

Tab. 6.9: Konstrukte der klonierten Biosynthesegene im Expressionsvektor.

Name des Konstrukts	Gen	Vektor	Restriktionsstellen		Gen-größe ^a
			Gen	Vektor	
pH66	<i>pedC</i>	pMAL-c2X	<i>BglII</i> / <i>BglII</i>	<i>BamHI</i> / <i>BamHI</i>	1002
pKZ20-1	<i>pedI3</i>	pTYB1	<i>NdeI</i> / <i>SapI</i> ^b	<i>NdeI</i> / <i>SapI</i> ^b	240
pKZ23-3	<i>pedB</i>	pTYB1	<i>NdeI</i> / <i>SapI</i> ^b	<i>NdeI</i> / <i>SapI</i> ^b	1392
pKZ28-3	<i>pedD</i>	pRSETB	<i>BamHI</i> / <i>BamHI</i>	<i>BglII</i> / <i>BglII</i>	1092
pKZ43-14	<i>pedD</i>	pMAL-c2X	<i>BamHI</i> / <i>BamHI</i>	<i>BamHI</i> / <i>BamHI</i>	1092
pKZ47-5	<i>pedN</i>	pMAL-c2X	<i>BglII</i> / <i>BglII</i>	<i>BamHI</i> / <i>BamHI</i>	240
pKZ51-14	<i>pedN</i>	pRSETB	<i>BglII</i> / <i>BglII</i>	<i>BglII</i> / <i>BglII</i>	240
pKZ59-4	<i>pedI3</i>	pMAL-c2X	<i>BglII</i> / <i>BglII</i>	<i>BamHI</i> / <i>BamHI</i>	555
pKZ61-2	<i>pedI3</i>	pRSETB	<i>BglII</i> / <i>BglII</i>	<i>BglII</i> / <i>BglII</i>	555

Fortsetzung Tab. 6.9

Name des Konstrukts	Gen	Vektor	Restriktionsstellen		Gen-größe ^a
			Gen	Vektor	
pKZ81-1	<i>pedI2</i>	pMAL-c2X	<i>Bgl</i> III / <i>Bgl</i> III	<i>Bam</i> HI / <i>Bam</i> HI	231
pKZ82-2	<i>pedI2</i>	pRSETB	<i>Bgl</i> III / <i>Bgl</i> III	<i>Bgl</i> III / <i>Bgl</i> III	231
pKZ96-1	<i>pedA</i>	pMAL-c2X	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	936
pKZ100-1	<i>pedE</i>	pMAL-c2X	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I	819
pKZ122-25	<i>pedI2</i>	pHIS8-3 <i>svp</i>	<i>Bgl</i> III / <i>Bgl</i> III	<i>Bam</i> HI / <i>Bam</i> HI	231
pKZ123-19	<i>pedI3</i>	pHIS8-3 <i>svp</i>	<i>Bgl</i> III / <i>Bgl</i> III	<i>Bam</i> HI / <i>Bam</i> HI	555
pKZ124-17	<i>pedN</i>	pHIS8-3 <i>svp</i>	<i>Bgl</i> III / <i>Bgl</i> III	<i>Bam</i> HI / <i>Bam</i> HI	240
pKZ153-2	<i>pedP</i>	pMAL-c2X	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I	1290
pKZ157-1	<i>onnD</i>	pMAL-c2X	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I	951
pKZ158-1	<i>pedO</i>	pMAL-c2X	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I	1005
pKZ159-15	<i>pedB</i>	pMAL-c2X	<i>Bgl</i> III / <i>Bgl</i> III	<i>Bam</i> HI / <i>Bam</i> HI	1392
pKZ160-2	<i>pedM</i>	pMAL-c2X	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I	1329
pKZ161-1	<i>pedN</i>	pHIS8-3	<i>Bgl</i> III / <i>Bgl</i> III	<i>Bam</i> HI / <i>Bam</i> HI	240
pKZ172-2	<i>pedF^c</i>	pMAL-c2X	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	1641
pKZ173-1	<i>pedH^c</i>	pMAL-c2X	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	1674
pKZ174-10	<i>pedH^c</i>	pHIS8-3	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	1674
pKZ175-44	<i>pedD</i>	pHIS8-3	<i>Bam</i> HI / <i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI / <i>Bam</i> HI	1092
pKZ176-1	<i>pedI3</i>	pHIS8-3	<i>Bgl</i> III / <i>Bgl</i> III	<i>Bam</i> HI / <i>Bam</i> HI	555
pKZ178-1	<i>pedD</i>	pHIS8-3	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	1092
pKZ179-1	<i>pedA</i>	pHIS8-3	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	936

Fortsetzung Tab. 6.9

Name des Konstrukts	Gen	Vektor	Restriktionsstellen		Gen-größe ^a
			Gen	Vektor	
pKZ180-1	<i>onnD</i> ^d	pHIS8-3	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	971
pKZ181-3	<i>pedE</i> ^e	pHIS8-3	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	831
pKZ182-1	<i>pedO</i> ^e	pHIS8-3	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	1024
pKZ183-1	<i>pedF</i> ^c	pHIS8-3	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III	1641
pKZ191-1	<i>pedC</i>	pHIS8-3	<i>Bg</i> III / <i>Sal</i> I	<i>Bam</i> HI / <i>Sal</i> I	1002
pKZ192-1	<i>pedB</i>	pHIS8-3	<i>Bg</i> III / <i>Bg</i> III	<i>Bam</i> HI / <i>Bam</i> HI	1392
pKZ193-1	<i>pedM</i> ^f	pHIS8-3	<i>Bam</i> HI / <i>Not</i> I	<i>Bam</i> HI / <i>Not</i> I	1329
pKZ194-1	<i>pedP</i> ^f	pHIS8-3	<i>Bam</i> HI / <i>Not</i> I	<i>Bam</i> HI / <i>Not</i> I	1290
pKZ200-3	<i>pedC</i>	pET52b(+)	<i>Xma</i> I / <i>Sac</i> I	<i>Xma</i> I / <i>Sac</i> I	999
pKZ201-8	<i>pedGNAT-ACP</i>	pHIS8-3 <i>svp</i>	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	1140
pKZ202-1	<i>pedGNAT-ACP</i>	pHIS8-3	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	1140

^a Die Größe in bp bezieht sich auf das Gen ohne die Restriktionsschnittstellen und ohne Startcodon, aber mit Stopcodon am Ende (entweder durch den entsprechenden Reverse Primer eingebracht oder im Gen vorhanden, wenn es einen eigenen ORF hat; außer bei pET52b(+)-Konstrukt).

^b nach der Klonierung in den Vektor pTYB1 ist die *Sap*I-Schnittstelle nicht mehr vorhanden

^c Im Fall von *pedF* und *pedH* wurde jeweils nur die A-Domäne der NRPS kloniert.

^d Als Ausgangskonstrukt diente pKZ157-1, wobei *Bam*HI durch den Vorwärtsprimer an das Gen angefügt wurde, und die in pMAL-c2X vorhandene *Hind*III-Schnittstelle genutzt wurde, da pHIS8-3 keine *Pst*I-Erkennungssequenz besitzt (*Pst*I-Schnittstelle wurde durch den Rückwärtsprimer eingeführt, kann aber für pHIS8-3 nicht genutzt werden).

^e Als Ausgangskonstrukte wurden die im TA-Vektor vorliegenden Gene mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten (pKZ91-1 bzw. pKZ156-1, s. Tab. 6.8), wobei die *Bam*HI-Stelle ursprünglich durch den Vorwärtsprimer eingebracht wurde und die auf dem TA-Vektor schon vorhandene *Eco*RI-Schnittstelle verwendet wurde, da sich in pHIS8-3 keine *Pst*I-Erkennungssequenz befindet (*Pst*I-Schnittstelle wurde durch den Rückwärtsprimer eingeführt, kann aber für pHIS8-3 nicht genutzt werden).

^f Als Ausgangskonstrukte wurden die im TA-Vektor vorliegenden Gene mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten (pKZ155-1 bzw. pKZ147-1, s. Tab. 6.8), wobei die *Bam*HI-Stelle ursprünglich durch den Vorwärtsprimer eingebracht wurde und die auf dem TA-Vektor schon vorhandene *Not*I-Schnittstelle verwendet wurde, da sich in pHIS8-3 keine *Pst*I-Erkennungssequenz befindet (*Pst*I-Schnittstelle wurde durch den Rückwärtsprimer eingeführt, kann aber für pHIS8-3 nicht genutzt werden).

6.13 Proteinexpression

Für eine Expression der interessierenden Biosynthesegene war es erforderlich, den entsprechenden Expressionsvektor mit kloniertem Gen in einen Expressionsstamm zu transformieren. Dabei wurde für die Expression des Intein-Fusionsproteins der Expressionsstamm *E. coli* ER2566 verwendet. Für His- und MBP-Fusionsproteine fand neben dem erwähnten Stamm auch *E. coli* BL21 DE3 und *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS Verwendung. Von den Plasmidpräparationen der jeweiligen Konstrukte wurden 1-1,5 µl für eine Elektroporation in den entsprechenden Stamm verwendet und auf LB-Agarplatte mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen (6.5.2).

Im Fall der ACP wurde zur Bildung des *holo*-Enzyms auch eine Coexpression einer PPTase durchgeführt, um eine direkte Reaktion mit der Phosphopantetheinkette an das *apo*-Enzym während der Proteinexpression zu ermöglichen. Hierzu wurden elektrokompente Zellen von *E. coli* ER2566 pREP4 *sfp* entsprechend 6.4.2 hergestellt, allerdings dem Medium noch Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) zugefügt, um das Verbleiben des Plasmids pREP4 mit dem Gen *sfp* im Stamm zu gewährleisten. Die weiteren Schritte erfolgten wie im genannten Abschnitt beschrieben. Im Folgenden wurde dann das entsprechende Konstrukt mittels Elektroporation (6.5.2) in die kompetenten Zellen transformiert und die Proteinexpression wie unten beschrieben durchgeführt, wobei zusätzlich zum erforderlichen Antibiotikum für das Konstrukt noch Kanamycin zugesetzt wurde.

Für eine Coexpression von Chaperon-Plasmiden (Tab. 6.2), die zur korrekten Faltung des Proteins dienen sollten, wurde entsprechend der Herstellerangaben vorgegangen. Das Chaperon-Plasmid musste dazu als erstes in den Expressionsstamm gebracht werden, was durch Elektroporation (6.5.2) erfolgte. Im Folgenden wurden diese Zellen elektrokompent nach 6.4.2 gemacht, wobei dem Medium zum Verbleiben des Plasmids Chloramphenicol in einer resultierenden Konzentration von 34 µg/ml (gelöst in Ethanol) zugegeben wurde. In die elektrokompenten Zellen konnten dann 1,5 µl des jeweiligen Konstrukts durch Elektroporation transformiert werden (6.5.2). Für die Proteinexpression musste dem Medium noch L-Arabinose (0,5 mg/ml) bzw. Tetracyclin (10 ng/ml) zur Induktion der Chaperonexpression zugegeben werden (s. Tab. 6.2). Alle anderen Schritte wurden wie unten beschrieben durchgeführt.

Für die Proteinherstellung wurden von der Platte mehrere Kolonien gepickt und eine 5 ml-Übernachtskultur mit LB-Medium mit Antibiotikum angelegt. Entsprechend der im Anschluss benötigten Menge mussten zum Teil auch mehrere Vorkulturen angesetzt werden. Diese diente(n) dann zum Inokulieren eines größeren Volumens, um eine Proteinexpression starten zu können. Die Volumina der Kulturen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen und betragen zwischen 100 ml und 1000 ml. Die Menge der zugegebenen Vorkultur hatte etwa ein Verhältnis von 1:40 gegenüber dem Expressionsvolumen. Für die MBP-Fusionsproteine fand in der Hauptkultur Rich Medium mit Glucose (6.2.2) Verwendung, für die Herstellung von His- und Intein-Fusionsproteinen LB-Medium (6.2.1). Die Kultur enthielt jeweils das entsprechende Antibiotikum.

Die angeimpften Kolben wurden bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd inkubiert bis eine optische Dichte von 0,4 bis 0,7 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht wurde. Die Messung der OD erfolgte wie unter 6.4.1 u. a. beschrieben. Bei Erreichen der korrekten Zelldichte wurde 1 ml der Zellsuspension entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13000 rpm für 1 min in einer Mikrozentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet konnte im Folgenden in 100 µl destilliertem Wasser resuspendiert und bei 4 °C als uninduzierte Kontrolle gelagert werden.

Die Proteinexpression wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge 1 M IPTG-Stammlösung gestartet. Die jeweilige Endkonzentration ist wiederum dem Ergebnisteil zu entnehmen. Die Inkubation der mit IPTG versetzten Kultur erfolgte bei verschiedenen Temperaturen, aber jeweils bei 200 rpm. Temperatur und Dauer der Expression sind im Ergebnisteil der Arbeit beschrieben.

Nach der Expression des Proteins wurde die Kultur in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min in einer Tischzentrifuge bei 3600 rpm bis 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen und das Pellet im entsprechenden Lyse- bzw. Säulen-Puffer (Tab. 6.10) resuspendiert werden. Dabei variierte die Menge zwischen 5 und 10 ml, je nach Volumen der Hauptkultur. Die Zellsuspension wurde mindestens übernacht bei -20°C eingefroren. Die dabei entstehenden Eiskristalle zerstören schon z. T. die Zellmembranen und erleichtern somit den folgenden Zellaufschluss. Hierzu wurden die resuspendierten Zellen als erstes auf Eis

getaut und dann mittels Ultraschall zerstört, so dass die löslichen Bestandteile aus dem Zellinneren nach außen gelangen. Hierzu fand ein Ultraschallhomogenisator mit Ultraschallfinger Verwendung, der bei etwa 80-90% der Maximalleistung betrieben wurde. Der mit Ethanol gereinigte Ultraschallfinger konnte direkt in die Suspension getaucht werden und die Beschallung erfolgte sechs- bis zehnmal für je 10 s mit einer jeweils 10-sekündigen Pause auf Eis. Im Anschluss wurde die Trennung der löslichen von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 11000 rpm und 4 °C in einem Festwinkelrotor über eine Dauer von 30 min erreicht. Der Überstand diente nach Überführen in ein neues Gefäß der folgenden Proteinaufreinigung. Etwa 50 µl davon wurden als Probe für ein Proteingel abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert. Für den Vergleich der exprimierten Proteine auf einem Proteingel (6.13.4) wurde das Zellpellet in 5-10 ml entsprechenden Lysepuffer (bei His-Fusionsprotein bzw. Chitinbinde-Fusionsproteinen) oder Säulenpuffer (bei MBP-Fusionsproteinen) resuspendiert und eine Probe bei 4 °C gelagert.

Tab. 6.10: Lösungen für das Aufarbeiten von Zellkulturen nach der Proteinexpression.

Puffer	Zusammensetzung
His-tag-Lysepuffer	50 mM Natriumdihydrogenphosphat
	300 mM Natriumchlorid
	10 mM Imidazol
	pH 8,0 mit Natriumhydroxid
His-tag-Lysepuffer II	25 mM Tris-HCl, pH 8,0
	500 mM Natriumchlorid
Intein-Lysepuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,0
	500 mM Natriumchlorid
MBP-Säulenpuffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,4
	200 mM Natriumchlorid
	1 mM EDTA, pH 8,0

6.13.1 MBP-Fusionsprotein

6.13.1.1 Reinigung des MBP-Fusionsproteins

Für eine Reinigung exprimierter MBP-Fusionsproteine diente der Überstand aus den aufgeschlossenen und zentrifugierten Zellen (6.13). Eine Poly-Prep-Säule wurde mit 0,4-1,5 ml Amyloseharz gefüllt und mit dem mindestens 8-fachen Volumen MBP-Säulenpuffer (Tab. 6.10) equilibriert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen konnte dann auf die Säule gegeben, der Durchfluss aufgefangen und eine Probe bei 4 °C gelagert werden. Die Säule wurde im Folgenden mehrmals mit je 2 ml Säulenpuffer gewaschen, die Fraktionen aufgefangen und Proben bei 4 °C gelagert. Die Elution des MBP-Fusionsproteins erfolgte durch das zwei- bis dreimalige Aufgeben von 1,5 ml Säulenpuffer mit 10 mM Maltose und die Elutionsfraktionen wurden bei 4 °C gelagert. Für eine Auswertung der erfolgten Expression wurden die Proben für eine SDS-PAGE genutzt und durch anschließende Färbung des Gels die Proteine sichtbar gemacht (6.13.4).

6.13.1.2 Spaltung des MBP-Fusionsproteins

Bei Verwendung des Vektors pMAL-c2X konnte das exprimierte Fusionsprotein durch Einsatz des Faktors Xa in das MBP und das interessierende Enzym gespalten werden. Die Protease schneidet nach der Aminosäuresequenz IEGR, die sich auf DNA-Ebene direkt am Anfang der MCS befindet. Hierzu wurde die das Fusionsprotein enthaltene Elutionsfraktion (6.13.1.1) verwendet und pro 100 µl Proteinlösung 1-2,5 µl Faktor Xa (Konz.: 1 mg/ml) zugegeben. Die Inkubation der Mischung erfolgte über mehrere Stunden bei Raumtemperatur bzw. bei 4 °C. Mengen- und Zeitangaben sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

6.13.2 His-Fusionsproteine

Für die Reinigung der exprimierten His-Fusionsproteine diente zum einen Ni-NTA-Agarose und zum anderen Ni-NTA-Säulchen (für geringere Mengen an His-Fusionsprotein). Bei beiden wurde der Überstand aus den aufgeschlossenen und abzentrifugierten Zellen der Expression eingesetzt (6.13). Bei Verwendung der Ni-NTA-Säulchen wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen und die Durchfluss- und Waschproben bei -20 °C gelagert. Zur Equilibrierung der Säulchen diente

Lysepuffer (Tab. 6.10), für die Waschschritte Waschpuffer (Tab. 6.11). Die Elution erfolgte durch das Aufgeben von Elutionspuffer (Tab. 6.11). Die beiden Elutionsfraktionen wurden bei -20 °C gelagert. Bei Nutzung von Ni-NTA-Agarose wurde von dieser 250 µl bis 1 ml mit dem löslichen Lysat vermischt und auf Eis auf einem Schüttler für 1 h inkubiert. Die Mischung konnte dann in eine Poly-Prep Säule überführt, der Durchfluss aufgefangen und eine Probe bei 4 °C gelagert werden. Anschließend wurde die Säule zweimal mit je 4 ml Waschpuffer (Tab. 6.11) gewaschen, die Fraktionen aufgefangen und Proben bei 4 °C aufbewahrt. Durch zweimalige Zugabe von je 2 ml Elutionspuffer (Tab. 6.11) erfolgte die Elution des His-Fusionsproteins und die beiden Elutionsfraktionen konnten anschließend bei 4 °C gelagert werden.

Tab. 6.11: Puffer für die Aufreinigung von His-Fusionsproteinen.

Puffer	Zusammensetzung
Waschpuffer	50 mM Natriumdihydrogenphosphat
	300 mM Natriumchlorid
	20 mM Imidazol
	pH 8,0 mit Natriumhydroxid
Elutionspuffer	50 mM Natriumdihydrogenphosphat
	300 mM Natriumchlorid
	250 mM Imidazol
	pH 8,0 mit Natriumhydroxid

Als weitere Aufreinigungsmöglichkeit wurde als Waschpuffer 2 ml des in Tab. 6.10 aufgelisteten His-tag-Lysepuffers II eingesetzt und erneut ein- bzw. zweimal mit 2 ml des His-tag-Lysepuffers II unter Zusatz von 30 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte durch den Lysepuffer II unter Zusatz von Imidazol, wobei dessen Endkonzentration von 50 mM auf 250 mM schrittweise erhöht wurde. Die so erhaltenen Elutionsfraktionen hatten jeweils ein Volumen von 0,5 bis 2 ml. Auch hier wurden die einzelnen Proben aufgefangen und bei 4 °C gelagert.

6.13.3 Intein-Fusionsprotein

Für eine Reinigung der Intein-Fusionsproteine und anschließender Spaltung an der Säule diente die lösliche Fraktion der Zellkultur nach dem Aufschließen und Zentrifugieren (6.13). Diese wurde auf eine mit 15 ml Intein-Lysepuffer (Tab. 6.10) equilibrierte Poly-Prep Säule mit 1,5 ml Chitinharz gegeben. Vom aufgefangenen Durchfluss wurde eine Probe abgenommen und bei -20 °C gelagert. Im Anschluss wurde zweimal mit je 15 ml Intein-Säulenpuffer (Tab. 6.12) gewaschen und jeweils eine Probe der Waschfraktionen eingefroren. Zum Spalten des Chitin-Bindeproteins vom interessierenden Enzym erfolgte die Aufgabe von 4,5 ml Spaltpuffer mit DTT (Tab. 6.12) auf die Säule. Dieser Durchfluss wurde ebenfalls aufgefangen und eine Probe eingefroren. Es schloss sich eine Inkubation der Säule bei 4 °C im Kühlschrank über Nacht an, wobei vom aufgegebenen Puffer etwas über dem Säulenmaterial verbleiben musste. Die Elution konnte durch das Aufgeben von 5 ml Spaltpuffer ohne DTT (Tab. 6.12) erreicht werden und fünf 1 ml-Fractionen konnten gesammelt und gelagert werden.

Tab. 6.12: Puffer für die Aufreinigung und Spaltung von Intein-Fusionsproteinen.

Puffer	Zusammensetzung
Säulenpuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,0
	500 mM NaCl
Spaltpuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,0
	500 mM NaCl
	50 mM DTT (bzw. ohne DTT)

6.13.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der hergestellten Proteine wurden die einzelnen Proben aus 6.13 bis 6.13.3 auf ein SDS-Gel aufgetragen. Hierzu fand in den meisten Fällen das vertikale Gelelektrophoresesystem Multigel Verwendung. Nach dem Säubern der Glasplatten wurden diese mit Spacer versehen und mit Klammern befestigt, um das Trenngel einfüllen zu können. Zum Erreichen einer glatten Grenzschicht diente eine Überschichtung mit Isopropanol. Je nach Größe des zu erwartenden Proteins wurde ein 12 bzw. 20% Trenngel nach Literaturvorschrift¹⁴⁴ hergestellt. Nach dem vollständigen Polymerisieren des Gels wurde das Isopropanol entfernt, kurz mit

etwas destilliertem Wasser gewaschen, das Sammelgel aufgegeben und der Kamm eingesetzt. Die Zusammensetzung des 5%-igen Sammelgels entsprach wiederum den Vorgaben in der Literatur.¹⁴⁴ Die Glasplatten mit Proteingel wurden nach dem Polymerisieren des Sammelgels im Folgenden an der Elektrophoresekammer befestigt, der SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) eingefüllt und der Kamm entfernt. Nun konnten die zu untersuchenden Proben der Proteinaufreinigung aufgetragen werden. Zum Denaturieren der Proteine und zum Erreichen der Möglichkeit, Proteine entsprechend ihrer Masse aufzutrennen, mussten 20-30 µl der einzelnen Proben mit je 20-30 µl 2x SDS-Ladepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 200 mM DTT; 4% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 20% (v/v) Glycerin) vermischt und bei 99 °C für 5 min gekocht werden. Von diesen vorbereiteten Proben wurden jeweils 10 µl von der uninduzierten Probe, dem Überstand nach dem Aufschluss und Zentrifugieren (6.13), dem Durchfluss und den Waschfraktionen (6.13.1 bis 6.13.3) in die Taschen des Proteingels aufgetragen. Bei den Elutionsfraktionen (6.13.1 bis 6.13.3) handelte es sich um je 15 µl und beim resuspendierten Pellet nach Aufschluss und Zentrifugieren (6.13) um 6-7 µl. In jedem Fall wurden aber zu der Probe die gleiche Menge 2x SDS-Ladepuffer gegeben, und wie oben beschrieben gekocht und die behandelten Proben in die Geltaschen gegeben. Bei Verwendung anderer Proben als die der Proteinaufreinigung sind die aufgetragenen Mengen im Ergebnisteil angegeben. Als Größenmarker dienten 3,5 µl Proteinmarker Roti-Mark Standard bzw. 7 µl Broad-Range-Marker, der entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet wurde. Anschließend wurde eine Spannung von 80-100 V angelegt bis sich die Proteine am Ende des Sammelgels befanden, die Separation erfolgte dann im Trenngel bei einer Spannung von 130-150 V. Nach der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und abschließend gefärbt (6.13.4.1 bzw. 6.13.4.2).

Für besonders kleine Proteine fand auch das vertikale Elektrophoresesystem ProteanII xi cell Verwendung. Die gesäuberten Glasplatten wurden entsprechend der Herstellerangaben zusammengebaut und etwa 50 ml eines 20%igen Trenngels nach Literaturvorgaben¹⁴⁴ eingefüllt. Alle weiteren Schritte entsprechen den oben aufgeführten. Nach Beladen der Taschen (doppelte bis dreifache Menge gegenüber der in den Taschen des Multigels aufgegebenen Proben) wurde die Wasserkühlung angestellt und das Gel lief bei einer angelegten Spannung von 100 V für etwa 16 h.

Als Marker dienten die oben erwähnten Mischungen aus Standardproteinen, wobei im Fall des Roti-Mark Standard 20 μl und vom Broad-Range-Marker 40 μl aufgetragen wurden.

6.13.4.1 Coomassie-Färbung des Proteingels

Nach der Elektrophorese des SDS-Proteingels und dem Herauslösen des Gels aus den Platten (6.13.4) wurde es mit Coomassiefärbelösung (10% (v/v) Eisessig, 30% (v/v) Methanol, 0,25% (w/v) Brilliant-Blau R250) bedeckt und mindestens 10 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gefärbt. Die Färbelösung konnte mehrmals wieder verwendet werden und wurde daher zurück in die Flasche gegeben. Nach kurzem Spülen des Gels mit destilliertem Wasser wurde Entfärbelösung (10% (v/v) Eisessig, 30% (v/v) Methanol) verwendet und das Gel auf einem Schüttler entfärbt, bis sich die Banden gut vom Hintergrund abhoben. Das Gel konnte dann zum Quellen einige Stunden in destilliertes Wasser gelegt und abschließend gescannt werden. Teilweise schloss sich auch die Trocknung bei Raumtemperatur zwischen zwei Cellophan-Folien in einem Rahmen an. Für große Gele, für die das ProteanII xi cell-Elektrophoresesystem genutzt wurde, war vor dem Trocknen des Gels zwischen Cellophanfolien noch ein 30-minütiges Schwenken in Trocknerlösung (10% (v/v) Glycerin, 20% (v/v) Ethanol) gemäß Herstellerangaben notwendig, da bei dieser Größe das Gel leicht brechen kann.

6.13.4.2 Silberfärbung des Proteingels

Für eine sensitivere Färbung der Proteinbanden fand auch die Silberfärbung der Gele Verwendung (Tab. 6.13). Hierzu wurde das Gel mindestens 30 min in Fixierlösung schüttelnd inkubiert und im Anschluss die Lösung gegen Sensitivlösung getauscht, in der das Gel für 30 min geschüttelt wurde. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser für je 5 min wurde das Gel in Färbelösung gegeben und darin für 20 min geschwenkt. Vor der Verwendung der Entwickler-Lösung (Tab. 6.13) wurde noch zweimal eine Minute mit destilliertem Wasser gewaschen. Als die Banden beim Entwickeln gut erkennbar waren, wurde die Flüssigkeit gegen Stop-Lösung (Tab. 6.13) getauscht, in der das Gel für 10 min belassen wurde. Abschließend wurde erneut mit destilliertem Wasser gewaschen und das Proteingel in frisches destilliertes Wasser gegeben. Das Gel konnte dann eingescannt und zur

Haltbarmachung in einem Rahmen zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet werden.

Tab. 6.13: Lösungen für die Silberfärbung von Proteingelen.

Lösung	Zusammensetzung
Fixierlösung	40% (v/v) Ethanol
	10% (v/v) Eisessig
Sensitivlösung	30% (v/v) Ethanol
	0,49% (v/v) Glutardialdehyd (25%)
	0,2% (w/v) Natriumthiosulfat
	6,8% (w/v) Natriumacetat
Färbelösung	0,25% (w/v) Silbernitrat
	0,04% (v/v) Formaldehyd (37%)
Entwicklerlösung	2,5% (w/v) Natriumcarbonat
	0,02% (v/v) Formaldehyd (37%)
Stopplösung	1,46% (w/v) EDTA-Na ₂

6.14 Bestimmung der Proteinmassen

Für einen Vergleich der über SDS-PAGE ermittelten Größen der aufgetragenen Proteine wurde im Vorfeld eine Translation der theoretischen Nukleotidsequenz in die Aminosäureabfolge mit Hilfe des Programms EditSeq (DNAS_tar) durchgeführt. Bei den MBP-Fusionsproteinen erfolgte die Translation beginnend beim Male-Start-Signal bis zum Stopcodon des klonierten Gens, bei den His-Fusionsproteinen startete die Übersetzung in die Aminosäuresequenz beim Startcodon vor der Polyhistidin-Region bis zur Stop-Sequenz des Inserts.

Die so bestimmte Anzahl der jeweiligen Aminosäuren diente der Ermittlung der exakten Masse unter Berücksichtigung der Peptidbindungen. Dafür wurde die von Dr. Marianne Engeser erstellte Excel-Kalkulation verwendet. Die exakte Masse entspricht der monoisotopischen Masse des Moleküls.

Tab. 6.14: Theoretische Massen der aus pMAL-c2X exprimierten Proteine.

Insert	Plasmid- name	Größe Fusionsprotein (g/mol)	Größe nach Spaltung mit Faktor Xa	
			MalE (g/mol)	Enzym (g/mol)
<i>pedA</i>	pKZ96-1	78525,35	42480,96	36061,39
		78477,28393	42455,54739	36039,74711
<i>pedB</i>	pKZ159-15	94568,66	42480,96	52104,70
		94510,29227	42455,54739	52072,75545
<i>pedC</i>	pH66	81002,23	42480,96	38538,27
		80951,96278	42455,54739	38514,42596
<i>pedD</i>	pKZ43-14	83317,34	42480,96	40853,38
		83266,19555	42455,54739	40828,65873
<i>pedE</i>	pKZ100-1	73743,66	42480,96	31279,69
		73698,20187	42455,54739	31260,66505
<i>pedF</i> (A- Domäne)	pKZ172-2	104034,53	42480,96	61570,56
		103969,73662	42455,54739	61532,19979
<i>pedH</i> (A- Domäne)*	pKZ173-1	103734,92	-	-
		103670,71320		
<i>pedI2</i>	pKZ81-1	51796,74	42480,96	9332,78
		51765,47285	42455,54739	9327,93602
<i>pedI3</i>	pKZ59-4	63294,67	42480,96	20830,71
		63256,31107	42455,54739	20818,77424
<i>pedM</i>	pKZ160-2	90420,72	42480,96	47956,75
		90364,61211	42455,54739	47927,07528
<i>pedN</i>	pKZ47-5	51712,62	42480,96	9248,66
		51681,43513	42455,54739	9243,89830
<i>pedO</i>	pKZ158-1	80721,08	42480,96	38257,11
		80671,46146	42455,54739	38233,92463
<i>pedP</i>	pKZ153-2	91429,00	42480,96	48965,03
		91371,71039	42455,54739	48934,17357
<i>onnD</i>	pKZ157-1	79618,10	42480,96	37154,14
		79568,93685	42455,54739	37131,40003

In der oberen Zeile der Masseangaben ist jeweils die mit Hilfe des Programms EditSeq ermittelte Proteinmasse, die untere Zeile gibt entsprechend die exakte Masse an (s. Text).

*Eine Spaltung von MalE-PedH (A-Domäne) mit Faktor Xa erfolgte nicht, da das Genprodukt von *pedH* (A-Domäne) ebenfalls eine Xa-Erkennungssequenz enthält.

Für eine Expression von His₈-Fusionsproteinen fand auch der Vektor pHIS8-3 Verwendung. Handelte es sich bei den interessierenden Proteinen um ACP, wurde dieser Vektor genutzt, um das *apo*-ACP zu exprimieren, während für die Expression des *holo*-ACP pHIS8-3 *svp* genutzt wurde. Bei letztem erfolgte unter IPTG-Induktion eine Coexpression der PPTase, die durch das Gen *svp* codiert wird. Diese setzt das inaktive *apo*-ACP zum aktiven *holo*-ACP um (Abb. 3.4). Daher wurde in Tab. 6.15 auch die Masse dieser aktivierten ACP mit dem Cofaktor aufgelistet.

Tab. 6.15: Theoretische Massen der aus pHIS8-3 / pHIS8-3 *svp* exprimierten Proteine.

Konstrukt	Plasmidname	Größe des Proteins	
		mit Cofaktor (g/mol)*	ohne Cofaktor (g/mol)
<i>pedA</i> / pHIS8-3	pKZ179-1	-	38279,80
			38256,77440
<i>pedB</i> / pHIS8-3	pKZ192-1	-	53903,69
			53869,61824
<i>pedC</i> / pHIS8-3	pKZ191-1	-	40336,26
			40311,28875
<i>pedD</i> / pHIS8-3	pKZ175-44	-	42651,37
			42625,52152
<i>pedD</i> / pHIS8-3	pKZ178-1	-	42927,66
			42901,63253
<i>pedE</i> / pHIS8-3	pKZ181-3	-	33077,69
			33057,52784
<i>pedF</i> (A-Domäne) / pHIS8-3	pKZ183-1	-	63788,98
			63749,22709
<i>pedGNAT-ACP</i> / pHIS8-3	pKZ202-1	-	45675,87
			45647,55971
<i>pedGNAT-ACP</i> / pHIS8-3 <i>svp</i>	pKZ201-8	46015,20	-
		45986,63768	-
<i>pedH</i> (A-Domäne) / pHIS8-3	pKZ174-10	-	63489,37
			63450,20367

Fortsetzung Tab. 6.15

Konstrukt	Plasmidname	Größe des Proteins	Größe des Proteins
		mit Cofaktor (g/mol)*	ohne Cofaktor (g/mol)
<i>pedI2</i> / pHIS8-3 <i>svp</i>	pKZ122-25	11470,10	-
		11463,87697	-
<i>pedI3</i> / pHIS8-3	pKZ176-1	-	22628,70
		-	22615,63704
<i>pedI3</i> / pHIS8-3 <i>svp</i>	pKZ123-19	23307,36	-
		23293,79298	-
<i>pedM</i> / pHIS8-3	pKZ193-1	-	49744,71
		-	49713,91734
<i>pedN</i> / pHIS8-3	pKZ161-1	-	11046,65
		-	11040,76110
<i>pedN</i> / pHIS8-3 <i>svp</i>	pKZ124-17	11385,98	-
		11379,83907	-
<i>pedO</i> / pHIS8-3	pKZ182-1	-	40055,10
		-	40030,78743
<i>pedP</i> / pHIS8-3	pKZ194-1	-	50793,05
		-	50761,04693
<i>onnD</i> / pHIS8-3	pKZ180-1	-	38952,13
		-	38928,26283

In der oberen Zeile der Masseangaben ist jeweils die mit Hilfe des Programms EditSeq ermittelte Proteinmasse, die untere Zeile gibt entsprechend die exakte Masse an (s. Text).

* Die Einbeziehung des Cofaktors erfolgte nur bei den ACP (*apo*-ACP + Cofaktor = *holo*-ACP). Bei der Bestimmung der Masse des *holo*-ACP wurde zur exakten Masse des Proteins die exakte Masse des Cofaktors hinzugerechnet unter Berücksichtigung der bestehenden Verknüpfung des Proteins mit dem Phosphopantetheinarm (ergibt Massendifferenz von 339,077973 g/mol (exakt) bzw. 339,33 g/mol).

Für die Expression von His₆-Fusionsproteinen aus pRSETB bzw. des Fusionsproteins aus pET52b(+) wurden ebenfalls die Massen der Proteine mit EditSeq bestimmt und anhand der Aminosäureabfolge die exakte Masse berechnet (Tab. 6.16). Da bei den ACP keine Expression des His₆-Fusionsproteins festgestellt werden konnte, wurde auch keine Coexpression der PPTase durchgeführt. Daher sind in Tab. 6.16 auch nur die Proteinmassen der *apo*-ACP aufgelistet.

Tab. 6.16: Theoretische Massen der aus pRSETB und pET52b(+) exprimierten Proteine.

Insert	Vektor	Plasmidname	Größe des Proteins (g/mol)
<i>pedC</i>	pET52b(+)	pKZ200-3	42768,98
			42742,48484
<i>pedD</i>	pRSETB	pKZ28-3	44390,18
			44363,12308
<i>pedI2</i>	pRSETB	pKZ82-2	14020,85
			14012,90809
<i>pedI3</i>	pRSETB	pKZ61-2	24367,51
			24353,23860
<i>pedN</i>	pRSETB	pKZ51-14	12785,46
			12778,36266

Der oberen Zeile ist jeweils die mit EditSeq berechnete Proteinmasse zu entnehmen, während in der unteren Zeile die exakte Masse steht.

Bei den Intein-Fusionsproteinen konnten bei den durchgeführten Klonierungen in pTYB1 lediglich im Fall von *pedI3* und *pedB* Positivklone erhalten werden. Daher wurde auch nur für diese beiden Fälle eine Ermittlung der Proteinmassen durchgeführt (Tab. 6.17). Da die Spaltung des Fusionsproteins direkt an der Säule erfolgt, war auch lediglich die Berechnung der Masse des interessierenden Enzyms erforderlich. Dabei spiegelt diese exakt die Größe des Genprodukts wider ohne zusätzliche Aminosäuren vom Vektor. Dies wurde durch die bereits beschriebene Wahl der durch PCR eingebrachten Restriktionsschnittstellen erreicht.

Tab. 6.17: Theoretische Massen der nach der Spaltung erhaltenen Proteine aus pTYB1.

Insert	Plasmidname	Größe des Proteins nach Spaltung mit DTT an der Säule (g/mol)
<i>pedB</i>	pKZ23-3	51615,23
		51583,51534
<i>pedI3</i>	pKZ20-1	20341,25
		20329,53414

Die obere Zeile gibt die mit dem Programm EditSeq berechnete Proteinmasse wieder während die untere Zahl der exakten Masse entspricht.

6.14.1 MALDI-TOF-MS der Proteine

Da die Größenbestimmung der exprimierten Proteine aus SDS-PA-Gelen durch Vergleich mit den Größen der Markerproteine nur in Annäherung erfolgen kann, wurde als exakte Methode u. a. die MALDI-TOF-Massenspektroskopie genutzt. Mit dieser Methode lassen sich Proteine mit relativ hoher Auflösung messen trotz sehr geringer notwendiger Substanzmengen. Vor der eigentlichen Messung musste eine Entsalzung der Proteinlösungen durchgeführt werden. Dies geschah mit verschiedenen Methoden.

Für Messungen am MALDI-TOF-MS (MPI Jena) erfolgte die Entsalzung nicht selbst. Zur Analyse wurden dort die Elutionsfraktionen gegen Wasser dialysiert und anschließend in der Speedvac abgedampft. Die eingedampfte Probe wurde dann in Wasser mit 0,1% TFA aufgelöst, 1:1 mit Sinapinsäurematrix (9 mg/ml) versetzt und am MALDI-TOF-MS gemessen (nähere Spezifizierung des Gerätes unter 6.19).

Für die Messungen am MALDI-TOF-TOF-MS (Uni Bonn) wurde die Entsalzung durch Verwendung der Zentrifugalfiltereinheiten Vivaspin 500 und der Pipettenspitzen ZipTip durchgeführt.

Die Vivaspin 500-Zentrifugalfäße enthalten eine vertikale Membran mit unterschiedlicher Porengröße und ermöglichen somit durch Zentrifugation die Konzentrierung und Entsalzung der Probe. Der dabei verwendete MWCO war maximal halb so groß wie die Proteingröße. 100 µl der jeweiligen Elutionsfraktion (aus 6.13) wurden in die Filtereinheit überführt, bei 15000xg für 15 min in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurde zweimal mit 100 µl MilliQ Wasser und gleichen Zentrifugationsbedingungen gewaschen und jeweils der Durchfluss verworfen. Zum verbliebenen Rest von etwa 25 µl konnten dann 25 µl MilliQ Wasser zugegeben, die Proteinlösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mittels MALDI-TOF-TOF-MS gemessen werden.

Die Pipettenspitzen ZipTip enthalten an ihrem unteren Ende 0,6 µl kieselgel-basierendes Chromatographiematerial, an dem das Protein bindet und dann wieder eluiert werden kann. Es fand ZipTip C4 (für Proteine von ca. 30 bis 100 kDa) und ZipTip C18 (bis 50 kDa) Verwendung, wobei aber beide Arten grundsätzlich für alle

hier betrachteten Proteingrößen einsetzbar sind, im angegebenen Größenbereich nur am besten geeignet sind. Im Fall von C4 konnte durch Zugabe von 5x Probenvorbereitungspuffer die anschließende Proteinbindung durch Vorliegen eines chaotropischen Salzes und TFA erhöht werden (Tab. 6.18). Die Lösung wurde einige Minuten vor der Weiterbehandlung zu 20-30 µl der das interessierende Protein enthaltenden Elutionsfraktion gegeben und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Bei Nutzung von C18 wurde durch Zugabe von TFA eine Endkonzentration zwischen 0,1 und 1% in 20 µl der zu untersuchenden Proteinlösung eingestellt. Hierfür diente eine Lösung mit 2,5% (v/v) TFA. Für beide Säulenmaterialien wurde die Pipettenspitze angefeuchtet, indem mit ihr jeweils zweimal Anfeuchtlösung (Tab. 6.18) bis zum Maximum aufgezogen und anschließend verworfen wurde. Die Pipettenspitze konnte durch zweimaliges Aufziehen und anschließendem Verwerfen von je 10 µl Equilibrierlösung (Tab. 6.18) equilibriert werden. Durch Auf- und Abpipettieren in der vorbereiteten Proteinlösung wurde dann die Bindung des Proteins am Säulenmaterial erreicht. Dies erfolgte sieben- bis zehnmal, wobei jedes Mal bis zum Maximum aufgezogen und vollständig wieder herausgedrückt wurde. Danach erfolgte ein mindestens zweimaliges Waschen, wobei auch hier die Waschlösung (Tab. 6.18) aufgezogen und danach verworfen wurde. In einem Reaktionsgefäß wurden 6-10 µl Elutionslösung (Tab. 6.18) vorgelegt und durch mindestens dreimaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren das Protein wieder vom Säulenmaterial gelöst. Dabei musste darauf geachtet werden, dass keine Luft in die Pipettenspitze eingebracht wird. Die Proteinlösung konnte dann zur MALDI-TOF-TOF-MS gegeben werden.

Tab. 6.18: Lösungen für die Entsalzung mit ZipTip.

Lösung	Zusammensetzung
Probenvorbereitungslösung (5x)	8M Guanidin in MilliQ H ₂ O mit 2,5% (v/v) TFA
Lösung zum Anfeuchten	50% Acetonitril in MilliQ H ₂ O
Equilibrierlösung	0,1% TFA in MilliQ H ₂ O
Waschlösung	0,1% TFA in MilliQ H ₂ O
Elutionslösung	50% Acetonitril in 0,1% TFA

In weiteren Experimenten wurde die originale Elutionsfraktion ohne vorherige Entsalzung direkt auf die Matrix aufgegeben und mit TFA die Salze heruntergewaschen. Für die eigentliche MALDI-TOF-TOF-Messung wurde das unter 6.19 näher beschriebene Gerät genutzt. Bei der verwendeten Matrix handelt es sich um HCCA.

6.14.2 HPLC-Entsalzung und ESI-FT-ICR-MS der Proteine

Vor der Nutzung der ESI-FT-ICR-MS war eine Reinigung und Entsalzung der Proteine notwendig, was u. a. durch Verwendung der HPLC erreicht werden sollte. Für die Reinigung der Proteine wurden von der jeweiligen Elutionsfraktion aus 6.13 100 µl in ein entsprechendes HPLC-Gefäß überführt und auf einer C18-Säule mittels HPLC vermessen (Säule und Gerät sind unter 6.19 näher beschrieben). Der HPLC-Lauf erfolgte unter Verwendung eines Gradienten, wobei als mobile Phase Wasser und Acetonitril eingesetzt wurden, die jeweils 0,1% TFA enthielten. Vor und nach dem Lauf diente ein Gemisch aus 90% Wasser mit 0,1% TFA und 10% Acetonitril mit 0,1% TFA zum Spülen der Säule über eine Dauer von mindestens 30 min. Folgender Gradient mit den Laufmitteln Acetonitril und Wasser (jeweils mit 0,1% TFA) wurde verwendet: 10:90 über eine Dauer von 10 min, 30:70 innerhalb von 2,5 min, 60:40 innerhalb von 12,5 min, 90:10 innerhalb von 5 min, 90:10 über eine Dauer von 10 min, 10:90 innerhalb von 5 min, 10:90 über einen Zeitraum von 5 min.

Die HPLC-Fractionen konnten automatisch über einen Fraktionssammler aufgefangen werden, bei dem eine Verzögerungszeit von 45 s gegenüber der HPLC-Detektion eingestellt wurde (Zeit, die mobile Phase vom Detektor bis zum Fraktionssammler benötigt). Dadurch ist ein direkter Vergleich der einzelnen Fraktionen mit dem erhaltenen Spektrum möglich. Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarray, für die Auswertung wurde nur die Wellenlänge von 254 nm verwendet. Die Fraktionen wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min gesammelt und nach dem Lauf in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. In diesen wurden sie in der Speedvac bei 45-60 °C bis zu einem Volumen von etwa 50 µl eingengt. Bei Verwendung von mehreren Läufen wurden die Fraktionen vereinigt und dann schrittweise in das Reaktionsgefäß überführt und jeweils das Laufmittel abgedampft. Von der verbleibenden Flüssigkeit dienten 5 µl für eine Protein-Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz (6.15). Des Weiteren wurde von ausgewählten Fraktionen eine

SDS-PAGE durchgeführt. Hierfür fanden 15 µl der Probe Verwendung, die mit 15 µl 2x SDS-Ladepuffer (s. 6.13.4) versetzt und bei 99 °C für 5 min gekocht wurden. Im Anschluss konnten jeweils 15 µl der Mischungen in die Taschen des Proteingels gegeben und entsprechend 6.13.4 die SDS-PAGE und anschließende Färbung durchgeführt werden.

Für die Messung mittels ESI-FT-ICR-MS wurde die eingengte Fraktion mit dem gewünschten Protein auf einen Wert von ca. 100 µM (berechnet aus der theoretisch erwartenden Proteinmasse) mit Acetonitril verdünnt. Danach erfolgte eine 1:2-Verdünnung mit einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril/Wasser (3:1) und TFA wurde in einer Endkonzentration von 0,1% zugegeben. Die Messung wurde im Positivmodus durchgeführt, das verwendete Gerät ist unter 6.19 näher beschrieben.

6.14.3 Vivaspin-Entsalzung und ESI-FT-ICR-MS der Proteine

Für eine Bestimmung der Proteinmasse ohne Verwendung der HPLC wurden zum Entsalzen der entsprechenden Elutionsfraktion die schon unter 6.14.1 verwendeten Vivaspin 500-Zentrifugationseinheiten eingesetzt. Von der Elutionsfraktion (aus 6.13) wurde die Proteinkonzentration nach 6.15 bestimmt und je nach Konzentration 100-200 µl in die Zentrifugaleinheit überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 15000xg in einer Mikrozentrifuge konnte der Durchfluss verworfen werden. Die Probe wurde anschließend mindestens dreimal mit je 100-200 µl MilliQ-Wasser durch erneutes Zentrifugieren und Verwerfen des Durchflusses entsalzt und aufkonzentriert. Die so behandelte Probe wurde 1:1 mit Acetonitril mit 0,2% TFA bzw. 0,2% Ameisensäure oder mit Methanol mit 0,2% TFA bzw. 0,2% Ameisensäure versetzt und anschließend mittels ESI-FT-ICR-MS im Positivmodus gemessen (das verwendete Gerät ist unter 6.19 näher beschrieben).

6.15 Bestimmung der Proteinkonzentration

Da es sich bei den vorliegenden Protein-Proben um geringe Mengen handelt, fand nicht die sonst übliche Bradford-Methode Verwendung, sondern die Proteinbestimmung mit Amidoschwarz, bei der nur kleinste Mengen der zu untersuchenden Probe eingesetzt werden müssen.

Hierzu wurden auf Celluloseacetat-Folie mit Bleistift Felder von 1,25x1 cm aufgezeichnet und mit Klammern in einer Schale befestigt. Auf die Felder konnten im Folgenden jeweils 5 µl der Kalibrierlösung bzw. Probe aufgetragen und kurz mit einem Laborgebläse getrocknet werden. Bei den Kalibrierlösungen handelte es sich um BSA-Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen (0 bis 4000 µg/ml), die im Säulenpuffer mit Maltose (für MBP-Fusionsproteine) oder im His-tag-Elutionspuffer bzw. Lysepuffer II mit Imidazol (für His-Fusionsproteine) vorlagen. Nach dem Trocknen der Proben wurden die Klammern entfernt und die Folie in der Schale mit Färbelösung (Tab. 6.19) bedeckt und 10 min auf einem Schüttler geschwenkt. Die Färbelösung konnte dabei mehrmals wieder verwendet werden. Das Celluloseacetat wurde kurz mit destilliertem Wasser gespült und dann dreimal je 5 min mit Entfärbelösung (Tab. 6.19) auf dem Schüttler entfärbt. Anschließend folgte die Trocknung der Folie mit einem Laborgebläse bzw. an der Luft. Die einzelnen Felder wurden im Folgenden ausgeschnitten, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und jeweils 500 µl Auflöselösung (Tab. 6.19) zugegeben. Die Inkubation der Ansätze erfolgte schüttelnd in einem Thermomixer bei 50 °C und 1000 rpm für 30 min. Abschließend wurde die Extinktion der Lösung bei 620 nm in 1,6 ml Halb-Mikroküvetten in einem Photometer gemessen. Für die Kalibriergerade dienten jeweils die BSA-Konzentrationen im entsprechenden Puffer, aufgetragen gegen die optische Dichte. Durch Bestimmung der Regressionsgeraden ist dann die Ermittlung der Proteinkonzentration in den gemessenen Proben möglich.

Tab. 6.19: Lösungen für die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Amidoschwarz.

Lösung	Bestandteil	Menge
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)

6.16 ACP-AT-Assay und Analytik des Assays

Um die Substratspezifität der AT untersuchen zu können, sollten die im *ped*-Cluster vorhandenen beiden AT (PedC und PedD) in einer Reaktion mit verschiedenen ACP (PedI3, PedN) eingesetzt werden. Dafür dienten die gereinigten Fusionsproteine aus 6.13, wobei im Fall der MBP-Fusionsproteine u. a. auch eine Spaltung mit Faktor Xa (6.13.1.2) durchgeführt und die Proteinmischung eingesetzt wurde. Für den Assay kamen verschiedene Arbeitsvorschriften zum Einsatz (6.16.1, 6.16.2), die Analyse dieser erfolgte unter Verwendung verschiedener massenanalytischer Methoden (6.16.3). Eine andere Möglichkeit war der Einsatz von radioaktiv markiertem Substrat und der anschließenden Analyse auf dem Proteingel (6.16.4). Die theoretische Abfolge der Reaktion ist in Abb. 3.5 a dargestellt. Bei allen durchgeführten Untersuchungen handelt es sich um *in vitro*-Assays, bei denen die exprimierten, aufgereinigten Proteine Verwendung fanden.

6.16.1 ACP-AT-Assay I

In Anlehnung an die Literatur¹²¹ wurde der Assay mit dem folgenden 2x Puffer durchgeführt:

400 mM Tris-HCl, pH 7,4
50 mM MgCl₂ x 6 H₂O
10 mM DTT

Für die Reaktion wurden zu 37,5 µl des 2x Puffer 10 µM ACP gegeben und auf 75 µl H₂O_{dest} aufgefüllt. Durch Zugabe von 15 µl einer Lösung aus 133 µM Malonyl-CoA **8** und 2 µM AT wurde die Reaktion gestartet. Im Fall der Negativkontrolle enthielt die zugegebene wässrige Lösung nur Malonyl-CoA **8** in derselben Konzentration. Bei den eingesetzten Proteinen handelte es sich um die jeweilige Elutionsfraktion aus der Proteinaufreinigung (6.13), wobei die Enzymkonzentration mittels Amidoschwarz bestimmt wurde (6.15). Handelte es sich um ein MBP-Fusionsprotein wurde u. a. auch das mit Faktor Xa gespaltene Enzym genutzt (6.13.1.2). Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 900 µl Aceton gestoppt. Nach folgender Entfernung des Acetons in der Speedvac konnte die resultierende Lösung für eine Analyse der Masse verwendet werden (6.16.3).

6.16.2 ACP-AT-Assay II

Entsprechend den Angaben in der Literatur¹⁰⁵ wurde ein 2x Puffer hergestellt, so dass dieser direkt für den Assay als Mischung verwendet werden konnte:

40 mM Tris-HCl, pH 7,4
200 mM NaCl
2 mM DTT
4 mM EDTA
50 mM MgSO₄ x 7H₂O
0,2 mM FeSO₄ x 7H₂O

Für den Assay wurden dann die folgenden Substanzen zusammengegeben, wobei die AT zum Initiieren der Reaktion diente:

40 µl 2x Puffer
8 µg ACP
1 µg AT
100 µM Malonyl-CoA
ad 80 µl H₂O_{dest}

Bei den Enzymen handelte es sich um die entsprechende Elutionsfraktion der Proteinaufreinigung (6.13), deren Konzentration mittels Amidoschwarz ermittelt wurde (6.15). Im Falle des MBP-Fusionsproteins wurde u. a. auch das mit Faktor Xa gespaltene Protein eingesetzt (6.13.1.2). Die Negativkontrolle enthielt alle Bestandteile bis auf die AT. Die Mischung wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Reaktion durch die Zugabe von 900 µl Aceton gestoppt. Nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels in der Speedvac konnte die resultierende wässrige Lösung massenanalytisch untersucht werden (6.16.3). Von den angegebenen Mengen wurde in einigen Versuchen abgewichen. Auch fand teilweise eine Aufkonzentrierung der Probe statt, indem neben dem Aceton auch das Wasser in der Speedvac bei einer Temperatur von 30-45 °C entfernt wurde.

6.16.3 Massenanalytik der Reaktionsprodukte der ACP-AT-Assays

Für die massenanalytische Untersuchung der ACP-AT-Assays dienten verschiedene Methoden. Zum einen wurden die Proben direkt mittels MALDI-TOF-TOF-MS entsprechend 6.14.1 gemessen. Zum anderen erfolgte die Untersuchung mittels LC-MS und ESI-FT-ICR-MS:

Bei Einsatz der LC-MS fand dieselbe C18-Säule Verwendung, die schon für die HPLC genutzt wurde (vgl. 6.14.2). Der entsprechende Gradient wurde mit einer Flussrate von 0,7 ml/min eingesetzt. Bei der LC-MS werden neben dem UV-Spektrum auch die der jeweiligen Retentionszeiten entsprechenden Massenspektren mit einem ESI-microQ-TOF-Spektrometer im Positivmodus bestimmt (Beschreibung der Säule und des Gerätes unter 6.19).

Für die Messung mittels ESI-FT-ICR-MS wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe der Vivaspin 500 Zentrifugaleinheit mit entsprechender MWCO nach 6.14.3 entsalzt, mit angesäuertem Acetonitril oder Methanol versetzt und anschließend im Positivmodus gemessen (Gerätebeschreibung unter 6.19).

6.16.4 ACP-AT-Assay mit ^{14}C -markiertem Substrat

Für eine Untersuchung der Aktivität der AT, Substrate auf ACP zu übertragen, wurde auch radioaktives Malonyl-CoA [Malonyl-2- ^{14}C] und Acetyl-1- ^{14}C -CoA eingesetzt. Acetyl-CoA **7** dient als Substrat für die Startereinheit in der Polyketidbiosynthese, während Malonyl-CoA **8** als Substrat für jeden Elongationsschritt verwendet wird.

Für den Radioaktiv-Assay wurden die exprimierten AT sowie ACP (aus 6.13) zusammen bzw. einzeln mit dem radioaktiven Substrat wie folgt eingesetzt und die Reaktionsprodukte auf ein Proteingel aufgetragen:

4 μl DTT (10 mM)

5 μl AT

9 μl ACP

2 μl Malonyl CoA [Malonyl-2- ^{14}C] (0,01 mCi/ml)

bzw. 1 μl Acetyl CoA [Acetyl-1- ^{14}C] (0,02 mCi/ml)

Das *holo*- und *apo*-ACP von PedN wurde in der Regel 1:10 mit His-tag-Lysepuffer II (Tab. 6.10) verdünnt, um in etwa die gleiche Konzentration wie *holo*-PedI3 zu erhalten (*apo*-PedI3 hatte eine noch geringere Konzentration). In den Kontrollen fand jeweils anstelle des entsprechenden Proteins (ACP oder AT) His-tag-Lysepuffer II (Tab. 6.10) Verwendung. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe des radioaktiven Substrates, gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend 5 min bei

20 °C inkubiert. Im Folgenden wurden 20 µl 2x SDS-Ladepuffer (s. 6.13.4) zugegeben und die Mischung bei 99 °C für 5 min gekocht. Von den Proben dienten jeweils 12 µl zum Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel mit 15% Trenngel und 5% Sammelgel (beide entsprechend Literaturangaben¹⁴⁴). Bei 80 V (im Sammelgel) bzw. 130-180 V (im Trenngel) konnte die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Masse erfolgen (vgl. 6.13.4). Hierbei wurde die Gelelektrophoresekammer Multigel Long verwendet. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau entsprechend 6.13.4.1 gefärbt.

Für eine folgende Detektion der in den Proben enthaltenen Radioaktivität war eine Trocknung des Gels notwendig. Hierzu wurde das Proteingel auf eine saugfähige, mit destilliertem Wasser befeuchtete weiße Pappe gelegt. Nach Abdeckung des Gels mit handelsüblicher Haushaltsfolie wurde es auf einen Vakuum-Geltrockner bei einer Temperatur von 55 °C für 14 h und etwa weiteren 5 h bei Raumtemperatur unter Vakuum getrocknet. Nach dem Einscannen des trockenen Gels konnte dieses auf einen 20x40 cm großen Detektionsfilm in einer Filmkassette in einem von äußerer Strahlung abgeschirmten Schrank gelegt werden. Die Entwicklungsdauer ist dem Ergebnisteil zu entnehmen. Zur Sichtbarmachung der vom Gel auf den Film übertragenen Strahlung wurde dieser in einem Image Reader mit Hilfe des Programms BAS Reader eingelesen. Durch 15-minütige Belichtung des Films kann dieser gelöscht und wieder verwendet werden. Das entstandene Autoradiogramm konnte abschließend im Programm TINA 2.09d bearbeitet und mit dem gefärbten Proteingel verglichen werden.

6.16.5 Kinetik der ACP-AT-Assays

Für die kinetische Untersuchung der Übertragung des Substrates Malonyl-CoA **8** auf das ACP durch die AT wurde ein gekoppelter Assay genutzt, bei dem das freiwerdende Coenzym A **14** reagiert und dadurch NAD⁺ zu NADH reduziert wird. NADH hat sein Absorptionsmaximum bei 340 nm und kann folglich im Photometer detektiert werden. Die Zunahme von NADH kann über die Zeit gemessen werden und zur Ermittlung der kinetischen Daten genutzt werden. Die Reaktionsabfolge im genutzten gekoppelten Assay ist in Abb. 5.27 dargestellt. Die verwendeten Protein- und Substratmengen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen, während die restliche Mischung in Anlehnung an die Literatur^{125, 134} folgende Zusammensetzung hatte:

1 mM	EDTA
1 mM	MgCl ₂
50 mM	Natriumphosphatpuffer (pH 7,2)
0,4 mM	Thiaminpyrrophosphat (TPP)
1 mM	Tris(2-carboxyethyl)phosphon-Hydrochlorid (TCEP)
2 mM	α-Ketoglutarensäure
1,25 mM	NAD ⁺
20 mU	α-Ketoglutarensäure-Dehydrogenase
	Malonyl-CoA
	AT
	ACP
ad 200 µl	H ₂ O _{dest}

Der Natriumphosphatpuffer wurde als 1 M-Stammlösung entsprechend allgemein gültiger Regeln für Puffersysteme¹⁴⁷ durch Zusammengabe von 15,6 g Natriumdihydrogenphosphat und 17,8 g Dinatriumhydrogenphosphat in einem Endvolumen von 100 ml zu pH 7,2 hergestellt. Die α-Ketoglutarensäure-Dehydrogenase lag in 100% Glycerin vor und musste daher als wässrige 1:4-Lösung eingesetzt werden. Dazu wurde das entsprechende Volumen Wasser in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und auf der Waage die jeweilige Menge Enzym-Lösung zugetropft. Das Gesamtvolumen wurde so gewählt, dass es für mehrere Ansätze verwendet werden konnte. Alle Bestandteile bis auf das Malonyl-CoA **8** und die Proteine wurden in eine Mikroküvette (70-850 µl) gegeben. Zu jeder Substratkonzentration musste auch eine Blindprobe hergestellt werden mit destilliertem Wasser anstelle der Proteine. Die Negativkontrollen enthielten entweder nur das *holo*-ACP, nur die AT oder *apo*-ACP und AT. Alle Proben lagen mindestens im doppelten Ansatz vor. Bei den Proben wurden erst das Protein oder die Proteinmischung, dann Malonyl-CoA **8** zugegeben und einmal auf- und abpipettiert zum Homogenisieren der Lösung. Die Proteinmischung enthielt dabei das ACP und die AT im entsprechenden Verhältnis. Im Fall der Blindwerte erfolgte nur die Zugabe von Malonyl-CoA **8**. Die Extinktion wurde bei 340 nm über einen Zeitraum von 15 min mit einer Messung alle 10 s, beginnend bei 0 s, aufgezeichnet. Dazu wurde das Photometer (BioMate 3) entsprechend programmiert, um die Aufnahme der Absorptionswerte automatisch durchzuführen. Von den ermittelten Extinktionen der Proben wurden jeweils die Blindwerte abgezogen und die Differenzen wiederum in Abhängigkeit von der Zeit

dargestellt. Dabei wurden Ausreißer eliminiert und jeweils Mittelwerte der verbleibenden Kurven gebildet.

6.17 *O*-MT-Assay und Analytik des Assays

Für den Nachweis der *O*-MT-Aktivität wurde ein Assay mit den exprimierten Proteinen (PedA, PedE, PedO und OnnD) unter Verwendung von *S*-Adenosylmethionin (SAM) und dem jeweiligen Substrat durchgeführt. Für die aus dem *ped*-Cluster stammenden Enzyme dienten Mycalamid A **25** und Mycalamid B **32** als Substrat. Die Substanzen wurden in reiner Form von der Gruppe von Prof. John Blunt und Prof. Murray Munro (University of Canterbury, NZ) zur Verfügung gestellt und der Feststoff in Acetonitril gelöst. Als Substrat für das auf dem *onn*-Gencluster codierte OnnD sollte Pederin **23** getestet werden. Die Substanz lag als Ethanol-Extrakt aus *Paederus fuscipes*-Käfern (gesammelt in Aydın, Türkei) vor, wobei neben dem Pederin **23** in der Lösung auch noch Lipide etc. vorlagen. Daher war es für den Versuch notwendig, das Substrat aufzureinigen, um eventuelle Fehlerquellen, die aufgrund der zusätzlichen Inhaltsstoffe entstehen könnten, auszuschließen (6.17.1).

6.17.1 Reinigung von Pederin

Der pederinhaltige Käferextrakt wurde zur Entfernung der Lipide mit *n*-Hexan ausgeschüttelt. Von den verwendeten 30 ml Rohextrakt musste dazu erst das Ethanol im Rotationsverdampfer entfernt werden, um anschließend dieselbe Menge Methanol zuzugeben, da zwischen Ethanol und *n*-Hexan keine Phasentrennung auftritt. Die Extraktion erfolgte dreimal in einem Scheidetrichter mit je 60 ml *n*-Hexan, wobei die Alkanphase jeweils verworfen werden konnte. Im Anschluss wurde das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt, Ethylacetat zugegeben und die Lösung auf eine mit Kieselgel 60 gefüllte Säule (equilibriert mit Ethylacetat) gegeben. Als Laufmittel diente Ethylacetat. Proben der gesammelten Fraktionen von je etwa 5-10 ml wurden mittels Glaskapillaren auf eine DC-Platte mit Kieselgel 60 aufgetragen, in Ethylacetat entwickelt und die trockene DC-Platte in Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz (5 ml Eisessig, 10 ml Anisaldehyd, 15 ml konz. Schwefelsäure, 420 ml Ethanol) getaucht. Durch Erhitzen der Kieselgelplatte mit einem Fön

konnten die in den Fraktionen enthaltenen Substanzen sichtbar gemacht werden. Pederin **23** hatte unter den gegebenen Bedingungen einen Rf-Wert von 0,38. Die Fraktionen mit Pederin **23** wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß schrittweise zusammengegeben und das Ethylacetat jeweils in der Speedvac abgedampft. Die gewogene Substanz konnte dann je nach gewünschter Endkonzentration in der entsprechenden Menge Acetonitril gelöst werden. Eine 100 μM Lösung wurde zur Überprüfung der Reinheit im Positivmodus des ESI-FT-ICR-MS (Gerätebeschreibung s. 6.19) gemessen und zum Vergleich ein Spektrum des Rohextraktes angefertigt. Durch vorhergehende, selbst nicht durchgeführte Untersuchungen des Rohextraktes, konnte eine Pederinmenge von etwa 1 mg in 23 ml ermittelt werden, so dass der Extrakt etwa eine Pederinkonzentration von 86 μM hat. Von dem Extrakt wurde ebenfalls eine Probe abgenommen, das Ethanol abgedampft, entsprechend Acetonitril zugegeben und zum Vergleich eine 100 μM Lösung für die Massenspektroskopie verwendet.

6.17.2 Löslichkeit der Substrate

Um im Reaktionsgemisch mit den Enzymen (6.17.3) die Menge an Lösungsmittel so gering wie möglich zu halten und eine mögliche Inaktivierung der Proteine zu verhindern, wurde getestet, ob die Substrate auch in Mischungen mit weniger Lösungsmittel löslich sind. Dies wurde mit Pederin **23** durchgeführt, da hiervon größere Mengen zur Verfügung standen. Durch die Strukturhomologie kann das Ergebnis auch auf Mycalamid A **25** bzw. B **32** übertragen werden. Das gereinigte Pederin **23** aus 6.17.1 wurde in Acetonitril aufgenommen, so dass eine 1 mM Lösung entstand. Nach einer 1:10-Verdünnung mit Acetonitril (100 μM) wurden 1 ml in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Acetonitril in der Speedvac abgedampft und 1 ml destilliertes Wasser zugegeben (100 μM). Die Löslichkeit wurde nach Zugabe von insgesamt 15 μl DMSO und Durchmischung durch Verwendung eines Ultraschallbades (5 min) erreicht. In einem anderen Versuch wurden zu 900 μl destilliertem Wasser 100 μl der 1 mM Substanz gegeben (100 μM) und die Probe für 5 min in ein Ultraschallbad gestellt. Von dem Rohextrakt, den Lösungen des reinen Pederin **23** und der Ansätze mit Wasser und DMSO bzw. Wasser und Acetonitril dienten Proben für eine DC-Platte mit Kieselgel 60. Nach Entwicklung in Ethylacetat und Färbung mit Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz (s. 6.17.1) wurden die Proben durch Verwendung eines Föns sichtbar gemacht.

6.17.3 *O*-MT-Assay

Für den Assay mit den *O*-MT wurden in einem 2 ml-Reaktionsgefäß folgende Bestandteile zusammengegeben:

100-400 µl	Elutionsfraktion des Proteins
50-100 µl	Substrat (200 µM)
10 µl	<i>S</i> -Adenosylmethionin (SAM; 32 mM)
ad 1 ml	HEPES, pH 7,5 mit NaOH (50 mM)

Bei der Elutionsfraktion des Enzyms handelte es sich um die sauberste Fraktion mit der höchsten Menge des gewünschten Proteins. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Amidoschwarz nach 6.15 und die Endkonzentration betrug etwa 100 µg/ml Ansatz.

Je nach untersuchter *O*-MT diente Mycalamid A **25** bzw. Mycalamid B **32** (für PedA, PedE, PedO) oder Pederin **23** (für OnnD) als Substrat, wobei dieses in Acetonitril gelöst und mit Wasser auf 200 µM verdünnt wurde. Für die Negativkontrolle fand anstelle der Proteinlösung HEPES-Puffer Verwendung. Der Ansatz wurde gemischt und 1-1,5 h bei 30 °C inkubiert. Danach erfolgte mindestens zweimal eine Zugabe von je 10 µl SAM mit jeweils einer weiteren Stunde Inkubation bei 30 °C. Abschließend wurde 1 ml Ethylacetat zugegeben und kräftig geschüttelt. Die Trennung der organischen und wässrigen Phase erfolgte durch Zentrifugation bei 130000 rpm für 3 min in einer Mikrozentrifuge. Die organische Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Ethylacetat in der Speedvac komplett abgedampft. Durch Zugabe von 50-100 µl Ethylacetat konnte die Probenkonzentration in etwa auf den anfänglichen Wert gebracht werden.

6.17.4 Analytik des *O*-MT-Assays

Die unter 6.17.3 umgesetzte Probe wurde anschließend mit verschiedenen Verfahren massenanalytisch untersucht. Hierzu diente die in 50 bzw. 100 µl Ethylacetat aufgenommene Probe. Bei allen Untersuchungen wurden neben den Enzym-Substrat-Assays auch Negativkontrollen angesetzt und analysiert (s. o.).

Für die Analyse der Probe mittels ESI-microQO-TOF-MS im Positivmodus (nähere Gerätebeschreibung unter 6.19) wurde die Probe 1:5 bzw. 1:10 mit Ethylacetat verdünnt (entspricht etwa einer Menge von 2 nmol für die Messung). Zur

Bestimmung der exakten Masse fand Natriumformiat als externe Kalibriersubstanz Verwendung. Um ein besseres Verständnis für die erfolgte Reaktion zu haben, wurde auch eine MS-MS durchgeführt, bei der interessierende Massen ausgewählt und durch Beschuss mit Elektronen fragmentiert werden können. Die Proben aus 6.17.3 wurden in derselben Konzentration eingesetzt wie für die normale Messung mit dem ESI-microQQ-TOF-Massenspektrometer (s. o.). Die interessierenden Massen konnten dann mit Elektronen einer Energie von 10-50 eV beschossen und die entstandenen Fragmente im Massenspektrometer analysiert werden.

Eine andere Fragmentierungsmethode stellt die EI-MS dar, bei der die Substanzen direkt durch den Beschuss von Elektronen ionisiert und dabei mehr oder weniger stark fragmentiert werden. Von der Probe aus 6.17.3 wurden 30 µl abgenommen, in einem Reaktionsgefäß in der Speedvac komplett abgedampft und der Feststoff mittels EI-MS untersucht (Gerätebeschreibung s. 6.19).

Für die Analyse der Proben kam auch die LC-MS zum Einsatz, bei der 20-30 µl der in Ethylacetat aufgenommenen Proben aus 6.17.3 eingesetzt wurden. Für die Messung fand die schon unter 6.14.2 für die HPLC der Proteine verwendete C18-Säule Verwendung. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 206nm. Als Laufmittel in dem unter 6.19 näher beschriebenen HPLC-Gerät dienten Acetonitril und Wasser, beide jeweils mit 0,05% TFA versetzt. Folgender Gradient bei einer Flussrate von 0,7 ml/min wurde verwendet: 10:90 für 2,5 min, 75:25 innerhalb von 17,5 min, 75:25 für 6 min, 100:0 innerhalb von 2 min, 100:0 für 2 min, 10:90 innerhalb von 1 min, 10:90 für 8 min. Die mittels HPLC aufgetrennten Substanzen unterschiedlicher Retentionszeit wurden dann mittels eines ESI-microQQ-TOF-Massenspektrometers analysiert (Gerätebeschreibung s. 6.19) und im Programm Compass, Data Analysis (Version 3.4) ausgewertet. Das Gerät lässt auch die Bestimmung der Retentionszeit einer interessierenden Masse zu. Dabei kann eine Massenspur durch den gesamten Lauf gelegt werden, die nur die gewünschte Größe berücksichtigt. Erscheint die entsprechende Masse zu einer bestimmten Retentionszeit, ist diese dann als Peak sichtbar.

6.17.5 Derivatisierung des Reaktionsproduktes des *O*-MT-Assays

Für genauere Aussagen bezüglich der Struktur des Reaktionsproduktes des *O*-MT-Assays, sollte eine Derivatisierung der Substanz erfolgen. Hierbei handelt es sich um das Produkt aus der Reaktion von Mycalamid A **25** mit der *O*-MT PedO. Für einen Vergleich wurden die Reaktionen auch mit Mycalamid A **25** und Mycalamid B **32** durchgeführt. Für eine Schutzgruppenreaktion an der primären Hydroxylgruppe wurden in Anlehnung an die Literatur¹⁴¹ Vorversuche mit Mycalamid B **32** durchgeführt. In einem Reaktionsgefäß aus Glas wurden davon 400 µl einer 200 µM Lösung (= 80 nmol) vorgelegt und unter Vakuum das Lösungsmittel entfernt. 9 mg Triphenyl-methylchlorid (32 µmol) und 0,8 mg 4-Dimethylaminopyridin (DMAP, 6,5 µmol) wurden in 1 ml trockenem Pyridin gelöst und unter Argon-Schutzgas zugegeben. DMAP dient dabei zur Aktivierung der Schutzgruppe.¹⁴⁸ Die Mischung musste dann 48 h bei Raumtemperatur unter Argon gerührt werden. Mit Hilfe einer Spritze konnte der Ansatz in einen Scheidetrichter überführt und mit Dichlormethan und Wasser dreimal extrahiert werden. Die organische Phase wurde in einen Kolben überführt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Zugabe von etwas Acetonitril schloss sich die Analyse mittels LC-MS nach 6.17.4 an.

Eine weitere Variante stellte die Oxidation mittels Tris(triphenylphosphin)-ruthenium-(II)-dichlorid in Anlehnung an Literaturvorgaben¹⁴² dar. In Vorversuchen wurden 0,2 mg Mycalamid B **32** (gelöst in Acetonitril) in ein ausgeheiztes Glasreaktionsgefäß überführt und unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurden 6 mg trockenes Kaliumcarbonat, 12 mg Tris(triphenylphosphin)-ruthenium-(II)-dichlorid und 400 µl wasserfreies Toluol zugegeben. Unter Argon-Schutzgas musste der Ansatz bei 60 °C für 6 h gerührt werden. Für die Reinigung wurde in Ethylacetat aufgeschlämmtes Kieselgel 60 verwendet, das in eine Säule überführt wurde. Die Mischung konnte dann aufgetragen, mit viel Ethylacetat gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt werden. Die Lösung nach Zugabe von etwas Ethylacetat wurde im Folgenden mittels LC-MS (6.17.4) untersucht.

Die Acetylierung stellte eine weitere Möglichkeit der Substanzidentifizierung dar und erfolgte in Anlehnung an Literaturangaben.¹⁴⁰ Der verwendete Enzym-Assay wurde entsprechend 6.17.3 durchgeführt, jedoch 300 µl der entsprechenden Elutionsfraktion (aus 6.13) und 50 µl einer 1 mM Mycalamid A **25**-Lösung (= 50 nmol; in

Acetonitril) verwendet. Die ebenfalls angesetzten Negativkontrollen enthielten 50 nmol Mycalamid A **25** bzw. Mycalamid B **32** (jeweils in Acetonitril) ohne Protein. Nach Extraktion und Überführen in ein neues Reaktionsgefäß wurde das Ethylacetat in der Speedvac vollständig entfernt. Durch Zugabe von 100 µl Essigsäureanhydrid und 100 µl Pyridin wurde die Acetylierung gestartet und bei Raumtemperatur für 5 h gerührt. Durch dreimalige Extraktion mit Chloroform und Wasser in einem Scheidetrichter erfolgte die Aufreinigung. Die organische Phase wurde in einen Kolben überführt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und durch Anschluss an eine Vakuumpumpe entfernt. Die Substanzen konnten im Folgenden durch Acetonitril-Zugabe wieder gelöst werden. Die Lösung wurde in ein entsprechendes HPLC-Gefäß überführt und in der Speedvac auf etwa 100 µl eingengt. Die Analyse erfolgte mittels LC-MS nach 6.17.4, jedoch unter Verwendung eines anderen Gradienten mit einer Flussrate von 0,4 ml/min mit Acetonitril und Wasser (jeweils mit 0,5% TFA): 10:90 über eine Dauer von 2,5 min, 100:0 innerhalb von 32,5 min, 100:0 für 5 min, 10:90 innerhalb von 5 min, 10:90 für einen Zeitraum von 5 min.

6.17.6 NMR-Analyse des PedO-Mycalamid A-Assays

Für die genaue Analyse des Reaktionsproduktes von PedO und Mycalamid A **25** fand auch die NMR-Spektroskopie Verwendung. Die Messungen wurden in Neuseeland an der University of Canterbury (NZ) in der Arbeitsgruppe John Blunt/Murray Munro durchgeführt. Der Assay sowie die Negativkontrollen wurden entsprechend 6.17.3 durchgeführt unter Verwendung von 300 µl der Elutionsfraktion des MBP-Fusionsproteins von PedO bzw. HEPES-Puffer im Fall der Negativkontrollen. Als Substrat dienten 50 µl einer 1 mM Mycalamid A **25**-Lösung (ACN/Wasser) bzw. 13 µl einer 5 mM Mycalamid B **32**-Lösung. Nach Inkubation und Extraktion (6.17.3) wurde die organische Phase in der Speedvac komplett eingengt. Der Assay wurde zweimal angesetzt, wobei ein Ansatz für die NMR-Messung und ein Ansatz für die Analyse mittels ESI-microQ-TOF-MS (6.17.4) diente. Hierzu wurden 50 µl Ethylacetat zugegeben und das Massenspektrum aufgenommen. Der andere Ansatz sowie die beiden Negativkontrollen wurden in CDCl₃ aufgenommen und bei 23 °C in einem NMR-Spektrometer vermessen (genaue Gerätebeschreibung s. 6.19). Dabei wurde für 1D- und 2D-Spektren (COSY, HSQC-DEPT) ¹H-NMR sowie ¹³C-NMR durchgeführt.

6.18 Verwendete Chemikalien

Lösungsmittel wie Aceton, Acetonitril, Chloroform, Dichlormethan, Isopropanol, Ethylacetat, Methanol, *n*-Hexan etc. wurden von den Firmen Fluka / Riedel-de-Haën (Seelze), Merck (Darmstadt), Fisher Scientific (Schwerte) und J. T. Baker / Mallinckrodt Baker (Deventer, NL) bezogen und hatten p. A. – Qualität. Für HPLC-Anwendungen wurden in der Regel entsprechende Lösungsmittel der Firma Merck (Darmstadt) mit HPLC-grade verwendet.

Chemikalie	Firma, Sitz
Acetyl-Coenzym A [Acetyl-1- ¹⁴ C]	Perkin-Elmer, Rodgau
Acrylamid-bisacrylamid 37,5:1 (Rotiphoresegel 30)	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Qualität	Roth, Karlsruhe
L-Arabinose	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Ameisensäure	Riedel-de-Haën, Seelze
Amidoschwarz 10B	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Amyloseharz	NEB, Frankfurt/Main
Antarctic Phosphatase + 10x Puffer	NEB, Frankfurt/Main
Bovin Serum Albumin (BSA-Lösung 10 mg/ml)	NEB, Frankfurt/Main
Brilliant-Blau R250	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid	KMF, Lohmar
Carbenicillin-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
Chitinharz	Invitrogen, Karlsruhe
Chloramphenicol	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxythiamin-5'-triphosphat (dTTP)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>p</i> -Anisaldehyd	Sigma-Aldrich, Seelze
Desoxynukleotide (dNTPs)	Invitrogen, Karlsruhe
4-Dimethylaminopyridin (DMAP)	Acros Organics, Geel (B)
N, N-Dimethylformamid (DMF)	Fisher-Scientific, Schwerte
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
100bp DNA ladder extended	Roth, Karlsruhe
1kb DNA ladder	Roth, Karlsruhe
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Acros Organics, Geel (B)
Ethidumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	KMF, Lohmar
Expand High Fidelity ^{PLUS} PCR System	Roche, Grenzach-Wyhlen

Chemikalie	Firma, Sitz
Faktor Xa	NEB, Frankfurt/Main
D(+)-Glucose Monohydrat	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Fisher-Scientific, Schwerte
Guanidin-Hydrochlorid	Qiagen, Hilden
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Roth, Karlsruhe
IMPACT-CN System	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	ABCR; Karlsruhe
Kaliumcarbonat	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Acros Organics, Geel (B)
Kanamycin-Sulfat	Roth, Karlsruhe
α -Ketoglutar säure	Roth, Karlsruhe
α -Ketoglutar säure-Dehydrogenase	Sigma-Aldrich, Seelze
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Malonyl-Coenzym A-Lithiumsalz	Sigma-Aldrich, Seelze
Malonyl-Coenzym A [Malonyl-2- 14 C]	Perkin-Elmer, Rodgau
D(+)-Maltose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Seelze
Mycalamid A und B	Prof. Munro / Prof Blunt, Canterbury, Neuseeland
Natriumacetat	Acros Organics, Geel (B)
Natriumcarbonat	KMF, Lohmar
Natriumchlorid	Grüssing, Filsum
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	KMF, Lohmar
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Seelze
Nicotinamidadenin dinukleotid (NAD ⁺)	Roth, Karlsruhe
Ni NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Ni NTA Säulchen	Qiagen, Hilden
Overnight Express TB-Medium	Novagen-EMD/Merck, Darmstadt
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam (NL)
pGEMTeasy kit	Promega, Mannheim
Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinmarker Broad-Range	NEB, Frankfurt/Main
Proteinmarker Rainbow 14 C-markiert (CFA755)	GE Healthcare, München
Proteinmarker RotiMark Standard	Roth, Karlsruhe
Pyridin, trocken	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR purification kit	Qiagen, Hilden

Chemikalie	Firma, Sitz
Restriktionsenzyme + 10x Puffer + 100x BSA	NEB, Frankfurt/Main
Ribonuklease A (RNase A)	Roth, Karlsruhe
S-Adenosylmethionin (SAM)	NEB, Frankfurt/Main
Salzsäure	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Schwefelsäure	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Silbernitrat	KMF, Lohmar
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Seelze
T4 DNA Ligase + 10x Puffer	NEB, Frankfurt/Main Jena Bioscience, Jena
<i>Taq</i> DNA Polymerase + 10x Puffer	NEB, Frankfurt/Main
Tetracyclin-Hydrochlorid	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Thyaminpyrophosphat-Chlorid (TPP)	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Toluol, wasserfrei	Sigma-Aldrich, Seelze
TOPO-TA Cloning-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	Roth, Karlsruhe
Tris(2-carboxyethyl)phosphon-Hydrochlorid (TCEP)	AppliChem, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triphenylmethylchlorid	Sigma-Aldrich, Seelze
Tris(triphenylphosphin)-Ruthenium(II)-Dichlorid	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

6.19 Verwendete Geräte und Materialien

Einwegverbrauchsmaterialien wie Reaktions- und Zentrifugengefäße, serologische Pipetten, Pipettenspitzen und Mikroröhren wurden hauptsächlich von der Fa. Sarstedt, Nümbrecht, bezogen.

Gerät / Material	Firma, Sitz
Agarosegelelektrophorese-Kammer + Spannungsquelle Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Analysenwaage CP225D	Sartorius, Göttingen
Autoklav V65	Systec, Wettengel
Cellophan-Folien + Gelrocknungsrahmen	Roth, Karlsruhe
Celluloseacetat-Folie OTB (25x130 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
DC-Alufoleie Kieselgel 60 F ₂₅₄	Merck, Darmstadt
Drehschiebervakuumpumpe RZ6	Vacuubrand, Wertheim
Elektroporationsküvette 2mm	Bio-Rad, München
Elektroporator MicroPulser	Bio-Rad, München
Filmkassette Fujix BAS IP Cassette 20x40 cm	Fuji, Düsseldorf
Geldokumentation Gene Genius	Syngene, Cambridge (UK)
Halb-Mikroküvette (1,6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
HPLC-Anlage (inkl. Fraktionssammler)	Jasco, Gross-Umstadt
HPLC-Säule C18 Nucleodur 100, 125x2 mm, 5 µm	Machery-Nagel, Düren
HPLC-Säule C8 PerfectSil, 250x4 mm, 5 µm	MZ-Analysentechnik, Mainz
Inkubationsschüttler Certomat BS-1	Sartorius, Göttingen
Inkubator B12	Thermo, Langenselbold
Kieselgel 60 (0,040- 0,063 mm)	Merck, Darmstadt
Membranvakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikroküvette UltraVette (70-850 µl)	Roth, Karlsruhe
Mikrowelle Lifetec	Medion, Essen
Mikrozentrifuge ungekühlt Mikro200	Hettich, Tuttlingen
Mikrozentrifuge, gekühlt 5417R	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge, gekühlt Mikro200R	Hettich, Tuttlingen
Multigel (Gelelektrophoresesystem vertikal), Multigel Long (Gelelektrophoresesystem vertikal) + Spannungsquelle Standard PowerPack P25	Biometra, Göttingen
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)
Poly-Prep Säule (leer)	Bio-Rad, München
Probenfläschchen für Autosampler (HPLC-Gefäße mit Deckel und Septum)	Roth, Karlsruhe
ProteanII xi cell (Gelelektrophoresesystem vertikal)	Bio-Rad, München
Rotationsverdampfer VV2000	Heidolph, Kelheim
Schüttler Rotamax 120	Heidolph, Kelheim

Gerät / Material	Firma, Sitz
Speedvac / Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Biowizard	Kojair, Vilppula (FIN)
Sterilfilter (0,2 µm, Celluloseacetat, FP 30/0,2)	Whatman / Schleicher & Schuell, Dassel
Thermocycler T-Gradient	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Rotina 35R	Hettich, Tittlingen
Tischzentrifuge Z513K	Hermle, Wehingen
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD2070	Bandelin, Berlin
UV-Crosslinker CL1000	UVP, Cambridge (UK)
Vakuum-Geltrockner Maxidry D64	Biometra, Göttingen
Vortex-Mixer VTX-3000L	LMS, Tokio (J)
Waage 440-47N	Kern, Balingen-Frommern
Waage BP110	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugaleinheiten Vivaspin 500 (versch. MWCO)	VWR, Darmstadt
ZipTip (C4 bzw. C18)	Millipore, Billerica (USA)

Eigenschaften verwendeter Spektrometer:

MALDI-TOF-MS (MPI Jena):

- ToFSpec 2E mit MALDI-Quelle
- Fa. Micromass, Manchester (UK)
- linearer Modus oder Reflektron-Modus möglich

MALDI-TOF-TOF-MS:

- autoflex II TOF/TOF-Flugzeitspektrometer mit MALDI-Quelle
- Fa. Bruker Daltonik, Bremen
- Genauigkeit der Massenbestimmung: 100 ppm
- Kalibrierung extern mit Polystyrol/Ag⁺

EI-MS:

- MAT 95 XL Sektorfeldgerät
- Fa. Thermo Finnigan, Bremen
- Genauigkeit der Massenbestimmung: 0,2 Da (Spektrum), 1 ppm (exakte Masse)
- Bestimmung exakter Massen durch Peak-Matching mit Perfluorkerosin

ESI-microQ-MS:

- Fa. Bruker Daltonik, Bremen
- microTOF-Q Flugzeitspektrometer mit Apollo-ESI-Quelle
- Genauigkeit der Massenbestimmung: 0,1 Da (Spektrum), 5 ppm (exakte Masse)
- Messung mit Autosampler
- Flussmittel: Methanol
- Kalibrierung extern mit Natriumformiat

LC-MS: HPLC und ESI-microQO-MS:

- HPLC-Anlage Agilent 1200 Series
- microQO-TOF-Flugzeitspektrometer der Fa. Bruker Daltonik, Bremen mit Apollo-ESI-Quelle
- Messung mit Autosampler
- Genauigkeit der Massenbestimmung: 0,1 Da (Spektrum), 5 ppm (exakte Masse)
- Flussmittel Massenbestimmung: Methanol
- Kalibrierung extern mit Natriumformiat

ESI-FT-ICR-MS:

- Fa. Bruker Daltonik, Bremen
- Apex IV FT-ICR Massenspektrometer mit 7 Tesla - Magnet
- Apollo-ESI-Quelle

NMR (University of Canterbury, Neuseeland):

- INOVA 500 Spektrometer der Fa. Varian, Palo Alto (USA)
- 500 MHz, variable Temperatureinstellung
- Lösungsmittel: CDCl_3
- interne Standards (für CDCl_3): Signale der Lösungsmittel-Protonen (δ_{H} 7,25 ppm) bzw. -Kohlenstoffe (δ_{C} 77,01 ppm)
- Möglichkeit der Verwendung von CapNMR-Sonden der Fa. Protasis, Marlborough (USA)

7. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ACP	Acylcarrierprotein
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
ADP	Adenosindiphosphat (5'-Adenosindiphosphat)
3', 5'-ADP	3', 5'-Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp ¹⁰⁰	Ampicillin in der Endkonzentration 100 µg/ml (statt Ampicillin wurde gleichbedeutend auch Carbenicillin verwendet)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Adapter (<i>in</i> : Adapterdomäne)
Arg	Arginin
AT	Acyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovin Serum Albumin
C-Domäne	Kondensationsdomäne (condensation-domain)
Cm ³⁴	Chloramphenicol in der Endkonzentration 34 µg/ml
CoA / CoASH	Coenzym A
COSY	zweidimensionale NMR-Spektroskopie mit ¹ H- ¹ H-Korrelation (correlation spectroscopy)
CR	Crotonase
Cys	Cystein
Da	Dalton (= g/mol)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPT	<i>in</i> : NMR-Spektroskopie-Methode zur Unterscheidung von CH-, CH ₂ - und CH ₃ - Signalen (distortionless enhancement by polarization transfer)
DH	Dehydrogenase
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	1,4-Dithiothreit
dTTP	Desoxythymintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure (ethylene diamine tetracetic acid)
EI	Elektronenstoßionisation
ER	Enoylreduktase
<i>ery</i>	Erythromycin A-Gencluster bzw. Gen des Erythromycin A-Genclusters
ESI	Elektrosprayionisation
ESI-FT-ICR	Elektrosprayionisations-Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz-
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAS	Fettsäuresynthase (fatty acid synthase)
FMN	Flavin-Mononukleotid
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GNAT	GCN5-verwandte N-Acetyltransferase
HCCA	α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid)
HeLa-Zellen	Epithelzellen eines Gebärmutterhalskrebs, die als Zelllinie verwendet werden (ursprünglich entnommen von Henrietta Lacks)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A
H ₂ O _{dest.}	destilliertes (<i>hier</i> : deionisiertes) Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
HSQC	zweidimensionale NMR-Spektroskopie mit Korrelation unterschiedlicher Nuklide, zum Beispiel ¹ H- ¹³ C (heteronuclear single quantum coherence)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ile	Isoleucin

IMPACT	Intein vermittelte Aufreinigung mit Chitinbinde-Tag (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag)
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IS	Insertionssequenz
k_{cat}	molekulare Aktivität, Wechselzahl (turnover number)
kDa	kilo-Dalton (1 kDa = 1000 g/mol)
K_m	Michaeliskonstante
K_n^{50}	Kanamycin in der Endkonzentration 50 µg/ml
KS	Ketosynthase (auch: Ketoacylsynthase)
KR	Ketoreduktase
LB Medium	Luria-Bertani Medium
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
MBP	Maltosebindeprotein
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minuten
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
MT	Methyltransferase
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
MWCO	Molekulargewicht-Ausschlussgrenze (molecular weight cut off)
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	Kernresonanz (nuclear magnetic resonance)
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
<i>onn</i>	Gen des Onnamidgenclusters
Onn	Protein, exprimiert aus Onnamidgen
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
PCP	Peptidylcarrierprotein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>ped</i>	Gen des Pederingenclusters
Ped	Protein, exprimiert aus Pederingen
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPTase	Phosphopantetheinyltransferase
rbs	ribosomale Bindestelle
RM	Rich Medium mit Glucose
RNase A	Ribonuklease A
RP	Umkehrphase (reverse phase)
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulphate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
SNAC	N-Acetylcysteamin
Str^{50}	Streptomycin in der Endkonzentration 50 µg/ml
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphon
TE	Thioesterase
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
$Tet^{12,5}$	Tetracyclin in der Endkonzentration 12,5 µg/ml
TFA	Trifluoressigsäure (trifluoric acid)
TOF	Flugzeit ~ (time of flight)
TPP	Thyaminpyrophosphat
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, pH-Wert eingestellt mit Salzsäure (HCl)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

Andere verwendete Abkürzungen sind direkt im jeweiligen Abschnitt bzw. der Abbildung oder Tabelle erläutert.

8. Literaturverzeichnis

1. Shen, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* **7**: 285-295 (2003).
2. Staunton, J. & Weissman, K.J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* **18**: 380-416 (2001).
3. Julien, B. & Shah, S. Heterologous expression of epothilone biosynthetic genes in *Myxococcus xanthus*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2772-2778 (2002).
4. Schwecke, T., Aparicio, J.F., Molnar, I., König, A., Khaw, L.E., Haydock, S.F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortes, J., Lester, J.B., Böhm, G.A., Staunton, J. & Leadlay, P.F. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7839-7843 (1995).
5. Hill, A.M. The biosynthesis, molecular genetics and enzymology of the polyketide-derived metabolites. *Nat Prod Rep* **23**: 256-320 (2006).
6. Sudek, S., Lopanik, N.B., Waggoner, L.E., Hildebrand, M., Anderson, C., Liu, H., Patel, A., Sherman, D.H. & Haygood, M.G. Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "*Candidatus Endobugula sertula*", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *J Nat Prod* **70**: 67-74 (2007).
7. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. & Gianni, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**: 185-229 (2004).
8. Lüllmann, H. & Mohr, K. Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1999).
9. Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y. & Bechthold, A. Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat Prod Rep* **24**: 162-190 (2007).
10. Hutchinson, C.R. Microbial polyketide synthases: more and more prolific. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3336-3338 (1999).
11. Piel, J., Butzke, D., Fusetani, N., Hui, D., Platzner, M., Wen, G. & Matsunaga, S. Exploring the chemistry of uncultivated bacterial symbionts: antitumor polyketides of the pederin family. *J Nat Prod* **68**: 472-479 (2005).
12. Birch, A.J. Biosynthesis of polyketides and related compounds. *Science* **156**: 202-206 (1967).
13. Allsop, A.E. New antibiotic discovery, novel screens, novel targets and impact of microbial genomics. *Curr Opin Microbiol* **1**: 530-534 (1998).
14. White, R.E. High-throughput screening in drug metabolism and pharmacokinetic support of drug discovery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 133-157 (2000).
15. Clardy, J., Fischbach, M.A. & Walsh, C.T. New antibiotics from bacterial natural products. *Nat Biotechnol* **24**: 1541-1550 (2006).
16. McDaniel, R., Thamchaipenet, A., Gustafsson, C., Fu, H., Betlach, M. & Ashley, G. Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1846-1851 (1999).
17. Hill, A.M. & Thompson, B.L. Novel soraphens from precursor directed biosynthesis. *Chem Commun (Camb)* 1360-1361 (2003).
18. Cropp, T.A., Wilson, D.J. & Reynolds, K.A. Identification of a cyclohexylcarbonyl CoA biosynthetic gene cluster and application in the production of doramectin. *Nat Biotechnol* **18**: 980-983 (2000).
19. Rix, U., Fischer, C., Rensing, L.L. & Rohr, J. Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep* **19**: 542-580 (2002).
20. Kalaitzis, J.A., Izumikawa, M., Xiang, L., Hertweck, C. & Moore, B.S. Mutasynthesis of enterocin and wailupemycin analogues. *J Am Chem Soc* **125**: 9290-9291 (2003).

21. Piel, J., Hui, D., Wen, G., Butzke, D., Platzer, M., Fusetani, N. & Matsunaga, S. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16222-16227 (2004).
22. Partida-Martinez, L.P. & Hertweck, C. A gene cluster encoding rhizoxin biosynthesis in "*Burkholderia rhizoxina*", the bacterial endosymbiont of the fungus *Rhizopus microsporus*. *Chembiochem* **8**: 41-45 (2007).
23. Partida-Martinez, L.P., de Looß, C.F., Ishida, K., Ishida, M., Roth, M., Buder, K. & Hertweck, C. Rhizonin, the first mycotoxin isolated from the zygomycota, is not a fungal metabolite but is produced by bacterial endosymbionts. *Appl Environ Microbiol* **73**: 793-797 (2007).
24. Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* **66**: 1022-1037 (2003).
25. Kraljevic, S., Stambrook, P.J. & Pavelic, K. Accelerating drug discovery. *EMBO Rep* **5**: 837-842 (2004).
26. Hunt, B. & Vincent, A.C. Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. *Ambio* **35**: 57-64 (2006).
27. Hale, K.J., Hummersone, M.G., Manaviazar, S. & Frigerio, M. The chemistry and biology of the bryostatin antitumour macrolides. *Nat Prod Rep* **19**: 413-453 (2002).
28. Hopwood, D.A. Cracking the polyketide code. *PLoS Biol* **2**: 166-169 (2004).
29. Liou, G.F. & Khosla, C. Building-block selectivity of polyketide synthases. *Curr Opin Chem Biol* **7**: 279-284 (2003).
30. Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M. Prinzipien der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1994).
31. McDaniel, R., Welch, M. & Hutchinson, C.R. Genetic approaches to polyketide antibiotics. I. *Chemical Reviews* **105**: 543-558 (2005).
32. Moore, B.S. & Hertweck, C. Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Nat Prod Rep* **19**: 70-99 (2002).
33. Lai, J.R., Koglin, A. & Walsh, C.T. Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Biochemistry* **45**: 14869-14879 (2006).
34. Mercer, A.C. & Burkart, M.D. The ubiquitous carrier protein-a window to metabolite biosynthesis. *Nat Prod Rep* **24**: 750-773 (2007).
35. Finking, R. & Marahiel, M.A. Biosynthesis of nonribosomal peptides 1. *Annu Rev Microbiol* **58**: 453-488 (2004).
36. Weissman, K.J., Smith, C.J., Hanefeld, U., Aggarwal, R., Bycroft, M., Staunton, J. & Leadlay, P.F. Die Thioesterase der Polyketid-Synthase von Erythromycin: Einfluß der Acylkettenstruktur auf den Abkopplungsmechanismus der Substratanaloga von der Acyl-Enzym-Zwischenstufe. *Angew Chem* **110**: 4 (1998).
37. Rawlings, B.J. Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A-erythromycin biosynthesis). *Nat Prod Rep* **18**: 190-227 (2001).
38. Marti, T., Hu, Z., Pohl, N.L., Shah, A.N. & Khosla, C. Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for R1128, a non-steroidal estrogen receptor antagonist. Insights into an unusual priming mechanism. *J Biol Chem* **275**: 33443-33448 (2000).
39. Piel, J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14002-14007 (2002).
40. Katz, L. & Donadio, S. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu Rev Microbiol* **47**: 875-912 (1993).
41. Piel, J., Wen, G., Platzer, M. & Hui, D. Unprecedented diversity of catalytic domains in the first four modules of the putative pederin polyketide synthase. *Chembiochem* **5**: 93-98 (2004).
42. Hopwood, D.A. & Sherman, D.H. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet* **24**: 37-66 (1990).

43. Cheng, Y.Q., Tang, G.L. & Shen, B. Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3149-3154 (2003).
44. Butcher, R.A., Schroeder, F.C., Fischbach, M.A., Straight, P.D., Kolter, R., Walsh, C.T. & Clardy, J. The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1506-1509 (2007).
45. Moldenhauer, J., Chen, X.H., Borriss, R. & Piel, J. Biosynthesis of the antibiotic bacillaene, the product of a giant polyketide synthase complex of the *trans*-AT family. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**: 8195-8197 (2007).
46. Chen, X.H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsi, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A.W., Gottschalk, G., Süßmuth, R.D. & Borriss, R. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J Bacteriol* **188**: 4024-4036 (2006).
47. Piel, J., Hui, D., Fusetani, N. & Matsunaga, S. Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environ Microbiol* **6**: 921-927 (2004).
48. Moffitt, M.C. & Neilan, B.A. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. *J Mol Evol* **56**: 446-457 (2003).
49. Vacelet, J. & Donadey, C. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J Exp Mar Ecol* **30**: 301-314 (1977).
50. Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A.B., Wagner, M., Hacker, J. & Moore, B.S. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4431-4440 (2002).
51. Nguyen, T., Ishida, K., Jenke-Kodama, H., Dittmann, E., Gurgui, C., Hochmuth, T., Taudien, S., Platzer, M., Hertweck, C. & Piel, J. Exploiting the mosaic structure of *trans*-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection. *Nat Biotechnol* **26**: 225-233 (2008).
52. Jenke-Kodama, H., Börner, T. & Dittmann, E. Natural biocombinatorics in the polyketide synthase genes of the actinobacterium *Streptomyces avermitilis*. *PLoS Comput Biol* **2**: 1210-1218 (2006).
53. Sieber, S.A. & Marahiel, M.A. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev* **105**: 715-738 (2005).
54. Hubbard, B.K. & Walsh, C.T. Vancomycin assembly: nature's way. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 730-765 (2003).
55. Andres, N., Wolf, H., Zähler, H., Rössner, E., Zeeck, A., König, W.A. & Sinnwell, V. Hormaomycin, a novel peptide lactone with morphogenetic activity on *Streptomyces*. *Helv Chim Acta* **72**: 426-437 (1989).
56. Rössner, E., Zeeck, A. & König, W.A. Elucidation of the structure of hormaomycin. *Angew Chem Int Ed Engl* **29**: 64-65 (1990).
57. Zlatopolskiy, B.D., Loscha, K., Alvermann, P., Kozhushkov, S.I., Nikolaev, S.V., Zeeck, A. & de Meijere, A. Final elucidation of the absolute configuration of the signal metabolite hormaomycin. *Chemistry* **10**: 4708-4717 (2004).
58. Felnagle, E.A., Jackson, E.E., Chan, Y.A., Podevels, A.M., Berti, A.D., McMahon, M.D. & Thomas, M.G. Nonribosomal Peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Mol Pharm* **5**: 191-211 (2008).
59. Stachelhaus, T., Mootz, H.D. & Marahiel, M.A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**: 493-505 (1999).
60. Challis, G.L., Ravel, J. & Townsend, C.A. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol* **7**: 211-224 (2000).

61. Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. & Mootz, H.D. Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev* **97**: 2651-2674 (1997).
62. Weinig, S., Hecht, H.J., Mahmud, T. & Müller, R. Melithiazol biosynthesis: Further insights into myxobacterial PKS/NRPS systems and evidence for a new subclass of methyl transferases. *Chem Biol* **10**: 939-952 (2003).
63. Edwards, D.J., Marquez, B.L., Nogle, L.M., McPhail, K., Goeger, D.E., Roberts, M.A. & Gerwick, W.H. Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Chem Biol* **11**: 817-833 (2004).
64. Brega, A., Falaschi, A., de Carli, L. & Pavan, M. Studies on the mechanism of action of pederin. *J Cell Biol* **36**: 485-496 (1968).
65. Carrasco, L., Fernandez-Puentes, C. & Vazquez, D. Antibiotics and compounds affecting translation by eukaryotic ribosomes. Specific enhancement of aminoacyl-tRNA binding by methylaxnithines. *Mol Cell Biochem* **10**: 97-122 (1976).
66. Kellner, R.L.L. & Dettner, K. Allocation of pederin during lifetime of *Paederus* rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae): Evidence for polymorphism of hemolymph toxin. *J Chem Ecol* **21**: 1719-1733 (1995).
67. Narquizian, R. & Kocienski, P.J. The pederin family of antitumor agents: structures, synthesis and biological activity. *Ernst Schering Res Found Workshop* 25-56 (2000).
68. Cichewicz, R.H., Valeriote, F.A. & Crews, P. Psymberin, a potent sponge-derived cytotoxin from *Psammocinia* distantly related to the pederin family. *Org Lett* **6**: 1951-1954 (2004).
69. Lee, K.H., Nishimura, S., Matsunaga, S., Fusetani, N., Horinouchi, S. & Yoshida, M. Inhibition of protein synthesis and activation of stress-activated protein kinases by onnamide A and theopederin B, antitumor marine natural products. *Cancer Sci* **96**: 357-364 (2005).
70. Burres, N.S. & Clement, J.J. Antitumor activity and mechanism of action of the novel marine natural products mycalamide A and B and onnamide. *Cancer Res* **49**: 2935-2940 (1989).
71. Perry, N.B., Blunt, J.W., Munro, M.H.G. & Pannell, L.K. Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale*. *J Am Chem Soc* **110**: 4850-4851 (1988).
72. Jiang, X., Garcia-Fortanet, J. & De Brabander, J.K. Synthesis and complete stereochemical assignment of psymberin/irciniastatin A. *J Am Chem Soc* **127**: 11254-11255 (2005).
73. Kellner, R.L.L. & Dettner, K. Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. *Oecologia* **107**: 293-300 (1996).
74. Gnanaraj, P., Venugopal, V., Mozhi, M.K. & Pandurangan, C.N. An outbreak of *Paederus* dermatitis in a suburban hospital in South India: a report of 123 cases and review of literature. *J Am Acad Dermatol* **57**: 297-300 (2007).
75. Sendur, N., Savk, E. & Karaman, G. *Paederus* dermatitis: a report of 46 cases in Aydin, Turkey. *Dermatology* **199**: 353-355 (1999).
76. Norton, S.A. & Lyons, C. Blister beetles and the ten plagues. *Lancet* **359**: 1950 (2002).
77. Kellner, R.L. Suppression of pederin biosynthesis through antibiotic elimination of endosymbionts in *Paederus sabaesus*. *J Insect Physiol* **47**: 475-483 (2001).
78. Kellner, R.L. Horizontal transmission of biosynthetic capabilities for pederin in *Paederus melanurus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Chemoecology* **11**: 127-130 (2001).
79. Kellner, R.L. Molecular identification of an endosymbiotic bacterium associated with pederin biosynthesis in *Paederus sabaesus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 389-395 (2002).

80. Piel, J., Höfer, I. & Hui, D. Evidence for a symbiosis island involved in horizontal acquisition of pederin biosynthetic capabilities by the bacterial symbiont of *Paederus fuscipes* beetles. *J Bacteriol* **186**: 1280-1286 (2004).
81. Lopanik, N.B., Targett, N.M. & Lindquist, N. Isolation of two polyketide synthase gene fragments from the uncultured microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7941-7944 (2006).
82. Lim, G.E. & Haygood, M.G. "*Candidatus* Endobugula glebosa," a specific bacterial symbiont of the marine bryozoan *Bugula simplex*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4921-4929 (2004).
83. Pavan, M. & Bo, G. Ricerche sulla differenziabilità, natura e attività del principio tossico di *Paederus fuscipes* Curt. (*Col. Staph.*). *Mem soc entomol ital* **31**: 67-82 (1952).
84. Jewett, J.C. & Rawal, V.H. Total synthesis of pederin. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**: 6502-6504 (2007).
85. Cheng, Y.Q., Tang, G.L. & Shen, B. Identification and localization of the gene cluster encoding biosynthesis of the antitumor macrolactam leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140. *J Bacteriol* **184**: 7013-7024 (2002).
86. Gu, L., Geders, T.W., Wang, B., Gerwick, W.H., Hakansson, K., Smith, J.L. & Sherman, D.H. GNAT-like strategy for polyketide chain initiation. *Science* **318**: 970-974 (2007).
87. Simunovic, V., Zapp, J., Rachid, S., Krug, D., Meiser, P. & Müller, R. Myxovirescin A biosynthesis is directed by hybrid polyketide synthases/nonribosomal peptide synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthases, and *trans*-acting acyltransferases. *Chembiochem* **7**: 1206-1220 (2006).
88. Chun, K.Y., Vinarov, D.A. & Mizioro, H.M. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: participation of invariant acidic residues in formation of the acetyl-S-enzyme reaction intermediate. *Biochemistry* **39**: 14670-14681 (2000).
89. Holden, H.M., Benning, M.M., Haller, T. & Gerlt, J.A. The crotonase superfamily: divergently related enzymes that catalyze different reactions involving acyl coenzyme a thioesters. *Acc Chem Res* **34**: 145-157 (2001).
90. Haapalainen, A.M., Merilainen, G. & Wierenga, R.K. The thiolase superfamily: condensing enzymes with diverse reaction specificities. *Trends Biochem Sci* **31**: 64-71 (2006).
91. Calderone, C.T., Kowtoniuk, W.E., Kelleher, N.L., Walsh, C.T. & Dorrestein, P.C. Convergence of isoprene and polyketide biosynthetic machinery: isoprenyl-S-carrier proteins in the *pksX* pathway of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8977-8982 (2006).
92. Gu, L., Jia, J., Liu, H., Hakansson, K., Gerwick, W.H. & Sherman, D.H. Metabolic coupling of dehydration and decarboxylation in the curacin A pathway: functional identification of a mechanistically diverse enzyme pair. *J Am Chem Soc* **128**: 9014-9015 (2006).
93. Witkowski, A., Joshi, A.K. & Smith, S. Mechanism of the beta-ketoacyl synthase reaction catalyzed by the animal fatty acid synthase. *Biochemistry* **41**: 10877-10887 (2002).
94. Miller, D.A., Walsh, C.T. & Luo, L. C-methyltransferase and cyclization domain activity at the intraprotein PK/NRP switch point of yersiniabactin synthetase. *J Am Chem Soc* **123**: 8434-8435 (2001).
95. Molnar, I., Schupp, T., Ono, M., Zirkle, R., Milnamow, M., Nowak-Thompson, B., Engel, N., Toupet, C., Stratmann, A., Cyr, D.D., Grolach, J., Mayo, J.M., Hu, A., Goff, S., Schmid, J. & Ligon, J.M. The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chem Biol* **7**: 97-109 (2000).
96. Woo, A.J., Strohl, W.R. & Priestley, N.D. Nonactin biosynthesis: the product of *nonS* catalyzes the formation of the furan ring of nonactic acid. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1662-1668 (1999).

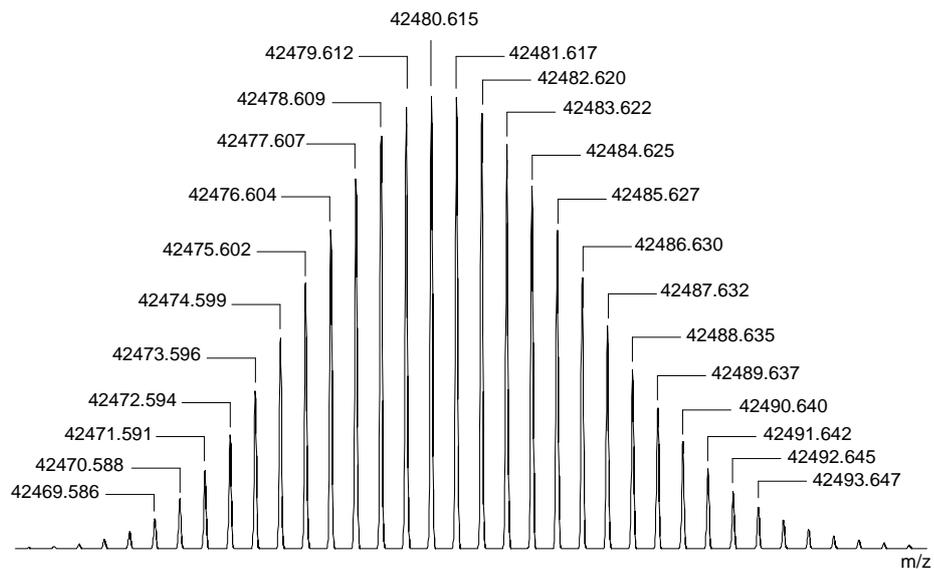
97. Piel, J. Combinatorial biosynthesis in symbiotic bacteria. *Nat Chem Biol* **2**: 661-662 (2006).
98. Schmidt, E.W., Nelson, J.T., Rasko, D.A., Sudek, S., Eisen, J.A., Haygood, M.G. & Ravel, J. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7315-7320 (2005).
99. Long, P.F., Dunlap, W.C., Battershill, C.N. & Jaspars, M. Shotgun cloning and heterologous expression of the patellamide gene cluster as a strategy to achieving sustained metabolite production. *Chembiochem* **6**: 1760-1765 (2005).
100. Nakano, M.M., Corbell, N., Besson, J. & Zuber, P. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **232**: 313-321 (1992).
101. Sanchez, C., Du, L., Edwards, D.J., Toney, M.D. & Shen, B. Cloning and characterization of a phosphopantetheinyl transferase from *Streptomyces verticillus* ATCC15003, the producer of the hybrid peptide-polyketide antitumor drug bleomycin. *Chem Biol* **8**: 725-738 (2001).
102. Shen, B., Summers, R.G., Gramajo, H., Bibb, M.J. & Hutchinson, C.R. Purification and characterization of the acyl carrier protein of the *Streptomyces glaucescens* tetracenomycin C polyketide synthase. *J Bacteriol* **174**: 3818-3821 (1992).
103. Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C. & Walsh, C.T. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **3**: 923-936 (1996).
104. Revill, W.P. & Leadlay, P.F. Cloning, characterization, and high-level expression in *Escherichia coli* of the *Saccharopolyspora erythraea* gene encoding an acyl carrier protein potentially involved in fatty acid biosynthesis. *J Bacteriol* **173**: 4379-4385 (1991).
105. Kutchma, A.J., Hoang, T.T. & Schweizer, H.P. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid biosynthetic gene cluster: purification of acyl carrier protein (ACP) and malonyl-coenzyme A:ACP transacylase (FabD). *J Bacteriol* **181**: 5498-5504 (1999).
106. Yin, D., Cui, D. & Jia, B. Construction of a high-efficient expression vector of Delta12 fatty acid desaturase in peanut and its prokaryotical expression. *J Genet Genomics* **34**: 81-88 (2007).
107. Rodriguez, M.A., Garcia-Perez, R.M., Mendoza, L., Sanchez, T., Guillen, N. & Orozco, E. The pyruvate:ferredoxin oxidoreductase enzyme is located in the plasma membrane and in a cytoplasmic structure in *Entamoeba*. *Microb Pathog* **25**: 1-10 (1998).
108. Nagai, K., Perutz, M.F. & Poyart, C. Oxygen binding properties of human mutant hemoglobins synthesized in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 7252-7255 (1985).
109. Holland, I.B., Kenny, B., Steipe, B. & Pluckthun, A. Secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **182**: 132-143 (1990).
110. Lohmann, K.K. Beiträge zur Glykobioinformatik: Entwicklung von Software-Werkzeugen für die Glykobiologie. Dissertation. Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät, Heidelberg (2003).
111. Keating, T.A., Suo, Z., Ehmman, D.E. & Walsh, C.T. Selectivity of the yersiniabactin synthetase adenylation domain in the two-step process of amino acid activation and transfer to a *holo*-carrier protein domain. *Biochemistry* **39**: 2297-2306 (2000).
112. La Clair, J.J., Foley, T.L., Schegg, T.R., Regan, C.M. & Burkart, M.D. Manipulation of carrier proteins in antibiotic biosynthesis. *Chem Biol* **11**: 195-201 (2004).

113. Louis, J.M., McDonald, R.A., Nashed, N.T., Wondrak, E.M., Jerina, D.M., Oroszlan, S. & Mora, P.T. Autoprocessing of the HIV-1 protease using purified wild-type and mutated fusion proteins expressed at high levels in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **199**: 361-369 (1991).
114. Sachdev, D. & Chirgwin, J.M. Order of fusions between bacterial and mammalian proteins can determine solubility in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **244**: 933-937 (1998).
115. Saavedra-Alanis, V.M., Rysavy, P., Rosenberg, L.E. & Kalousek, F. Rat liver mitochondrial processing peptidase. Both alpha- and beta-subunits are required for activity. *J Biol Chem* **269**: 9284-9288 (1994).
116. Fritzler, J.M. & Zhu, G. Functional characterization of the acyl-[acyl carrier protein] ligase in the *Cryptosporidium parvum* giant polyketide synthase. *Int J Parasitol* **37**: 307-316 (2007).
117. Cai, X., Herschap, D. & Zhu, G. Functional characterization of an evolutionarily distinct phosphopantetheinyl transferase in the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. *Eukaryot Cell* **4**: 1211-1220 (2005).
118. Kapust, R.B. & Waugh, D.S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* **8**: 1668-1674 (1999).
119. Mootz, H.D., Finking, R. & Marahiel, M.A. 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **276**: 37289-37298 (2001).
120. Mofid, M.R., Marahiel, M.A., Ficner, R. & Reuter, K. Crystallization and preliminary crystallographic studies of Sfp: a phosphopantetheinyl transferase of modular peptide synthetases. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **55**: 1098-1100 (1999).
121. Tang, G.L., Cheng, Y.Q. & Shen, B. Polyketide chain skipping mechanism in the biosynthesis of the hybrid nonribosomal peptide-polyketide antitumor antibiotic leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140. *J Nat Prod* **69**: 387-393 (2006).
122. Liu, Q., Ma, Y., Zhou, L. & Zhang, Y. Gene cloning, expression and functional characterization of an acyl carrier protein AcpV from *Vibrio anguillarum*. *Arch Microbiol* **185**: 159-163 (2006).
123. Marston, F.A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J* **240**: 1-12 (1986).
124. Han, L., Lobo, S. & Reynolds, K.A. Characterization of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from *Streptomyces glaucescens* and its role in initiation of fatty acid biosynthesis. *J Bacteriol* **180**: 4481-4486 (1998).
125. Liu, W., Han, C., Hu, L., Chen, K., Shen, X. & Jiang, H. Characterization and inhibitor discovery of one novel malonyl-CoA: acyl carrier protein transacylase (MCAT) from *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett* **580**: 697-702 (2006).
126. Ma, Y., Smith, L.H., Cox, R.J., Beltran-Alvarez, P., Arthur, C.J. & Simpson, F.R.S.T. Catalytic relationships between type I and type II iterative polyketide synthases: The *Aspergillus parasiticus* norsolorinic acid synthase. *Chembiochem* **7**: 1951-1958 (2006).
127. Conseil, V., Soete, M. & Dubremetz, J.F. Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1358-1361 (1999).
128. Recktenwald, J., Shawky, R., Puk, O., Pfennig, F., Keller, U., Wohlleben, W. & Pelzer, S. Nonribosomal biosynthesis of vancomycin-type antibiotics: a heptapeptide backbone and eight peptide synthetase modules. *Microbiology* **148**: 1105-1118 (2002).
129. Moldenhauer, J. Synthese von Polyketidvorstufen zum Studium der Pederinbiosynthese. Diplomarbeit. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Bonn (2006).
130. Liou, G.F., Lau, J., Cane, D.E. & Khosla, C. Quantitative analysis of loading and extender acyltransferases of modular polyketide synthases. *Biochemistry* **42**: 200-207 (2003).

131. Wu, J., Hothersall, J., Mazzetti, C., O'Connell, Y., Shields, J.A., Rahman, A.S., Cox, R.J., Crosby, J., Simpson, T.J., Thomas, C.M. & Willis, C.L. *In vivo* mutational analysis of the mupirocin gene cluster reveals labile points in the biosynthetic pathway: the "leaky hosepipe" mechanism. *Chembiochem* **9**: 1-10 (2008).
132. Dorrestein, P.C. & Kelleher, N.L. Dissecting non-ribosomal and polyketide biosynthetic machineries using electrospray ionization Fourier-Transform mass spectrometry. *Nat Prod Rep* **23**: 893-918 (2006).
133. Smith, S. & Tsai, S.C. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat Prod Rep* **24**: 1041-1072 (2007).
134. Beltran-Alvarez, P., Cox, R.J., Crosby, J. & Simpson, T.J. Dissecting the component reactions catalyzed by the actinorhodin minimal polyketide synthase. *Biochemistry* **46**: 14672-14681 (2007).
135. Misra, A., Sharma, S.K., Surolia, N. & Surolia, A. Self-acylation properties of type II fatty acid biosynthesis acyl carrier protein. *Chem Biol* **14**: 775-783 (2007).
136. Arthur, C.J., Szafranska, A., Evans, S.E., Findlow, S.C., Burston, S.G., Owen, P., Clark-Lewis, I., Simpson, T.J., Crosby, J. & Crump, M.P. Self-malonylation is an intrinsic property of a chemically synthesized type II polyketide synthase acyl carrier protein. *Biochemistry* **44**: 15414-15421 (2005).
137. Molnos, J., Gardiner, R., Dale, G.E. & Lange, R. A continuous coupled enzyme assay for bacterial malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase (FabD). *Anal Biochem* **319**: 171-176 (2003).
138. Perry, N.B., Blunt, J.W., Munro, M.H.G. & Thompson, A.M. Antiviral and antitumor agents from a New Zealand sponge, *Mycale* sp. 2. Structures and solution conformations of mycalamide A and mycalamide B. *J Org Chem* **55**: 223-227 (1990).
139. Page, M.J., Northcote, P.T., Webb, V.L., Mackey, S. & Handley, S.J. Aquaculture trials for the production of biologically active metabolites in the New Zealand sponge *Mycale hentscheli* (Demospongiae : Poecilosclerida). *Aquaculture* **250**: 256-269 (2005).
140. Thompson, A.M., Blunt, J.W., Munro, M.H.G., Perry, N.B. & Pannell, L.K. Chemistry of the mycalamides, antiviral and antitumor compounds from a marine sponge. 3. Acyl, alkyl and silyl derivatives. *J Chem Soc Perkin Trans I* 1335-1342 (1992).
141. Kocienski, P.J. Protecting groups. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (2005).
142. Thompson, A.M., Blunt, J.W., Munro, M.H.G. & Perry, N.B. Chemistry of the mycalamides, antiviral and antitumor compounds from a marine sponge. 5. Acid-catalyzed hydrolysis and acetal exchange, double-bond additions and oxidation reactions. *J Chem Soc Perkin Trans I* 1233-1242 (1995).
143. Zhang, C., Weller, R.L., Thorson, J.S. & Rajski, S.R. Natural product diversification using a non-natural cofactor analogue of *S*-adenosyl-L-methionine. *J Am Chem Soc* **128**: 2760-2761 (2006).
144. Sambrook, J. & Russell, D.W. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001).
145. Jez, J.M., Ferrer, J.L., Bowman, M.E., Dixon, R.A. & Noel, J.P. Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **39**: 890-902 (2000).
146. Izumikawa, M., Cheng, Q. & Moore, B.S. Priming type II polyketide synthases via a type II nonribosomal peptide synthetase mechanism. *J Am Chem Soc* **128**: 1428-1429 (2006).
147. Mortimer, C.E. Chemie - Das Basiswissen der Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1996).
148. Bhatia, A.V., Chaudhary, S.K. & Hernandez, O. 4-dimethylamino-*N*-triphenylmethylpyridinium chloride. *Org Synth* **75**: 184-188 (1998).

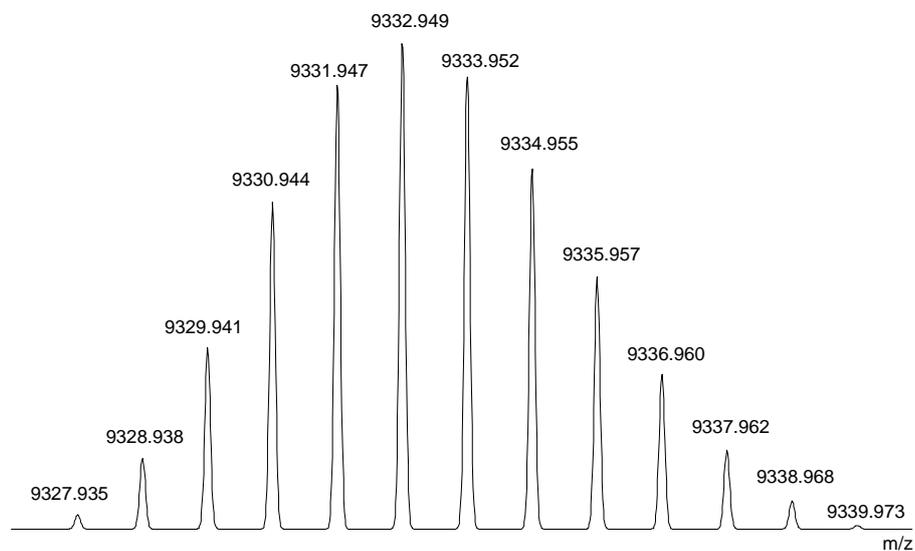
9. Anhang

(a)

Summenformel: $C_{1916}H_{2962}N_{496}O_{582}S_7$

(entspricht MBP aus pMAL-c2X nach Spaltung mit Faktor Xa)

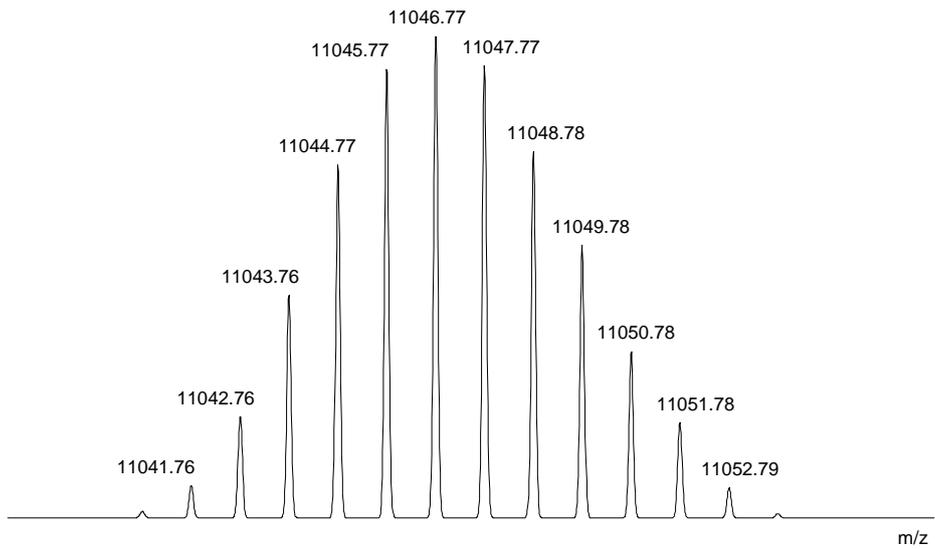
(b)

Summenformel: $C_{420}H_{677}N_{109}O_{126}S_2$ (entspricht *apo*-PedI2 aus pMAL-c2X nach Spaltung mit Faktor Xa)**Abb. A.1:** Theoretische Isotopenspektren von PedI2 und MBP.(a) Isotopenspektrum der Summenformel $C_{1916}H_{2962}N_{496}O_{582}S_7$

(entspricht MBP aus pMAL-c2X nach Spaltung des Fusionsproteins mit Faktor Xa)

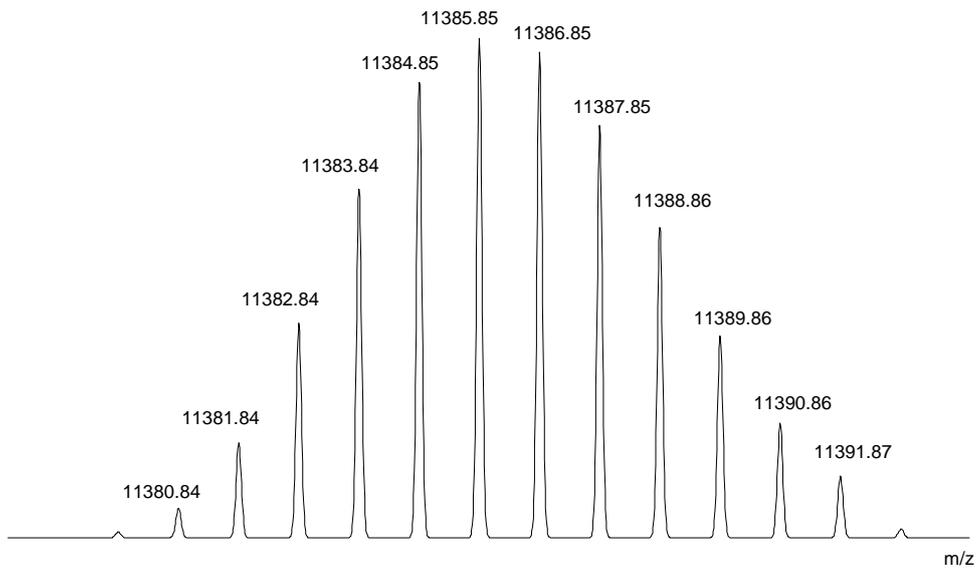
(b) Isotopenspektrum der Summenformel $C_{420}H_{677}N_{109}O_{126}S_2$ (entspricht *apo*-PedI2 aus pKZ81-1 (Tab. 6.9) nach Spaltung des Fusionsproteins mit Faktor Xa)

(a)



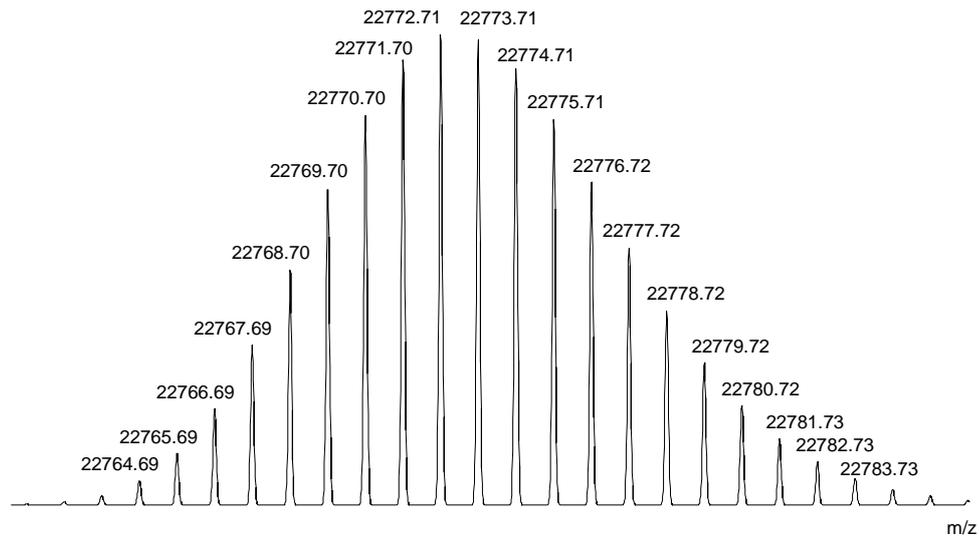
Summenformel: $C_{486}H_{785}N_{143}O_{145}S_3$
 (entspricht *apo*-PedN aus pHIS8-3)

(b)



Summenformel: $C_{497}H_{805}N_{145}O_{151}S_4P$
 (entspricht *holo*-PedN aus pHIS8-3 *svp*)

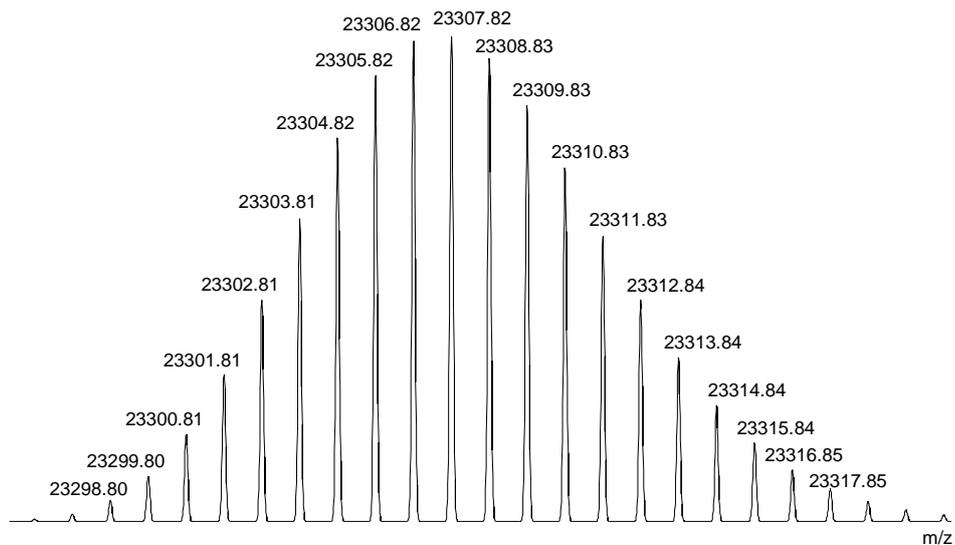
(c)



Summenformel: $C_{994}H_{1610}N_{290}O_{302}S_8P_2$

(entspricht *holo*-PedN-Dimer aus pHIS8-3 *svp*)

(d)



Summenformel: $C_{1036}H_{1632}N_{278}O_{317}S_6P_2$

(entspricht *holo*-PedI3 aus pHIS8-3 *svp*)

Abb. A.2: Theoretische Isotopenspektren der ACP.

- (a) Isotopenspektrum der Summenformel $C_{486}H_{785}N_{143}O_{145}S_3$
(entspricht *apo*-PedN aus pKZ161-1, Tab. 6.9)
- (b) Isotopenspektrum der Summenformel $C_{497}H_{805}N_{145}O_{151}S_4P$
(entspricht *holo*-PedN aus pKZ124-17, Tab. 6.9)
- (c) Isotopenspektrum der Summenformel $C_{994}H_{1610}N_{290}O_{302}S_8P_2$
(entspricht *holo*-PedN-Dimer aus pKZ124-17, Tab. 6.9)
- (d) Isotopenspektrum der Summenformel $C_{1036}H_{1632}N_{278}O_{317}S_6P_2$
(entspricht *holo*-PedI3 aus pKZ123-19, Tab. 6.9)

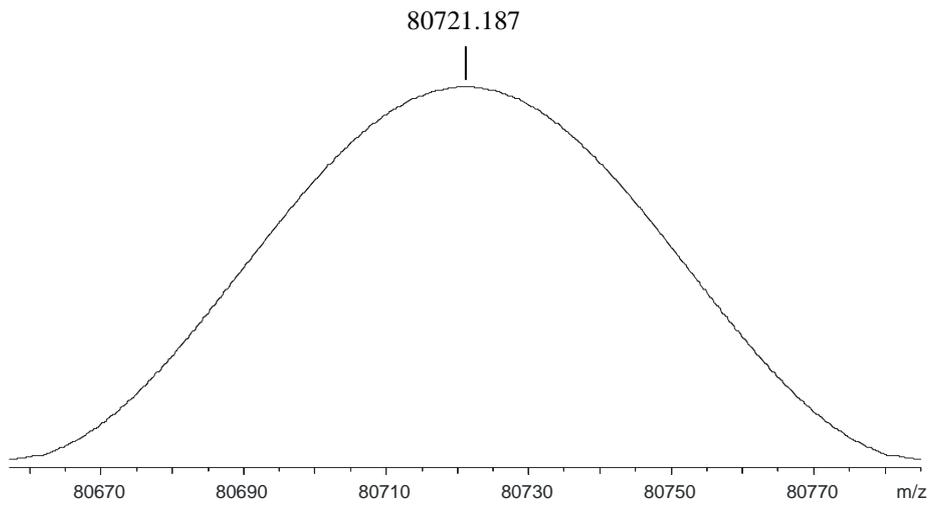
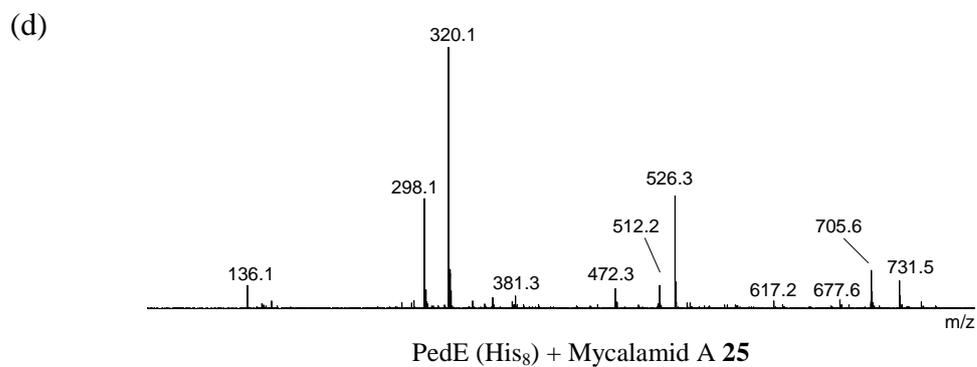
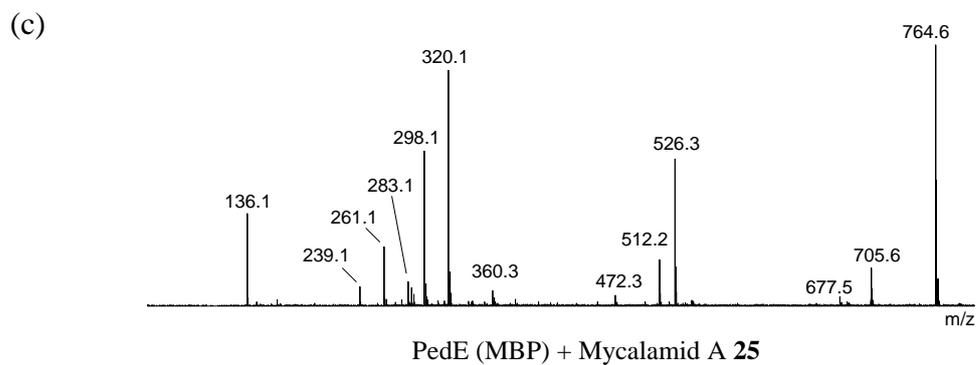
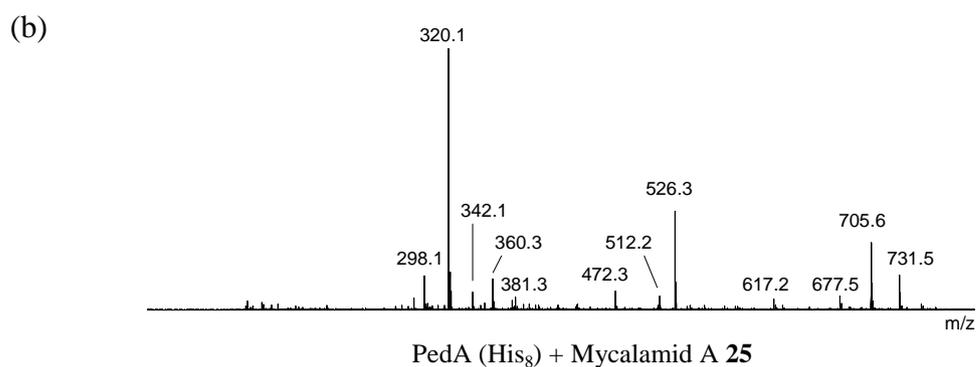
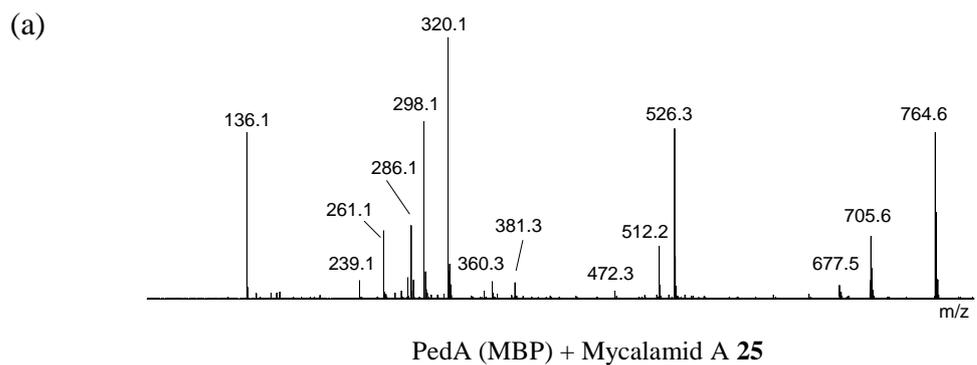


Abb. A.3: Theoretisches Massenspektrum der *O*-MT PedO.

Massenspektrum der Summenformel $C_{3621}H_{5581}N_{953}O_{1103}S_{19}$
(entspricht Fusionsprotein MBP-PedO aus pKZ158-1, Tab. 6.9)

Die Auflösung entspricht der auch für die Messung der Proteinprobe verwendeten.



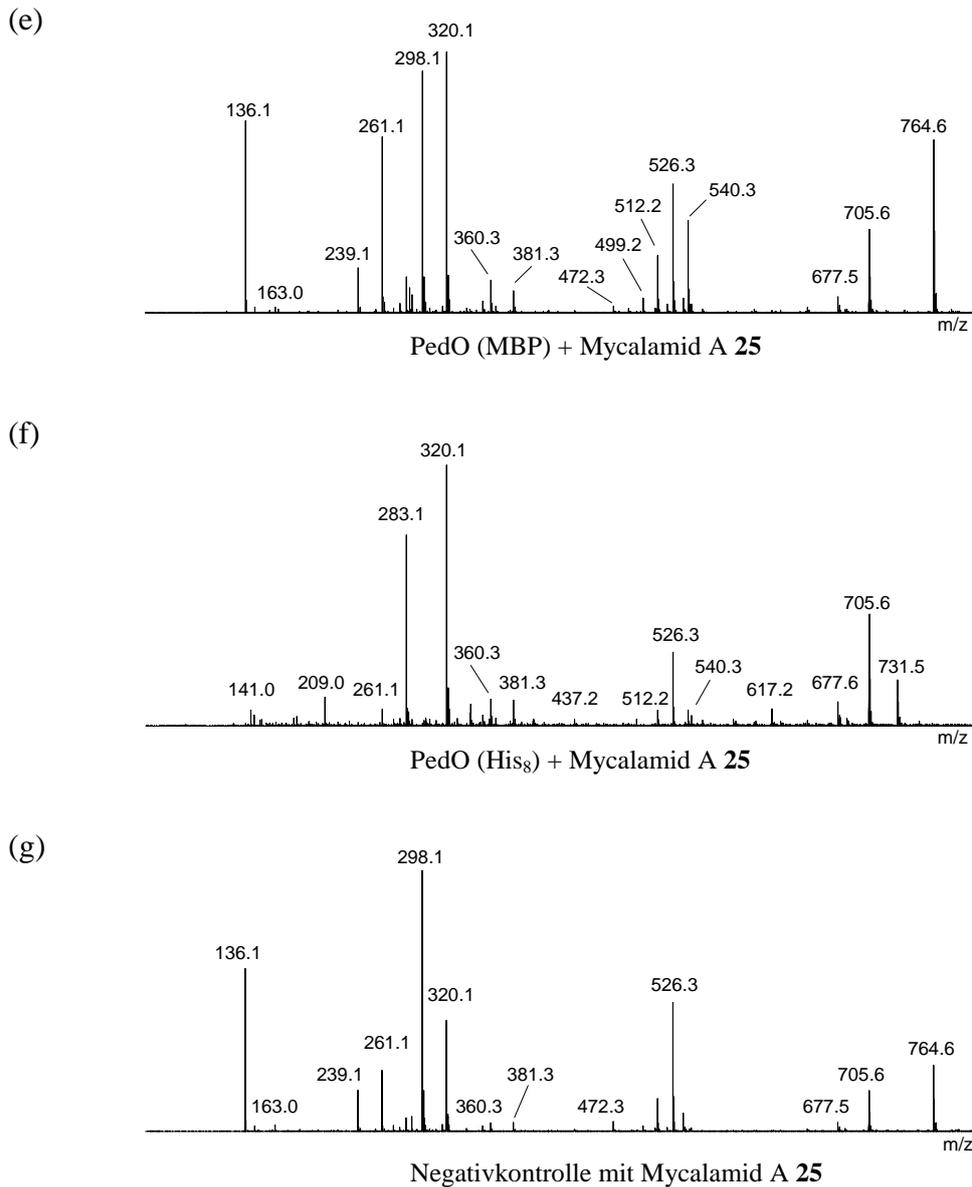
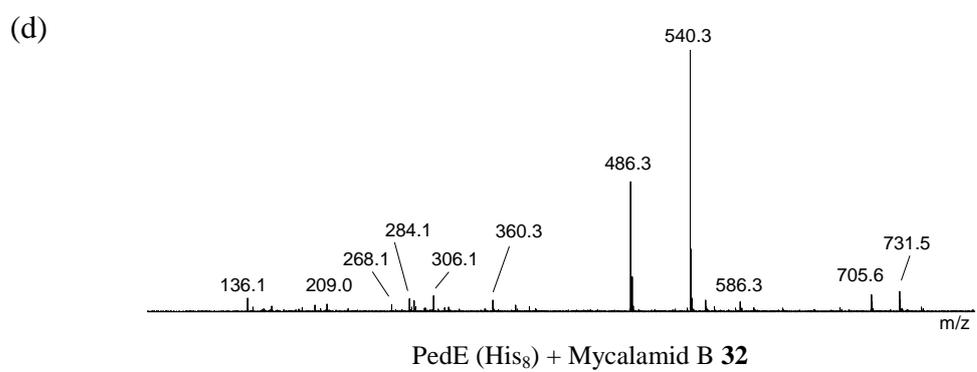
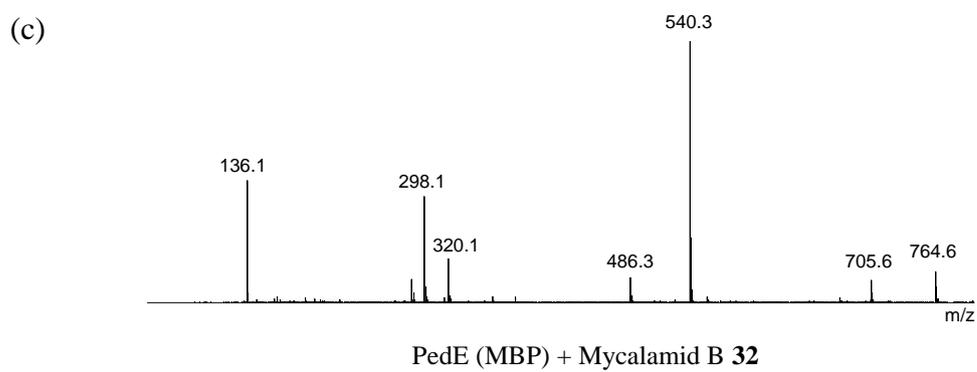
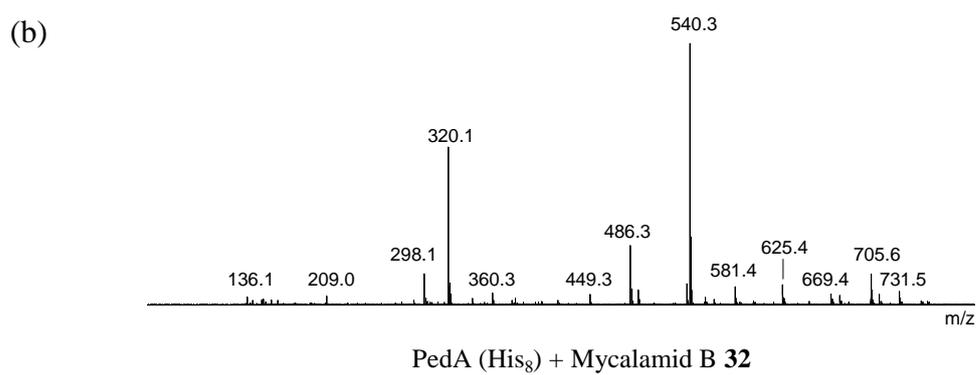
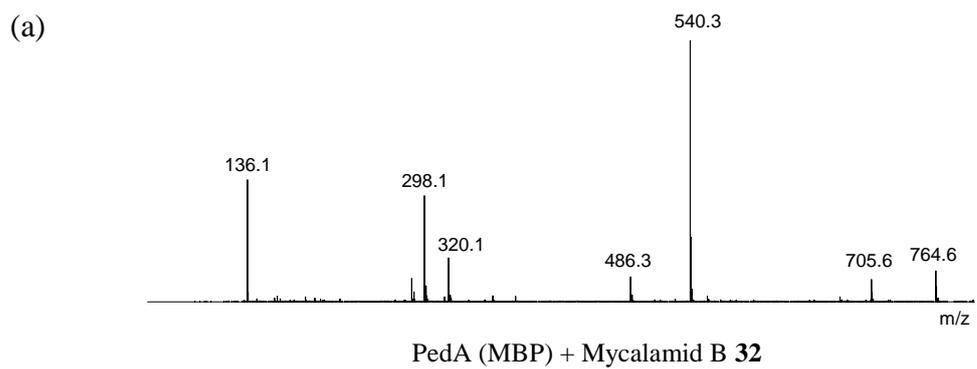


Abb. A.4: Massenspektren der *O*-MT-Assays mit Mycalamid A.

- (a) MBP-PedA + Mycalamid A 25 (Enzym aus pKZ96-1 / *E. coli* ER2566)
 (b) His₈-PedA + Mycalamid A 25 (Enzym aus pKZ179-1 / *E. coli* BL21 DE3)
 (c) MBP-PedE + Mycalamid A 25 (Enzym aus pKZ100-1 / *E. coli* ER2566)
 (d) His₈-PedE + Mycalamid A 25 (Enzym aus pKZ181-3 / *E. coli* BL21 DE3)
 (e) MBP-PedO + Mycalamid A 25 (Enzym aus pKZ158-1 / *E. coli* ER2566)
 (f) His₈-PedO + Mycalamid A 25 (Enzym aus pKZ182-1 / *E. coli* BL21 DE3)
 (g) Negativkontrolle mit Mycalamid A 25

Die Durchführung des Assays erfolgte entsprechend 6.17.3 mit 100 µl des MBP-Fusionsproteins (Elutionsfraktion e1) und 50 µl Mycalamid A 25 (200 µM) bzw. 400 µl des His₈-Fusionsproteins (Elutionsfraktion mit 100 mM Imidazol) und 50 µl Mycalamid A 25 (200 µM). Die organische Phase wurde anschließend mittels ESI-microQ-TOF-MS gemessen. Expressionsbedingungen: pKZ96-1 / *E. coli* ER2566: 200 ml RM Amp¹⁰⁰, 0,5 mM IPTG, 16 °C, 15 h; pKZ179-1 / *E. coli* BL21 DE3: 200 ml LB Kn⁵⁰, 0,2 mM IPTG, 16 °C, 24 h; pKZ100-1 / *E. coli* ER2566: 200 ml RM Amp¹⁰⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 15 h; pKZ181-3 / *E. coli* BL21 DE3: 300 ml LB Kn⁵⁰, 0,1 mM IPTG, 16 °C, 24 h; pKZ158-1 / *E. coli* ER2566: 200 ml RM Amp¹⁰⁰, 1 mM IPTG, 16 °C, 15 h; pKZ182-1 / *E. coli* BL21 DE3: 200 ml LB Kn⁵⁰, 0,2 mM IPTG, 16 °C, 24 h; Expression nach 6.13, Aufreinigung nach 6.13.1.1 bzw. 6.13.2 mit Lysepuffer II



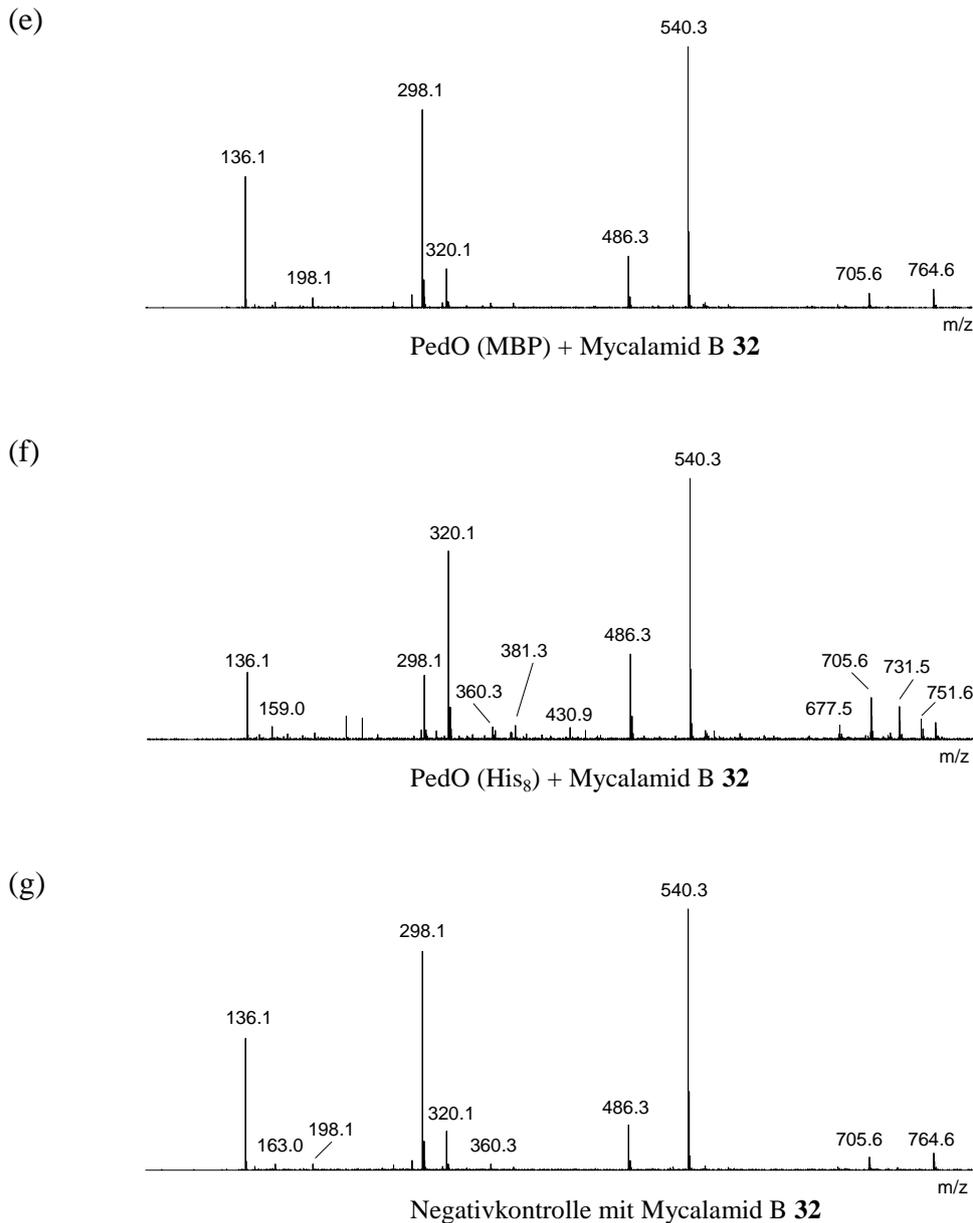


Abb. A.5: Massenspektren der *O*-MT-Assays mit Mycalamid B.

- (a) MBP-PedA + Mycalamid B 32 (Enzym aus pKZ96-1 / *E. coli* ER2566)
- (b) His₈-PedA + Mycalamid B 32 (Enzym aus pKZ179-1 / *E. coli* BL21 DE3)
- (c) MBP-PedE + Mycalamid B 32 (Enzym aus pKZ100-1 / *E. coli* ER2566)
- (d) His₈-PedE + Mycalamid B 32 (Enzym aus pKZ181-3 / *E. coli* BL21 DE3)
- (e) MBP-PedO + Mycalamid B 32 (Enzym aus pKZ158-1 / *E. coli* ER2566)
- (f) His₈-PedO + Mycalamid B 32 (Enzym aus pKZ182-1 / *E. coli* BL21 DE3)
- (g) Negativkontrolle mit Mycalamid B 32

Die Durchführung des Assays erfolgte entsprechend 6.17.3 mit 100 μ l des MBP-Fusionsproteins (Elutionsfraktion e1) und 50 μ l Mycalamid B 32 (200 μ M) bzw. 400 μ l des His₈-Fusionsproteins (Elutionsfraktion mit 50 mM Imidazol bei pKZ181-3, mit 150 mM Imidazol bei pKZ179-1 und pKZ182-1) und 50 μ l Mycalamid B 32 (200 μ M). Die organische Phase wurde anschließend mittels ESI-microOQ-TOF-MS gemessen. Expressionsbedingungen: s. Abb. A.4

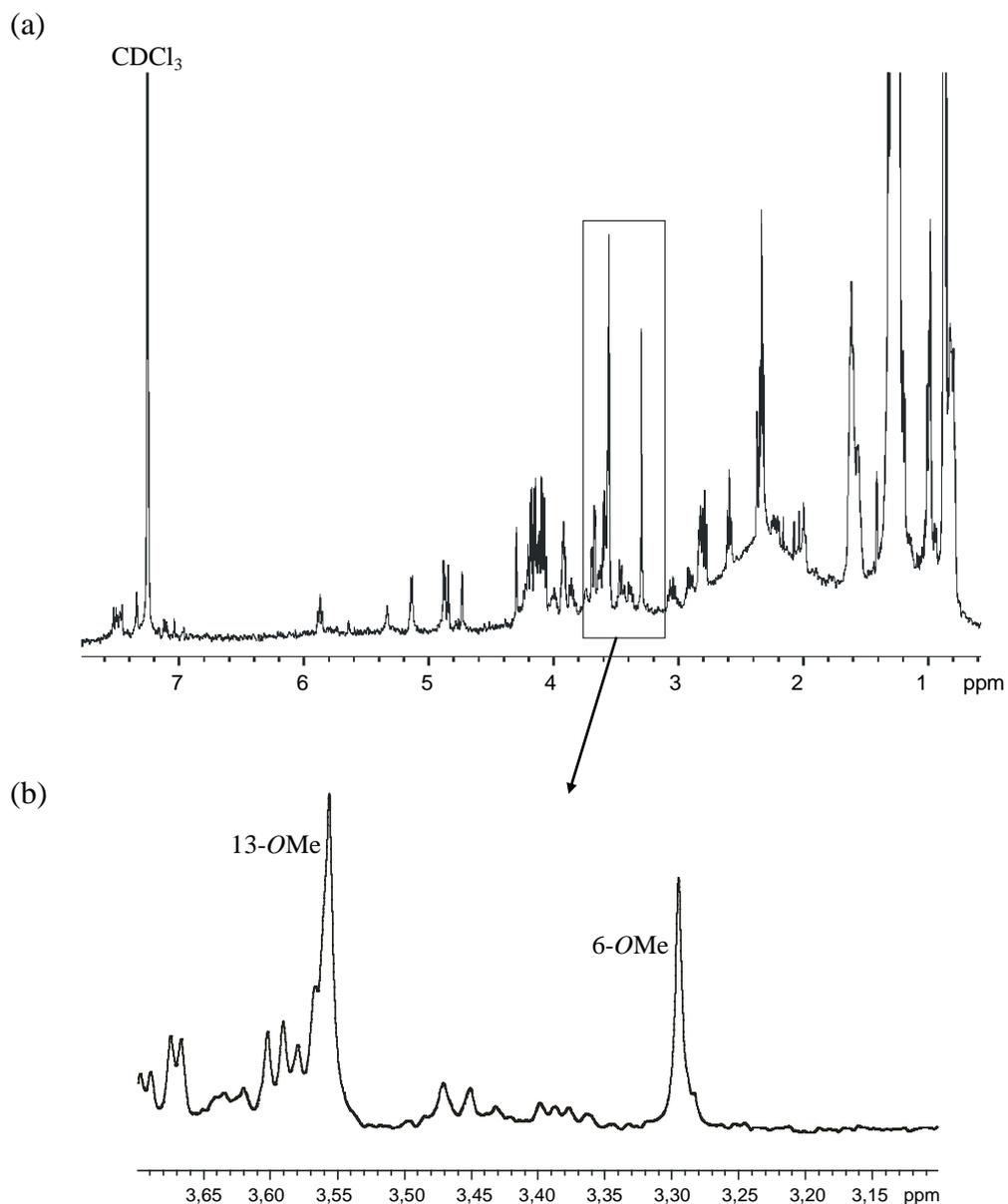


Abb. A.6: ¹H-NMR von Mycalamid A.

(a) Übersichtsspektrum ¹H-NMR von Mycalamid A 25

(b) Ausschnitt aus ¹H-NMR-Spektrum von Mycalamid A 25

Mit Mycalamid A 25 wurde der *O*-Methylierungsassay als Negativkontrolle ohne Enzym entsprechend 6.17.6 durchgeführt und ein ¹H-NMR-Spektrum angefertigt. Die Probe wurde in CDCl₃ gemessen und die relative chemische Verschiebung gegen δ_H (CHCl₃) 7,25 aufgenommen.

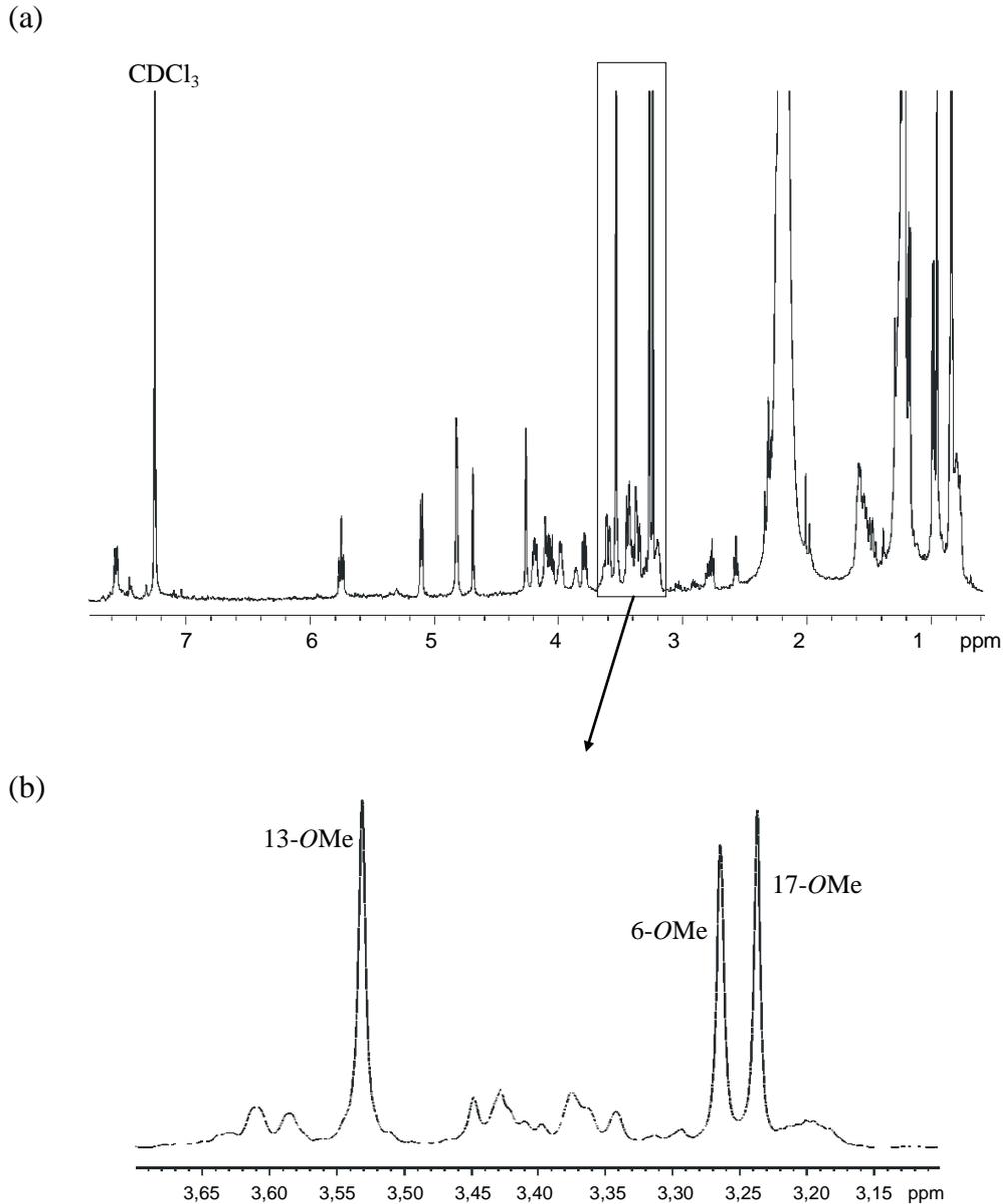


Abb. A.7: $^1\text{H-NMR}$ von Mycalamid B.

(a) Übersichtsspektrum $^1\text{H-NMR}$ von Mycalamid B **32**

(b) Ausschnitt aus $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Mycalamid B **32**

Mit Mycalamid B **32** wurde der *O*-Methylierungsassay als Negativkontrolle ohne Enzym entsprechend 6.17.6 durchgeführt und ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum angefertigt. Die Probe wurde in CDCl_3 gemessen und die relative chemische Verschiebung gegen δ_{H} (CHCl_3) 7,25 aufgenommen.

10. Publikationen

Posterpräsentation

International meeting on the biology of bacteria producing natural compounds

26.-28. September 2004, Jena

Thema: "Expression of pederin biosynthesis enzymes from an uncultivated symbiont"

Veröffentlichungen

Fieseler L, Hentschel U, Grozdanov L, Schirmer A, Wen G, Platzer M, Hrvatin S, Butzke D, Zimmermann K, Piel J. Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges. *Appl Environ Microbiol.* 2007, 73(7): 2144-55.

Zimmermann K, Blunt J, Munro M, Piel J. Analysis of methoxy group biosynthesis in pederin-type polyketides from uncultivated bacterial symbionts. (in Arbeit)

Zimmermann K, Niederkrüger H, Chang H, Engeser M, Piel J. Acyltransferase-acyl carrier protein interactions in the pederin *trans*-AT polyketide synthase. (in Arbeit)

11. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die eingereichte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen benutzt zu haben.

Diese Arbeit ist weder identisch noch teildentisch mit einer Arbeit, die an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn oder einer anderen Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades oder als Prüfungsleistung vorgelegt worden ist.

Die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn ist mir bekannt.

Katrin Zimmermann

Bornheim, den 03.06.2008