

Expressionssysteme zur Untersuchung der Pederin- und Psymberin-Biosynthese aus nicht kultivierten bakteriellen 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-Biotechnologe (Dipl.-Biotech.)

Holger Niederkrüger

aus Detmold

Bonn, 2010

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 König

Tag der Doktorprüfung: 17.12.2010

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.12.2010

Erscheinungsjahr: 2011

Für meine Eltern und Julia

1	Zusammenfassung	1
2	Abstract	5
3	Einleitung	9
3.1	Polyketide	9
3.2	Biosynthese von Polyketiden	11
3.3	Einteilung von PKS.....	14
3.3.1	Modulare <i>trans</i> -AT Typ I-PKS.....	17
3.3.2	NRPS-PKS-Hybride	21
3.4	Substanzen der Pederinfamilie	23
3.4.1	Pederin und dessen Biosynthese.....	24
3.4.2	Psymberin und dessen Biosynthese	28
3.4.3	Ungewöhnliche Biosyntheseschritte der Pederin- und Psymberin-Biosynthese	29
3.5	Aufklärung von Biosyntheseschritten <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	31
3.5.1	Proteinexpression von Polyketidsynthasen zur <i>in vitro</i> -Analyse	31
3.5.2	Heterologe Expression von PKS-Clustern	34
3.6	Suche nach neuen Naturstoffen, kombinatorische Biosynthese und biotechnologische Nutzung	35
4	Zielsetzung	39
5	Ergebnisse und Diskussion	43
5.1	Expression und <i>in-vitro</i> -Studien von Polyketidsynthaseenzymen.....	43
5.1.1	Untersuchung von posttranslationalen Modifikationen von ACP.....	43
5.1.1.1	Klonierung des Moduls <i>pedI3</i>	43
5.1.1.2	Klonierungen zur Fusion des <i>pedF</i> -Linkers sowie der Linker <i>eryA</i> _{1,2} mit <i>pedI3</i>	47
5.1.1.3	Klonierung von <i>psyA</i> -ACP ₃ und der <i>psyD</i> -ACP ₁	51
5.1.1.4	Entfernung der <i>svp</i> aus den Expressionsplasmide	53
5.1.1.5	Zusammenfassende Übersicht der Expressionsplasmide zur ACP-Analyse ...	54
5.1.1.6	Expression von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten	54
5.1.1.7	Expression von PsyA-ACP ₃ und PsyD-ACP ₁	61
5.1.1.8	Analytik der posttranslationalen Modifikation	63
5.1.2	Substratbeladung und Substratspezifität durch <i>trans</i> -AT von ACPs	70
5.1.2.1	Expression der Enzyme	71
5.1.2.2	Enzymassays mit ¹⁴ C-Malonyl-CoA und ¹⁴ C-Acetyl-CoA	75
5.1.3	Kinetische Untersuchungen von PedD	83
5.1.4	β-Verzweigungen	92
5.1.4.1	Klonierung von <i>pedI3</i> , <i>pedL</i> , <i>pedN</i> , <i>pedM</i> und <i>pedP</i>	95
5.1.4.2	Expression von PedI3 und den akzessorischen Proteinen PedL, PedN, PedM und PedP	96
5.1.5	α-Hydroxylierungen	99
5.1.5.1	Klonierung von PsyC und PsyK.....	101

5.1.5.2	Expression von PsyC und PsyK.....	103
5.1.5.3	α -Hydroxylierungsassays	105
5.1.5.4	Fe(II)-Nachweis an PsyC.....	109
5.1.6	β -Methoxylierungen	113
5.1.6.1	Klonierung der PsyD O-MT	114
5.1.6.2	Expression von PsyD O-MT	115
5.1.6.3	O-Methoxylierungsassay	115
5.1.7	Formulierung einer Proteinexpressionsstrategie für PKS	117
5.1.8	Reinigung des Zielproteins nach Co-Expression von Chaperonen	120
5.1.8.1	FPLC-Trennung von PsyC	121
5.1.8.2	Trennung von Ped13 über „2-Schritt Kultivierung“ und Zugabe von Casein und Mg-ATP bei der Affinitätsreinigung	124
5.1.8.3	Zusammenfassung der Trennung von PKS-Chaperon-Fraktionen	126
5.2	Heterologe Expression des Pederin-Cluster	127
5.2.1	Klonierungen der <i>pedM,N,L</i> -komplementierenden Plasmide	128
5.2.2	Transkriptionsanalysen.....	130
5.2.3	Expressionsexperimente	133
5.2.4	Analyse der nicht vorhandenen Pederin-Produktion.....	135
5.3	Zusammenfassung und Ausblick.....	139
6	Material und Methoden	143
6.1	Cosmide, Vektoren, Plasmide und Organismen	143
6.1.1	Cosmide	143
6.1.2	Vektoren und Plasmide	143
6.1.3	Organismen.....	144
6.2	Medien	145
6.3	Puffer und Reaktionslösungen.....	148
6.4	Mikrobiologische Techniken	148
6.4.1	Stammhaltung in Kryokulturen	148
6.4.2	Kultivierung von Bakterien	149
6.4.3	Transformation	149
6.4.3.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	150
6.4.3.2	Herstellung elektrokompenter Zellen	150
6.4.3.3	Hitzeschocktransformation	150
6.4.3.4	Elektroporation.....	151
6.4.4	Blau/Weiß Selektion auf transformierte positive Klone	151
6.4.5	Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen	151
6.5	Molekularbiologische Techniken	152
6.5.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	152
6.5.1.1	Kolonie-PCR	153
6.5.1.2	Oligonucleotide („Primer“).....	153
6.5.1.3	Reinigung von PCR-Produkten.....	156

6.5.2	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	157
6.5.3	Isolierung genomischer DNA	159
6.5.4	Isolierung von Plasmid-DNA	159
6.5.5	Isolierung von RNA	160
6.5.6	Restriktionsspaltung von DNA	162
6.5.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	162
6.5.8	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	162
6.5.9	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	163
6.5.10	Vektordephosphorylierung mit der Antarctic Phosphatase	163
6.5.11	Ligation	164
6.5.12	Reinigung der DNA durch Fällung.....	165
6.5.13	Herstellung von glatten Enden mittels der T4-DNA-Polymerase.....	165
6.5.14	T/A-Klonierung.....	165
6.5.14.1	Herstellung von T/A-Vektor aus dem Vektor pBluescript ²⁷⁴	166
6.5.14.2	A-Tailoring.....	166
6.5.15	Nutzung der DNA-Methylierung in Klonierungen	166
6.5.16	Sequenzierung	168
6.5.17	Klonierung von Proteinexpressionsplasmiden	168
6.5.17.1	Entstandene Plasmide (T/A-Klonierung)	169
6.5.17.2	Entstandene Expressionsplasmide	170
6.5.17.3	Weitere in dieser Arbeit verwendete Expressionsplasmide	171
6.5.18	Analytik der konstruierten T/A- und Proteinexpressionsplasmide	171
6.5.19	Klonierung über homologe Rekombination mit dem λ -red System	172
6.5.19.1	Elektroporation von pHB136 und pHN1005 in <i>E. coli</i> BW25113 pKD46	173
6.5.19.2	PCR-targeting von pHB136 und pHN1005.....	173
6.5.19.3	Plasmidüberprüfung	173
6.5.19.4	Plasmide.....	174
6.6	Proteinexpression, Proteinreinigung und Proteinanalytik	175
6.6.1	Alignments zur Festlegung des Leserahmens	175
6.6.2	Proteinexpression.....	175
6.6.3	Zellaufschluss.....	176
6.6.3.1	Zellaufschluss mittels Ultraschall	176
6.6.3.2	Zellaufschluss mittels French Press	177
6.6.4	Proteinexpression unter Co-Expression verschiedener Chaperone.....	177
6.6.5	Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen	177
6.6.6	Aufreinigung von Strep-Tag-Fusionsproteinen	178
6.6.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	178
6.6.8	SDS-PAGE Färbungen.....	179
6.6.8.1	Coomassie-Färbung	180
6.6.8.2	Silberfärbung	180
6.6.9	Generierung von Protein-spezifischen Daten	181
6.6.10	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	182
6.6.10.1	Modifizierter Bradford-Assay ²⁷⁷	182

6.6.10.2	Proteinbestimmung durch SDS-PAGE-Absorptionsmessungen	183
6.6.11	Trennung von Zielprotein und Chaperon	184
6.6.11.1	Trennung durch Zugabe von Mg-Adenosintriphosphat während der Aufreinigung	185
6.6.11.2	Trennung durch Zugabe von Casein während der Aufreinigung.....	185
6.6.11.3	Trennung durch Blockierung der Proteinbiosynthese während der Kultivierung ²³²	185
6.6.11.4	Kombination der Methoden aus 6.6.11.1, 6.6.11.2 und 6.6.11.3	185
6.6.11.5	Trennung durch Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC).....	186
6.6.11.5.1	Ionenaustauschchromatographie.....	186
6.6.11.5.2	Hydrphobe Interaktionschromatographie (HIC).....	186
6.6.12	Massenspektroskopische Untersuchung von Proteinen.....	187
6.6.12.1	Probenvorbereitung	187
6.6.12.1.1	Tryptischer Verdau aus SDS-PAGE-Gelen	187
6.6.12.1.2	Aufkonzentrierung/Entsalzung mit Vivaspin Zentrifugalröhrchen.....	188
6.6.12.2	MALDI-TOF-TOF-MS.....	188
6.6.12.3	LC-ESI-microQ-TOF-MS	189
6.6.12.4	ESI-FT-ICR-MS	189
6.7	Enzymassays.....	189
6.7.1	AT-ACP-Assay.....	189
6.7.2	Kinetische Untersuchung der AT-ACP-Substratbeladung	190
6.7.3	α -Hydroxylierungsassay mit PsyC.....	192
6.7.3.1	Assay mit gereinigtem PsyC.....	192
6.7.3.2	Assay mit dem Lysat des Zellaufschlusses.....	193
6.7.3.3	Ganzzelltransformationsassay.....	193
6.7.4	Methoxylierungsassay mit PsyD O-MT	193
6.7.4.1	Assay mit gereinigtem PsyD O-MT	193
6.7.4.2	Assay mit dem Lysat des Zellaufschlusses.....	194
6.7.4.3	Ganzzelltransformation	194
6.7.5	Analytik des α -Hydroxylierungsassay und des Methoxylierungsassay	194
6.8	Nachweis von Enzym-gebundenem Fe (II).....	195
6.8.1	Fotometrische Messung durch Komplexierung mit Ferene.....	195
6.8.2	Messung mittels ICP-OES.....	196
6.9	Extraktion und Analytik der heterologen Pederin-Expression	197
6.9.1	Extraktion der <i>Pseudomonas</i> und <i>Acinetobacter</i> -Kulturen.....	197
6.9.2	Dünnschichtchromatographische Analytik der Extrakte.....	198
6.9.3	LC-MS-Analytik der Extrakte.....	198
6.10	Verwendete Chemikalien	198
6.11	Verwendete Geräte und Materialien	201
7	Abkürzungsverzeichnis	205

8	Literatur	207
9	Anhang	221
9.1	Plasmidkarten	221
9.1.1	Plasmide zur Lagerung und Sequenzierung.....	221
9.1.2	Vektoren zur Proteinexpression	223
9.1.3	Plasmide zur Co-Expression von Chaperonen	225
9.2	Massenspektren.....	226
9.2.1	MALDI-TOF-TOF-MS Spektren der Messungen von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten in der <i>apo</i> - und <i>holo</i> -Form	226
9.3	FPLC-Läufe zur Trennung von Zielprotein und Chaperone.....	228
9.4	Alignment von PsyC	230
10	Publikationen	231
11	Lebenslauf	233
12	Selbstständigkeitserklärung.....	235

Abb. 3-1: Strukturen, Produzent und pharmakologische Wirkung einiger Polyketide.....	9
Abb. 3-2: (A) Substrate von FAS, (B) Substrate von PKS.....	11
Abb. 3-3: PPTase-katalysierte Reaktion von der inaktiven <i>apo</i> -ACP zur aktiven <i>holo</i> -ACP.	12
Abb. 3-4: Reaktionen, die zur Kettenverlängerung der Polyketide führen.....	13
Abb. 3-5: Reduktionsgrad am PKS-Intermediat katalysiert durch KR, DH und ER.	13
Abb. 3-6: Architektur einer nicht-iterativen Typ I-PKS am Beispiel von Erythromycin A 2.....	15
Abb. 3-7: Aufbau und Biosynthese von FAS und PKS.....	17
Abb. 3-8: Architektur von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -AT-PKS Modulen.....	17
Abb. 3-9: Phylogenetische Analyse der KS-Domänen von <i>cis</i> -AT und <i>trans</i> -AT PKSs. ⁴⁸	18
Abb. 3-10: Phylogenetische Analyse der KS-Domänen von <i>trans</i> -AT PKS. ⁵⁰	20
Abb. 3-11: Phylogenetische Analyse der KS-Domänen von <i>cis</i> -AT PKS. ⁴⁹	20
Abb. 3-12: Nichtribosomale Peptide mit Produzenten.....	22
Abb. 3-13: Substanzen der Pederinfamilie.....	23
Abb. 3-14: Putative Pederin 20-Biosynthese.....	27
Abb. 3-15: Gencluster und postulierte Biosynthese von Psymberin 21. ⁶¹	28
Abb. 4-1: Schematische Darstellung der untersuchten Phosphopantetheinylierung und Acylierung.	40
Abb. 4-2: Neuartige Biosyntheseschritte der Pederin- und Psymberin-PKS.	40
Abb. 5-1: Klonierung des PedI3-Expressionsplasmids pHN10.....	46
Abb. 5-2: Klonierung des Fusionsproduktes aus <i>eryA</i> -Linker _{1,2} und <i>pedI3</i>	48
Abb. 5-3: Klonierung des Fusionsproduktes aus dem <i>pedF</i> -Linker und <i>pedI3</i>	50
Abb. 5-4: Klonierung der PsyA-ACP ₃ -Expressionsplasmide pHN77, pHN62, pHN64 und pHN60. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPSKF1 ⁶¹ PCR-amplifiziert.	52
Abb. 5-5: Klonierung der PsyD-ACP ₁ -Expressionsplasmide pHN78, pHN68, pHN70 und pHN66. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPSKF1 ⁶¹ PCR-amplifiziert.	52
Abb. 5-6: Proteingel der Expression des 161 kDa Moduls PedI3 aus <i>E. coli</i> BL21 DE3 pHN10 (B).....	56
Abb. 5-7: Proteinexpression von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten unter Co-Expression von DnaK, DnaJ und GrpE.....	58
Abb. 5-8: Vergleich der erhaltenen Proteinkonzentrationen von PedI3 und PedI3-Linkerfusionsprodukten mit und ohne einer Co-Expression von Chaperonen.....	59
Abb. 5-9: Qualitativer Vergleich der Proteinkonzentrationen in den 150 mM und 200 mM Imidazol Elutionsfraktionen von PedI3 und den PedI3-Linkerfusionen.....	60
Abb. 5-10: Proteingele der Expressionen von <i>E. coli</i> BL21 DE3 pHN60 und pHN66.	61
Abb. 5-11: Proteinbanden der verschiedenen PedI3-Proteine, die im Weiteren auf eine Phosphopantetheinylierung mittels tryptischem Verdau und folgender MALDI-TOF-TOF-MS untersucht wurden.....	64

Abb. 5-12: Massenspektren der MALDI-TOF-TOF-MS Messungen von <i>holo</i> -PedI3 und <i>apo</i> -PedI3 bei verschiedenen Laserintensitäten (I - III). Matrix: HCCA.	65
Abb. 5-13: Zuordnung der Massen zu den Proteinfragmenten von PedI3.	66
Abb. 5-14: MALDI-TOF-TOF-MS Spektren von PsyA-ACP ₃	68
Abb. 5-15: LC-MS von PsyA-ACP ₃ exprimiert über den Vektor pHis8- <i>svp</i> (<i>E. coli</i> BL21 DE3 pHN77). ..	69
Abb. 5-16: Klonierung der PedC-Expressionsplasmide pHN38, pHN40 und pHN42. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPD23E7 ³⁸ mittels PCR amplifiziert.	73
Abb. 5-17: Proteingel der Expressionen von PedC.	73
Abb. 5-18: Proteingel des exprimierten und aufgereinigten PedC.	74
Abb. 5-19: Ergebnisse der ¹⁴ C-Malonyl-CoA 6 Substratbeladungsreaktionen durch PedD auf PedI3 und dessen Linkerfusionsproteine.	76
Abb. 5-20: Ergebnisse der ¹⁴ C-Malonyl-CoA 6 Substratbeladungsreaktionen durch PedD auf PedF-Linker/PedI3 und dessen Linkerfusionsproteine.	77
Abb. 5-21: SDS-PAGE (Comassie gefärbt) und Autoradiogramm zum Test der Substratakzeptanz von PedC gegenüber Malonyl-CoA 6 bzw. Acetyl-CoA 5.	79
Abb. 5-22: Ergebnisse der ¹⁴ C-Malonyl-CoA 6 Substratbeladungsreaktionen durch PedD auf PsyA-ACP ₃	80
Abb. 5-23: Ergebnisse der ¹⁴ C-Malonyl-CoA 6 Substratbeladungsreaktionen durch PedD auf PsyD-ACP ₁	81
Abb. 5-24: Ergebnisse der ¹⁴ C-Acetyl-CoA 5 Substratbeladungsreaktionen durch PedD auf PsyA-ACP ₃ und PsyD-ACP ₁	82
Abb. 5-25: Enzymatische Reaktionen im gekoppelten Assay zur Bestimmung der AT-ACP-Kinetik.	84
Abb. 5-26: Darstellung der Extinktion _{340nm} gegen Zeit zum Test der α -Ketoglutaratdehydrogenase-Reaktion des gekoppelten Assay.	85
Abb. 5-27: Rohmessdaten des AT-ACP Assays bei Raumtemperatur.	86
Abb. 5-28: Rohmessdaten des AT-ACP Assay bei Temperaturen von A) 10 °C und B) 4 °C und einer Substratkonzentration von 100 μ M Malonyl-CoA 6.	87
Abb. 5-29: Michaelis-Menten Kinetik der AT-ACP Substratübertragungsreaktion bei RT.	89
Abb. 5-30: Michaelis-Menten Kinetik der AT-ACP Substratübertragungsreaktion bei 10 °C sowie die zugehörigen Selbstacylierungsreaktionen.	90
Abb. 5-31: Polyketide, die sich durch β -Verzweigungen in der Struktur auszeichnen. Blau eingekreist sind die β -Verzweigungen.	92
Abb. 5-32: Schematische Darstellung der putativen Biosynthese der Pederin-Exomethylengruppe. .	93
Abb. 5-33: Schematische Darstellung der Methode, die zur Untersuchung der Exomethylengruppen Biosynthese angewendet werden sollte.	94

Abb. 5-34: Klonierung der PedL-Expressionsplasmide pHN31 und pHN32. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPS8F8 ⁸⁰ mittels PCR amplifiziert.	96
Abb. 5-35: Ergebnisse der Proteinexpressionen von PedM, PedP und PedL.	97
Abb. 5-36: α -hydroxylierte Polyketide der Pederinfamilie. Die α -Hydroxylierungen werden wahrscheinlich durch Fe(II)/ α -Ketoglutarat abhängige Hydroxylasen und FAD-abhängige Oxidoreductasen eingeführt.	100
Abb. 5-37: Klonierung der PsyC-Expressionsplasmide pHN50, pHN52, pHN72, pHN74 und pHN79. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPSKF1 ⁶¹ mittels PCR amplifiziert.	102
Abb. 5-38: Klonierung der PsyK-Expressionsplasmide pHN54, pHN56 und pHN58. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPSCG2 ⁶¹ mittels PCR amplifiziert.	102
Abb. 5-39: Proteingel der verschiedenen Expressionen von PsyC unter Co-Expression verschiedener Chaperone sowie der Expression fusioniert mit dem Sumo-Löslichkeits-Tag.	103
Abb. 5-40: SDS-Page der Proteinexpressionen von PsyK.	104
Abb. 5-41: Substrate für den α -Hydroxylierungsassay sowie die postulierten enzymatischen Reaktionen von PsyC.	105
Abb. 5-42: LC-ESI-microQ-TOF-MS der PsyC Enzymassays mit aufgereinigtem Protein.	106
Abb. 5-43: Proteingel der Expression der Sfp.	108
Abb. 5-44: PsyC spezifische Eisenkonzentrationen in den Elutionsfraktionen.	111
Abb. 5-45: PsyC spezifische Konzentrationen der Elemente Ca, Zn, Ni und Mg.	112
Abb. 5-46: Klonierung der PsyD O-MT-Expressionsplasmide pHN44, pHN46 und pHN48. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPSCG2 ⁶¹ mittels PCR amplifiziert.	114
Abb. 5-47: Proteingel der Expression von PsyD O-MT.	115
Abb. 5-48: Substrate für den O-Methoxylierungsassay sowie die postulierten enzymatischen Reaktionen von PsyD O-MT.	116
Abb. 5-49: SDS-Page einer Expression mit <i>E. coli</i> ArcticExpress RIL DE3.	119
Abb. 5-50: Ionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung von PsyC.	122
Abb. 5-51: Proteingel zur Ionenaustauschchromatographie (Abb. 5-50).	122
Abb. 5-52: Chromatogramm der HIC (Säule: Phenyl-HP) zur Reinigung von PsyC.	123
Abb. 5-53: Proteingel der HIC-Chromatographie aus Abb. 5-52.	124
Abb. 5-54: SDS-Page der „2-Schritt Kultivierung“ sowie der Aufreinigung unter Zugabe von Casein und Mg-ATP.	125
Abb. 5-55: Schematische Darstellung der λ -red medierten Klonierung der <i>pedN</i> , <i>pedM</i> und <i>pedL</i> komplementierenden Plasmide.	130
Abb. 5-56: Agarose-Gele zur Kontrolle der RNA-Isolierung.	131
Abb. 5-57: Analyse der RT-PCR.	132

Abb. 5-58: Dünnschichtchromatographische Analyse der Kultivierungsextrakte.	135
Abb. 5-59 Vergleich der relative Adaptivität des Codongebrauchs des Pederin-Cluster mit der der zur heterologen Expression verwendeten Stämme.	137
Abb. 6-1: Schematische Darstellung des Restriktionsmusters von pPS9D2 und pHN8 durch den NEB-Cutter 2.0. ²⁷⁵	167
Abb. 6-2: Plasmidkarte des RecET codierenden Plasmids pKD46. ²⁴⁷	172
Abb. 6-3: BSA-Kalibriergerade zur Bestimmung unbekannter Proteinkonzentrationen.	183
Abb. 6-4: Kalibriergerade zur Bestimmung unbekannter Proteinproben mittels einer Absorptionsmessung über das Geldokumentationssystem.....	184
Abb. 6-5: Kalibriergerade zur Bestimmung unbekannter Eisenkonzentrationen mit dem Ferene Testsystem.....	196
Abb. 9-1: Plasmidkarte und MCS von pBluescript SK(+).	221
Abb. 9-2: Plasmidkarte und MCS von pCR2.1-Topo.	222
Abb. 9-3: Plasmidkarte mit MCS von pGEM-T Easy.....	222
Abb. 9-4: Plasmidkarte und MCS von pET-52b(+).	223
Abb. 9-5: Plasmidkarte und MCS für den Proteinexpressionsvektor pHIS8- <i>svp</i> bzw. pHIS8.	223
Abb. 9-6: Plasmidkarte und MCS für den Proteinexpressionsvektor pASK-IBA3 bzw. pASK-IBA5.....	224
Abb. 9-7: Plasmidkarte und MCS für den Proteinexpressionsvektor pET SUMO.....	225
Abb. 9-8: Übersicht über die Plasmide zur Co-Expression verschiedener Chaperone. ^{115,116}	225
Abb. 9-9: Massenspektren der MALDI-TOF-TOF-MS Messungen von <i>holo</i> -PedF-Linker/PedI3 und <i>apo</i> -PedF-Linker/PedI3 bei verschiedenen Laserintensitäten (I - III). Matrix: HCCA.	226
Abb. 9-10: Massenspektren der MALDI-TOF-TOF-MS Messungen von <i>holo</i> -EryA-Linker ₁ /PedI3 bei verschiedenen Laserintensitäten (I - III). Matrix: HCCA.	226
Abb. 9-11: Massenspektren der MALDI-TOF-TOF-MS Messungen von <i>holo</i> -EryA-Linker ₂ /PedI3 und <i>apo</i> -EryA-Linker ₂ /PedI3 bei verschiedenen Laserintensitäten (I - III). Matrix: HCCA.....	227
Abb. 9-12: Chromatogramm der HIC-Chromatographie (Säule: Octyl-Sepharose).	228
Abb. 9-13: SDS-PAGE der HIC-Chromatographie aus Abb. 9-12.	228
Abb. 9-14: Chromatogramm der HIC-Chromatographie (Säule: Butyl-Sepharose).	229
Abb. 9-15: SDS-PAGE der HIC-Chromatographie aus Abb. 9-14.	229
Abb. 9-16: Alignment der hypothetischen α -Hydroxylasen.....	230

Tab. 3-1: Polyketid-Synthase Typen sowie Untertypen, verwendete Verlängerungseinheiten und produzierende Organismen. ²	14
Tab. 5-1: Übersicht über die fertiggestellten Expressionsplasmide zur Überexpression von ACPs und ACP-enthaltender Proteine.	54
Tab. 5-2: Auflistung der erhaltenen kinetischen Daten für PedD sowie Literaturdaten anderer AT zum Vergleich.....	91
Tab. 5-3: Darstellung der aus dem Alignment (Anhang, Abb. 9-16) extrahierten hypothetischen Metall-Liganden und α -Ketoglutarat stabilisierende Aminosäuren für PsyC, PedK, OnnE und OnnF sowie den über PSI-Blast gefundenen homologen Phytanoyl-CoA Dioxygenasen.	100
Tab. 5-4: Kultivierungsbedingungen bei der Pederin 20-Expression.	133
Tab. 6-1: Verwendeten Cosmide.	143
Tab. 6-2: Vektoren zur Lagerung und Sequenzierung von amplifizierten PCR-Fragmenten (Plasmidkarten unter 9.1.1).	143
Tab. 6-3: Vektoren zur Proteinexpression (Plasmidkarten unter 9.1.2).	143
Tab. 6-4: Plasmide zur Co-Expression verschiedener Chaperone. (Plasmidkarten unter 9.1.3).....	144
Tab. 6-5: Übersicht über die verwendeten <i>E. coli</i> , <i>Acinetobacter</i> und <i>Pseudomonas</i> -Stämme.	145
Tab. 6-6: Kultivierungsbedingungen der verschiedenen <i>E.coli</i> -Stämme.....	149
Tab. 6-7: Kultivierungsbedingungen der Stämme <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1, und <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	149
Tab. 6-8: Puffer zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen.....	150
Tab. 6-9: Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion.	152
Tab. 6-10: Temperaturprogramm für die PCR.....	153
Tab. 6-11: Verwendete Primer zur Amplifikation der Biosynthesegene für die Expressionsvektoren.	154
Tab. 6-12: Verwendete Primer zur Amplifikation verschiedener DNA-Fragmente für die λ -red Experimente.	156
Tab. 6-13: Reaktionsansatz der RT-PCR.....	157
Tab. 6-14: Temperaturprogramm der RT-PCR.	157
Tab. 6-15: Verwendete Primer zum Nachweis von mRNA.....	158
Tab. 6-16: Verwendete Puffer der Plasmidisolierung.	160
Tab. 6-17: Reaktionsansatz der Dephosphorylierungsreaktion.	164
Tab. 6-18: Reaktionsansatz der Ligation.	164
Tab. 6-19: Reaktionsansatz der A-Tailoring Reaktion.	166
Tab. 6-20: Übersicht über die Vektoren und Plasmide, dessen Restriktion über Methylierungs-empfindliche Enzyme erfolgte.	167

Tab. 6-21: Übersicht über die verwendeten Sequenzierprimer.	168
Tab. 6-22: Übersicht über die entstandenen Plasmide zur Lagerung, Sequenzierung und ständigen Verfügbarkeit der Biosynthesegene.	169
Tab. 6-23: Übersicht über die generierten Expressionsplasmide zur Überexpression von Proteinen.	170
Tab. 6-24: Übersicht über Expressionsplasmide, dessen exprimierte Proteine in dieser Arbeit Anwendung finden, jedoch nicht selbst konstruiert worden sind.	171
Tab. 6-25: Verwendete Primer zur Analyse von Plasmidkonstrukten.	172
Tab. 6-26: Ausgangsplasmide der λ -red-Klonierung.	174
Tab. 6-27: Konstruierte Plasmide für die λ -red-Klonierung.	174
Tab. 6-28: Plasmide zur heterologen Expression der kodierten Pederingene unter Kontrolle des pedC/pedD-Promotor.	174
Tab. 6-29: In den Alignments verwendete Proteine.	175
Tab. 6-30: Puffer zur Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen.	178
Tab. 6-31: Puffer zur Aufreinigung von Strep-Tag-Fusionsproteinen.	178
Tab. 6-32: Lösungen zum Färben von Proteingelen mit der Silberfärbung.	180
Tab. 6-33: Proteininformationen der exprimierten Proteine.	181
Tab. 6-34: Puffer der Ionenaustauschchromatographie.	186
Tab. 6-35: Puffer der HIC-Chromatographie.	187
Tab. 6-36: Ansatz der Radioaktiv-Assays mit Malonyl-CoA 6 [Malonyl-2- ¹⁴ C] und Acetyl-CoA 5 [Acetyl-1- ¹⁴ C-CoA].	190
Tab. 6-37: Zusammensetzung des AT-ACP-Assays zur kinetischen Untersuchung der Substratübertragungsreaktion.	191
Tab. 6-38: Bestandteile des α -Hydroxylierungsassays.	193
Tab. 6-39: Bestandteile des Methoxylierungsassays.	194
Tab. 6-40: Elementkonzentrationen in den Hochstandards der ICP-OES-Messungen.	196
Tab. 6-41: Fe-Gehalt der Testproben und mittels ICP-OES gemessener Fe-Gehalt.	197

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Expression und Charakterisierung von Enzymen der Pederin- und Psymberin-Biosynthese sowie mit den Fortschritten in der heterologen Expression des Pederin-Genclusters.

Pederin und Psymberin werden von bakteriellen Symbionten produziert. Der Pederin-Produzent hat eine Symbiose mit Käfern der Gattung *Paederus* und *Paederidus* ausgebildet, wogegen der Psymberin-Produzent aus dem Schwamm *Psammocinia* aff. *bulbosa* stammt. Sowohl Pederin als auch Psymberin zeichnen sich durch eine sehr hohe antitumorale Wirksamkeit aus. Die Biosynthese wird über Typ I-Polyketidsynthasen (PKS) realisiert, deren Acyltransferasen (AT) in *trans* agieren. Die PKS hat einen modularen Aufbau, wobei jedes Modul in einzelne Domänen untergliedert ist. In die Psymberin-PKS sind dabei eine während bei der Pederin-PKS zwei Nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS)-Module integriert.

Im Zentrum dieser Arbeit steht die Expression, Reinigung und Charakterisierung verschiedener Enzyme der Psymberin- und Pederin-Biosynthese. Als Ziel dieser Experimente steht die enzymatische *in vitro*-Erforschung der Einführung von β -Verzweigungen, α -Hydroxylierungen und β -Methoxylierungen in Polyketide am Beispiel von Pederin und Psymberin. Diese ungewöhnlichen Biosyntheseschritte waren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht näher charakterisiert und könnten Potential für die kombinatorische Polyketid-Biosynthese zur Generierung nicht natürlicher Polyketide besitzen. Ein weiteres sehr zentrales Thema stellt die Charakterisierung der *trans*-AT-katalysierten Acylierungsreaktion der Acylcarrierproteine (ACP) dar.

Auf Basis von Vorarbeiten, die aus der initialen Charakterisierung der AT PedD und ihrer Substratübertragungsreaktion auf die ACPs PedN und die Doppel-ACP von PedI3 bestanden, wurden diese Experimente erweitert und mit einem ganzen Modul (PedI3) des Pederin-Biosynthese-Gencluster sowie zwei einzelnen modularen ACPs (PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁) des Psymberin-Clusters durchgeführt. Das Modul PedI3 konnte hierzu als His₈-Fusionsprotein exprimiert und gereinigt werden. Zusätzlich wurde PedI3 fusioniert mit zwei Linkersequenzen der Erythromycin-PKS sowie einer Linkersequenz von PedF als His₈-Linker-PedI3-Fusionsprotein exprimiert und gereinigt. Dabei erwies sich die Co-Expression von Chaperonen, durch die eine 6 bis 11 fach erhöhte Zielproteinkonzentration in den Elutionsfraktionen erzielt wurde, als sehr hilfreich. Ebenfalls als His₈-Fusionsprotein konnten die ACPs PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ exprimiert und gereinigt werden. Eine Umwandlung der ACPs von der inaktiven *apo*- in die aktive *holo*-Form konnte durch die Co-Expression der Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) Svp aus *Streptomyces verticillus* ATCC15003 durchgeführt werden. Der Nachweis der erfolgten Phosphopantetheinylierung wurde an

PsyA-ACP₃ mittels MALDI-TOF-TOF-MS und LC-MS nachgewiesen. Der Nachweis der Phosphopantetheinylierung von PedI3 und PsyD-ACP₁ erfolgte indirekt über eine erfolgreiche Substratübertragung auf die putative *holo*-Form sowie fehlender Acylierung der vermeintlichen *apo*-Form. Bei dem Einsatz der Enzyme in Assays mit radioaktiv markierten Substraten zeigte sich, dass PedD in der Lage ist, Malonyl-CoA auf die *holo*-Form von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten sowie auf PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ zu übertragen. Keine Übertragung erfolgt bei einem Einsatz von Acetyl-CoA und der Verwendung der jeweiligen *apo*-Form der ACPs. Diese Ergebnisse bestätigen die Substratspezifität und fehlende ACP-Spezifität von PedD und zeigen dies spezifischer, da die PedD-medierte Substratbeladung an einem ganzen Modul getestet wurde.

Um die Substratübertragungsreaktion von PedD kinetisch zu untersuchen, wurde die enzymatische Reaktion an einen bereits bekannten α -Ketoglutaratdehydrogenase Assay gekoppelt. Dabei konnten die kinetischen Daten bei 10 °C für die PedD-katalysierte Substratübertragung auf die ACPs PedN und PsyA-ACP₁ sowie die Selbstacylierungsreaktion der ACPs ermittelt werden. Für die PedD-katalysierte Substratübertragung auf PedN ergab sich ein Wert für K_M von 2,3 μM , für k_{cat} von 0,045 s^{-1} sowie für $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ von 0,019 $\text{s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. Die PedD-katalysierte Substratübertragung auf das ACP PsyA-ACP₃ zeigte einen K_M von 1,7 μM , einen k_{cat} von 0,044 s^{-1} sowie einen $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ von 0,0257 $\text{s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. Die Selbstacylierungsreaktion von PedN ergab für K_M 54 μM , für k_{cat} 0,005 s^{-1} sowie für $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ 0,00009 $\text{s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. Die Selbstacylierungsreaktion von PsyA-ACP₃ wurde K_M zu 131 μM , k_{cat} zu 0,0059 s^{-1} sowie $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ zu 0,000045 $\text{s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$ ermittelt.

Für die zweite AT PedC konnte bisher keine Substratübertragung auf die ACPs nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stammen aus Studien mit einem Fusionsprotein aus Maltosebindeprotein und PedC. Um diese fehlende Aktivität zu bestätigen oder zu widerlegen, wurde PedC mit einem kurzen Strep Tag II Affinitäts-Tag fusioniert und unter Co-Expression von Chaperonen exprimiert und gereinigt. Der Einsatz von PedC in Assays mit radioaktiv markiertem Malonyl- und Acetyl-CoA zeigte, dass PedC auch als Fusion mit dem Strep Tag II nicht in der Lage ist, die Substrate zu akzeptieren.

Insgesamt ist PedD somit für die Übertragung aller Elongationssubstrate (Malonyl-CoA) auf die ACPs während der Pederin-Biosynthese zuständig. Außerdem liefern die Experimente mit den ACPs PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ die ersten funktionellen Daten zum Psymberin-Cluster.

Zu Beginn dieser Arbeit war die Einführung von β -Verzweigungen in Polyketide völlig unerforscht. Daher sollte am Beispiel der Einführung der Exomethylengruppe im Pederin diese enzymatischen Schritte näher beleuchtet werden. Hierzu wurden als zentraler Bestandteil das Modul PedI3 und dessen genannte Linkerfusionsprodukte exprimiert und aufgereinigt. Die Aktivität von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukte konnte aufgrund der Substratazeptanz gegenüber Malonyl-CoA

nachgewiesen werden. Weitere akzessorische Proteine, die bei der Biosynthese involviert sein sollten, sind das ACP PedN, die Ketosynthase (KS) PedM, das HMGCoA-Synthase-artige Protein (HMGS) PedP und die Crotonase (CR) PedL. Für PedN stand bereits ein funktionierendes Expressionsystem zur Verfügung. PedM und PedP waren bereits kloniert und konnten im Rahmen dieser Arbeit als His₈-Fusionsproteine unter Co-Expression von Chaperonen exprimiert und gereinigt werden. PedL wurde neu kloniert und konnte als His₈-Fusionsprotein sowie als StrepTag II-PedL-His₁₀-Fusionsprotein exprimiert und gereinigt werden. Somit wurde durch die Expressionen die enzymatische Grundlage für die Assays gelegt. Allerdings zeigte sich in der massenspektrometrischen Analytik die Problematik, dass die Detektion von Intermediat-beladenen Proteinfragmenten mit den getesteten Methoden, unter anderem aufgrund von Chaperon-Verunreinigungen, nicht erfolgreich war. Die Chaperone konnten auch mit unterschiedlichsten Methoden nicht vom Zielprotein getrennt werden. Daher sind die Proteine für die Assays vorhanden, allerdings müssen in weiteren Arbeiten die analytischen Methoden sowie die Proteinreinigungsmethoden verbessert werden, um eine Analytik der Assays zu ermöglichen.

Kandidaten für die Einführung von α -Hydroxylierungen in Polyketide sind die Enzyme PsyC, eine putative Fe(II) α -Ketoglutarat-abhängige α -Hydroxylase, sowie PsyK, eine putative FAD-abhängige Oxidoreduktase. PsyC konnte als His₈-Fusionsprotein unter Co-Expression von Chaperonen sowie, ohne Chaperon Co-Expressionen, als Fusion mit dem Sumo-Löslichkeits-Tag exprimiert und gereinigt werden. PsyK konnte ebenfalls als His₈-Fusionsprotein sowie als N-terminales und C-terminales Strep-Tag II Protein exprimiert und isoliert werden. Durch ICP-OES Messungen konnte für die PsyC-Elutionsfraktionen nachgewiesen werden, dass PsyC spezifische Eisenkonzentrationen von 1,26 (\pm 0,59) mol x mol⁻¹ für die His₈-Fusionsproteine bzw. 1,93 (\pm 0,70) mol x mol⁻¹ für die Fusionen mit dem Sumo-Löslichkeits-Tag vorhanden sind. Andere Elemente konnten als Co-Faktoren ausgeschlossen werden. Daher scheint sich die postulierte Funktion von PsyC als Fe(II) α -Ketoglutarat-abhängige α -Hydroxylase zu bestätigen. Zusätzlich konnte über ein Alignment mit anderen Fe(II) α -Ketoglutarat abhängigen α -Hydroxylasen das für diese Enzyme spezifische und konservierte Aminosäure-Motiv His¹-X-Asp/Glu-X_n-His² gefunden werden. Dies verstärkt die Annahme, dass PsyC für die α -Hydroxylierung zuständig ist.

Der Einsatz von PsyC in Assays mit dem *N*-Acetylcysteamin (SNAC)-gekoppelten postulierten Substrat **33**, das in Anlehnung an das Intermediat von Modul 3 der Psymberin-Biosynthese synthetisiert wurde, zeigte jedoch keine Umsetzung zu **37**.

Für den Nachweis der putativ methoxylierenden Funktion der PsyD *O*-MT Domäne konnte das Enzym als His₈-Fusionsprotein sowie als N-terminales und C-terminales Strep Tag II Fusionsprotein

exprimiert werden. Das His₈-Fusionsprotein wurde in Enzymassays mit dem SNAC-Substrat **33** eingesetzt, jedoch konnte keine Umsetzung zu **41** nachgewiesen werden.

Die wahrscheinlichste Fehlerquelle bei den erfolgten α -Hydroxylierungsassays und O-Methylierungsassays liegt in der Verwendung des SNAC-Substrates **33**, da es strukturell nicht identisch zum postulierten Substrat **35** bzw. **36** ist und aufgrund der einfacheren Synthese als vereinfachtes Testsubstrat eingesetzt wurde. Daher sollten die Assays in weiteren Experimenten unter Verwendung des postulierten Substrates **35** bzw. dessen CoA-Ester **36** nochmals wiederholt werden. Zur Analyse der Reaktionen an ACP-gebundenen Substraten konnten die ACPs PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ bereits erfolgreich exprimiert und isoliert werden.

Neben den Studien an heterolog exprimierten Enzymen der Psymberin- und Pederin-Biosynthese stellen Experimente zur heterologen Expression des kompletten Pederin-Clusters einen weiteren zentralen Punkt dieser Arbeit dar. Als Ausgangspunkt standen *Acinetobacter baylyi* ADP1 und *Pseudomonas stutzeri* JM300-Stämme zur Verfügung, die den Gencluster bereits enthielten. Transkriptionsanalysen zeigten eine fehlende Transkription von *pedM*, *N* und *L*. Daher wurden zur Komplementierung der Transkripte Plasmide konstruiert, die *pedM*, *N* und *L* unter der Regulation des *pedC/pedD*-Promotors enthalten. Folgende Transkriptionsanalysen zeigten die komplementierende Funktion von *pedM*, *N* und *L* der Plasmide, sodass auf Ebene der Transkription alle Gene des Pederin-Clusters transkribiert wurden. Allerdings konnte aus Kultivierungen der entsprechenden Stämme weder Pederin noch Biosynthese-Intermediate des Pederins detektiert werden. Theoretische Untersuchungen auf Basis des Codongebrauchs konnten mögliche Gründe für die fehlenden Metabolite aufdecken. Gravierende Unterschiede bezüglich der relativen Adaptivitäten von AGG und CGG (jeweils kodierend für Arg) zeigten sich bei *Acinetobacter baylyi* ADP1 bei einem Vergleich mit dem Pederin-Cluster. Auch bei *Pseudomonas* sp. konnte ein moderater Unterschied bezüglich der relativen Adaptivitäten für die Codons AGA und AGG (Arg), ATA (Ile) sowie CTA, CTT und TTA (kodierend für Leu) festgestellt werden. Daher könnte eine Ursache für die fehlende Metabolitproduktion in der Translation zu finden sein.

2 Abstract

Presented here are expression and characterization studies of enzymes of the pederin and psymberin biosynthesis. Moreover proceedings in the heterologous expression of the complete pederin gene cluster are reported.

Pederin and psymberin are produced by bacterial symbionts. The pederin producer assumes a symbiosis with beetles from the genus *Paederus* and *Paederidus*, and the psymberin producer coexists with the sponge *Psammocinia* aff. *bulbosa*. Both natural products are highly active antitumor compounds. The biosynthesis is performed by a type I polyketide synthase (PKS), in which the acyltransferases (AT) act in *trans*. The PKS is organized in modules, and the modules are organized in enzymatically active domains. The pederin PKS contains two modules of nonribosomal peptide synthetases (NRPS) whereas the psymberin PKS harbours only one NRPS-modul.

The main aspect of this work is the expression, purification and characterization of various enzymes of the psymberin and pederin cluster. The aim was to elucidate biosynthetic steps like β -branch formation, α -hydroxylations and β -methoxylations in the biosynthesis of pederin and psymberin by *in vitro* assays with the isolated enzymes. These functionalisations of polyketides are novel and uncommon and have great potential in combinatorial biosynthesis and in the generation of unnatural polyketides. The characterization of the *trans*-AT mediated acylation of acylcarrierproteins (ACPs) is another central topic of this study.

After the initial characterization of the PedD AT-mediated substrate transfer to the ACPs PedN and the double ACP from PedI3 by Katrin Zimmermann, the experiments were expanded and the reactions were realized with the complete module PedI3 and with the modul-integrated ACPs PsyA-ACP₃ and PsyD-ACP₁ from the psymberin cluster. In addition, three different fusion proteins of PedI3 and PKS-linkers were tested in the reactions. The origins of the linker sequences were the erythromycin PKS (EryA) and the pederin PKS (PedF). All proteins were expressed and purified as His₈-fusion proteins. For the expression of PedI3 and the linker fusions a co-expression of chaperones was established. Using this method, the target proteins were isolated in a 6 to 11 times higher yield as compared to expressions without co-expression of chaperones. The conversion of the inactive *apo*-ACPs to the active *holo*-ACPs was performed by using the phosphopantetheinyltransferase (PPTase) Svp of *Streptomyces verticillus* ATCC15003. In case of PsyA-ACP₃, MALDI-TOF-TOF-MS and LC-MS were used for the detection of the phosphopantetheinylation. In case of PedI3, its linker fusions and PsyD-ACP₁ analysis was successful by an indirect reaction assays using radioactive substrates. In the latter, putative *holo*-forms of the ACPs were acylated whereas no acylation was observed for the *apo*-forms. The AT-ACP-assays with radioactively labeled malonyl- and acetyl-CoA

showed, that PedD is able to transfer the malonyl-CoA to the *holo*-forms of PedI3, its linker fusions and to the ACPs PsyA-ACP₃ and PsyD-ACP₁. In case of acetyl-CoA and the *apo*-forms of the enzymes, no substrate transfer was detected. These results demonstrate an acyl substrate specificity and no ACP specificity of PedD. In addition these results are more specific compared to the transfer to PedN and the double ACP of PedI3, because of using an entire modul.

In order to perform a kinetic analysis, the enzymatic reaction was coupled to an already known α -ketoglutaratdehydrogenase assay. The reaction was used successfully for the PedD-mediated malonyl-CoA transfer to the ACPs PedN and PsyA-ACP₃. In addition the self acylation reactions of the ACPs were measured. Out of these data kinetic data was calculated. For the PedD-catalyzed substrate transfer to PedN, the K_M is 2,3 μM , the k_{cat} is 0,045 s^{-1} and the $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ is 0,019 $\text{s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. For the PedD-catalyzed substrate transfer to the ACP PsyA-ACP₃, the K_M is 1,7 μM , the k_{cat} is 0,044 s^{-1} and the $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ is 0,0257 $\text{s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. For the self acylation of PedN, K_M was determined to 54 μM , k_{cat} to 0,005 s^{-1} and $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ to 0,00009 $\text{s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. For the PsyA-ACP₃ self acylation, the values are as follows: $K_M = 131 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 0,0059 \text{s}^{-1}$ and the $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1} = 0,000045 \text{s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$.

PedC, the other AT from the pederin cluster, seems not to be able to accept and transfer malonyl-CoA or acetyl-CoA. These results were shown by *in vitro* assays from Katrin Zimmermann where PedC was fused with maltose binding protein. This missing activity should be confirmed or disconfirmed by using PedC fused to a short affinity tag. Therefore PedC was overexpressed under co-expression of chaperones fused as C-terminal Strep tag II protein. The newly created PedC fusion protein was tested in assays with radioactively labeled malonyl- and acetyl-CoA and showed as well no acceptance of the substrates as seen before in case of the maltose binding fusion protein.

In summary, PedD is responsible for the transfer of the elongation substrates (malonyl-CoA) to the ACPs during the biosynthesis of pederin.

At the beginning of this study the biosynthesis of β -branches in polyketides was not known. To elucidate the biosynthetic steps, using the example of the pederin exomethylene group, module PedI3 and the already mentioned three linker fusion variants were expressed as His₈-fusion proteins. The activity of these huge proteins was detected by the acceptance of malonyl-CoA substrates. Further accessory enzymes that should be involved in the reaction are the ACP PedN, the ketosynthase (KS) PedM, the HMGCoA-synthase-like protein (HMGS) PedP and the crotonase (CR) PedL. In case of PedN, a functional expression system already existed. PedM and PedP were already available in cloning vectors, and the expression was performed as a fusion to a His₈-tag under co-expression of chaperones. Cloning and expression of PedL was also performed in this study, and PedL was isolated by co-expression of chaperones as a His₈-fusion protein and as a

Strep tag II-PedL-His₁₀-fusion protein. Therefore, all enzymes necessary for the assay were available. The detection of the active site of Ped13 fragments was planned to be measured by mass spectrometry. Due to co-isolation of chaperones, this method was not successful. It was not possible to isolate the target protein from the chaperones, although different methods were tested. In summary, the enzymes for the assays are available, but for the analysis of the assays the protein purification as well as the analytical method has to be improved.

Candidates for the biosynthesis of α -hydroxylations are the psymberin enzymes PsyC, a putative Fe(II) α -ketoglutaric acid-dependent hydroxylase, and PsyK, a putative FAD-dependent oxidoreductase. PsyC was expressed as His₈-fusion protein under co-expression of chaperones and without co-expression of chaperones as fusion with the Sumo-solubility tag. PsyK was expressed as His₈-fusion protein and as N-terminal and C-terminal Strep-tag II fusion proteins. PsyC elution fractions were analyzed by ICP-OES measurement. The PsyC-specific iron concentrations are $1,26 (\pm 0,59) \text{ mol} \times \text{mol}^{-1}$ in case of the His₈ fusion protein and $1,93 (\pm 0,70) \text{ mol} \times \text{mol}^{-1}$ for the Sumo-solubility tagged protein. Other elements were excluded to act as co-factors. In addition, the alignment to other Fe(II) α -ketoglutaric acid-dependent hydroxylases show that the conserved amino acid motif His¹-X-Asp/Glu-X_n-His² is present in PsyC. This results intensifies the assumption that PsyC is responsible for the catalysis of α -hydroxylations.

PsyC was further tested in enzymatic assays with an *N*-acetylcysteamin (SNAC)-ester **33**, which was synthesized in comparison with intermediate of module 3 of the psymberin-PKS, as substrate. However, mass spectrometric analysis showed no conversion to **37**.

For the analysis of the putative methoxylation domain PsyD *O*-MT, the expression of the enzyme as a His₈-fusion protein and as a N-terminal and C-terminal Strep tag II-fusion protein was performed. The His₈-fusion protein was tested in enzymatic assays with the SNAC-ester **33** as substrate. No conversion to **41** was detected by mass spectrometry.

The lack in conversion of the α -hydroxylation assay and the methoxylation assay maybe occur due to minor changes in the structure in comparison to the postulated SNAC-substrate **35** and **36**. Therefore, the enzyme assay has to be repeated with the postulated SNAC-substrate **35** or the postulated CoA-derivative **36**. In addition, ACP-bound substrates can be used to perform a succesful assay. For this purpose, PsyA-ACP₃ and PsyD-ACP₁ was expressed and purified.

Besides the analysis of single biosynthetic steps of the psymberin and pederin biosynthesis pathway using *in vitro* assays, the heterologous expression of the complete pederin gene cluster was another impotent part of this work. *Acinetobacter baylyi* ADP1 and *Pseudomonas stutzeri* JM 300 were available for this purpose. They already contained the pederin gene cluster. Transcription analysis

showed no mRNA of the genes *pedN*, *M* and *L*. Therefore plasmids were cloned that should complement the missing mRNA. *Ped N*, *M* and *L* were under the control of the *pedC/pedD*-promotor. The transcriptional analysis showed the presence of the mRNA of all pederin genes, especially the mRNA of *pedN*, *M* and *L*. Cultivation experiments and analysis of the bacterial extracts did not indicate the presence of pederin or pederin intermediates. The theoretical analysis on the basis of the codon bias seemed to be a possible reason for the missing pederin production. Large differences in the relative adaptiveness was detected for the codons AGG and CGG (encoding for Arg) by comparison of the codon usage of the pederin gene cluster and the codon usage of the strain *Acinetobacter baylyi* ADP1. Analysis of the codon usage of *Pseudomonas* sp. and the pederin gene cluster showed moderate differences in the relative adaptiveness for the codons AGA and AGG (Arg), ATA (Ile) as well as for CTA, CTT and TTA (encoding for Leu). This leads to the assumption that the problems are on the translational level.

3 Einleitung

3.1 Polyketide

Polyketide bilden eine Gruppe von Naturstoffen, die sich durch eine große strukturelle Diversität auszeichnet. Die Produzenten der Polyketide stellen Bakterien, Pilze und Pflanzen dar.¹ Sie üben für die Organismen vielfältige Aufgaben aus und können als Virulenzfaktoren, Pigmente, Boten- und Abwehrstoffe dienen.² Für den Menschen stellen sie eine hervorragende Quelle für neue pharmazeutische Therapeutika dar und können medizinisch als Antibiotika, Immunsuppressiva, Antiparasitika sowie als cholesterinsenkende und antitumorale Wirkstoffe eingesetzt werden.^{3,4} Diese Tatsache fördert das Interesse, die Biosynthese von Polyketiden zu erforschen und neue Polyketide zu entdecken. Aus diesen Arbeiten ergaben sich zahlreiche Polyketidstrukturen, die eine enorme Diversität bezüglich ihrer Funktion und Strukturvielfalt aufzeigten. Abb. 3-1 zeigt einige Kandidaten mit ihrem Produzenten und ihrer pharmazeutischen Wirkung.

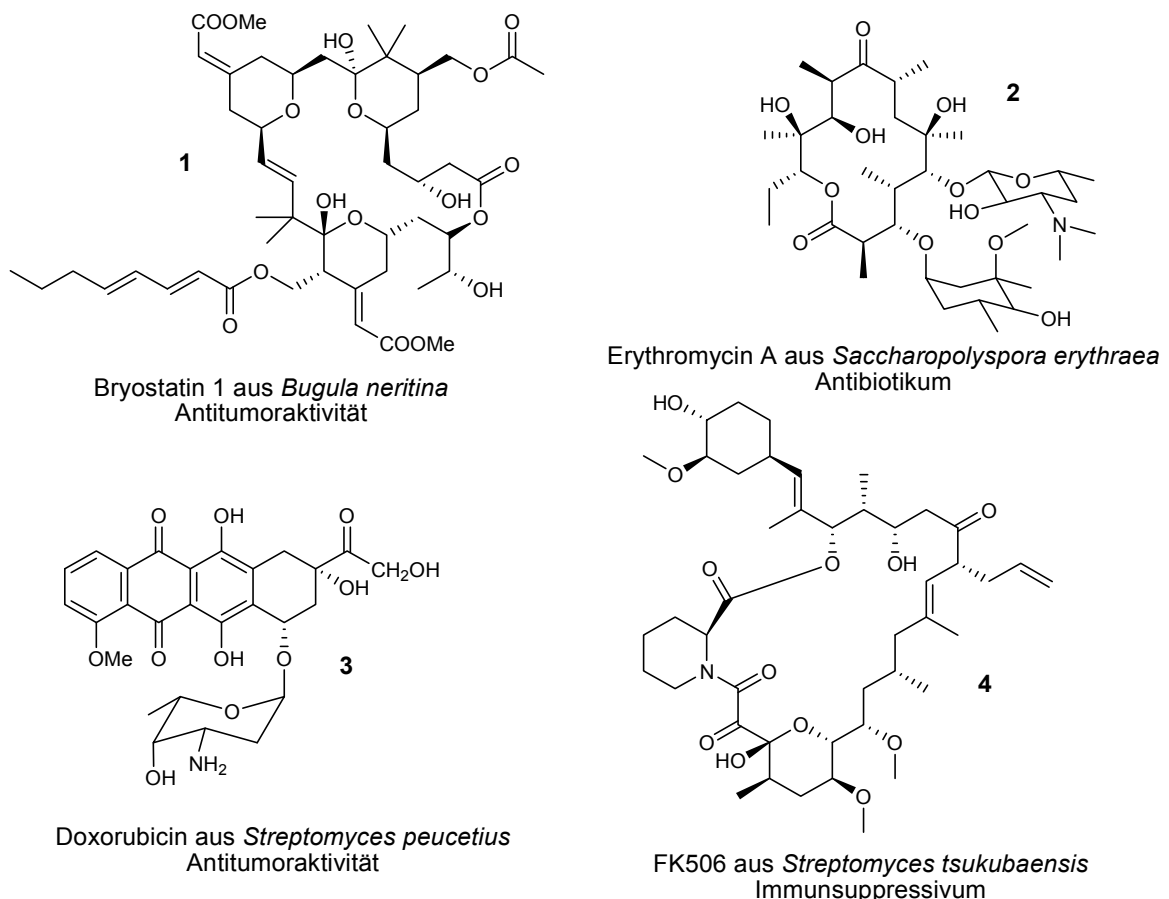


Abb. 3-1: Strukturen, Produzent und pharmakologische Wirkung einiger Polyketide.

Bryostatin 1 **1** zeigt beispielsweise eine Wirksamkeit gegen verschiedene Krebszelllinien. Dazu gehören u. a. Leukämie, Bauchspeicheldrüsen- und Nierenkrebs.⁵ Mittlerweile hat es alleine oder in

Kombination mit anderen Wirkstoffen klinische Studien der Phase II und III erreicht.⁵ Erythromycin **2** ist ein schon seit den 50er Jahren bekanntes Antibiotikum und wirkt gegen grampositive Keime. Diese Wirkung beruht auf der Hemmung des durch den Elongationsfaktors EF-G katalysierten Vorgangs der Translokation bei der Translation und behindert die Proteinbiosynthese.⁶ Doxorubicin **3** ist ein bereits auf dem Markt existierende Antitumorsubstanz und wird von Actinomyceten produziert. Die zytostatische Wirkung beruht auf DNA-Interkalationen, die zu Strangbrüchen führen und dadurch das Wachstum von Geweben hemmt.⁷ FK 506 **4**, auch als Tacrolimus bezeichnet, wird vom Actinomyceten *Streptomyces tsukubaensis* produziert.^{8,9} In der Medizin wird es beispielsweise als Immunsuppressivum bei Organtransplantationen verwendet.¹⁰

Nach den ersten chemischen Polyketidsynthese-Experimenten am Orcinol aus dem Jahre 1893 durch James Collie wurden mehrere 100 neue Polyketidstrukturen entdeckt.³ Collies Namensgebung der Polyketene wurde später durch die Bezeichnung Polyketide von Birch ersetzt.¹¹ Durch die Fortschritte in den molekularbiologischen Techniken¹² wurde es möglich, die Biosynthese von Polyketiden näher zu untersuchen und die enzymatischen Systeme der Polyketidsynthesen (PKS) genauer zu charakterisieren, die für die Polyketid-Biosynthese verantwortlich sind. Sogar gezielte Veränderungen in der Polyketidstruktur sind durch die Rekombinationstechnik möglich geworden¹³⁻¹⁷ und haben das Potenzial, pharmakologisch interessante Polyketide spezifischer und aktiver zu machen. Diese Fortschritte ermöglichen den biotechnologischen Einsatz der Produzenten und die medizinische Nutzung der produzierten Polyketide.

3.2 Biosynthese von Polyketiden

Die Polyketidbiosynthese weist starke Ähnlichkeit mit der Biosynthese der Fettsäuren auf.¹⁸ Es existieren ähnliche Enzyme, die die einfachen Bausteine wie Acetyl-CoA **5** und Malonyl-CoA **6** zur Endstruktur zusammenfügen. Vollzogen wird dies über sich wiederholende decarboxylierende Claisen-artige Thioesterkondensationen einer aktiven Acyl-Startereinheit mit Malonyl-CoA **6** abgeleiteten Verlängerungseinheiten. Katalysiert werden diese enzymatischen Reaktionen durch Multienzymkomplexe (Fettsäuresynthasen (FAS) und PKS). PKS unterscheiden sich im Gegensatz zu den FAS, da sie unter anderem eine höhere Flexibilität bezüglich der verwendeten Bausteine aufweisen (Abb. 3-2). Außerdem besteht ein Unterschied bezüglich der Reduktion, die an den einzelnen Bausteinen vollzogen wird. FAS vollziehen einen vollständigen reduktiven Zyklus (vgl. Abb. 3-7, A) wogegen bei PKS die Anzahl der Reduktionen variabel ist (vgl. Abb. 3-7 B bis D). Daraus ergeben sich vielfältige Funktionalisierungsmöglichkeiten an Polyketiden, die bei Fettsäuren nicht vorhanden sind. Als Produkt entsteht somit bei der Fettsäurebiosynthese ein vollständig gesättigtes Acyl-Rückgrat, das bei der Polyketidbiosynthese ungesättigte Acylbausteine enthalten kann.

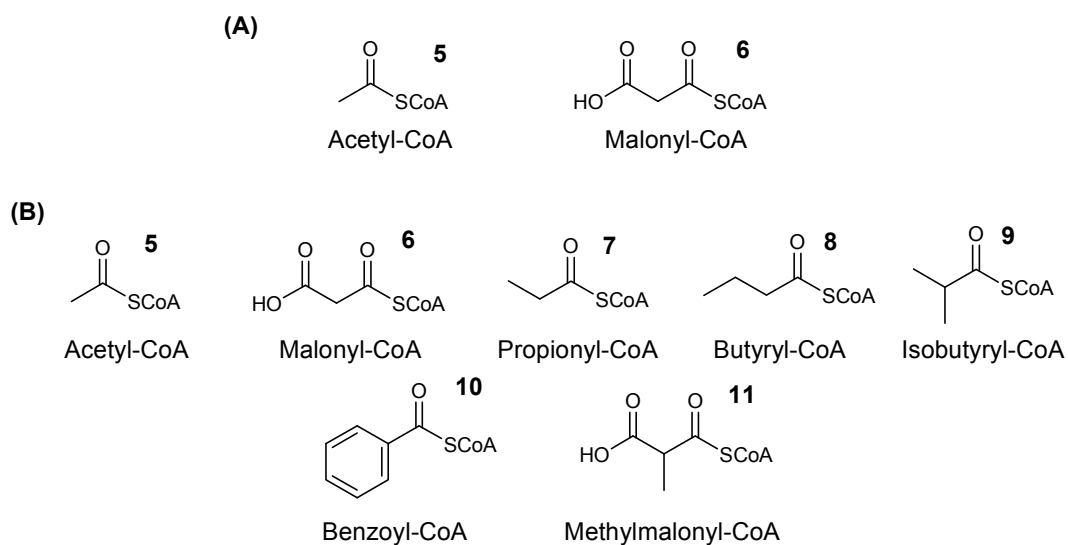


Abb. 3-2: (A) Substrate von FAS, (B) Substrate von PKS.

An der Katalyse der enzymatischen Reaktionen sind verschiedene Enzyme beteiligt. Die β -Ketoacylsynthase (KS), eine Acyltransferase (AT) sowie ein phosphopantetheinyliertes Acylcarrierprotein (ACP) sind bei der Verknüpfung der Polyketidbausteine beteiligt. Der Grad der Reduktion wird über eine Ketoreductase (KR), eine Dehydratase (DH) und eine Enoylreductase (ER) bestimmt. Die Hydrolyse des biosynthetisch hergestellten Produkts von der PKS wird von Thioesterasen (TE) übernommen. Durch die Architektur und Reihenfolge der einzelnen enzymatischen Funktionen wird die Kettenlänge, Oxidationsstufe, der Grad der Verzweigung, die Zyklisierung sowie die Stereochemie der produzierten Moleküle bestimmt. Außerdem können

Polyketide nach der eigentlichen Polyketid-Biosynthese durch *post*-PKS-Enzyme weiter modifiziert und funktionalisiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich modulare Typ I-PKS Systeme (vgl. 3.3) der Pederinfamilie behandelt, daher erfolgt die detaillierte Beschreibung der Biosynthese nur für diese Polyketidfamilie. Einige der beschriebenen Biosyntheseschritte sind natürlich auch in der Biosynthese von Polyketiden vom Typ II und III zu finden.

Vor der Biosynthese des Acyl-Rückgrates werden die ACPs durch eine posttranslationale Modifikation von ihrer inaktiven *apo*-Form in ihre aktive *holo*-Form überführt.¹⁹ Dabei wird Coenzym A **12** (CoA) über eine Phosphodiester-Bindung an ein konserviertes Serin der ACPs kovalent gebunden. Die Katalyse der Reaktion erfolgt durch eine 5`-Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) (Abb. 3-3).

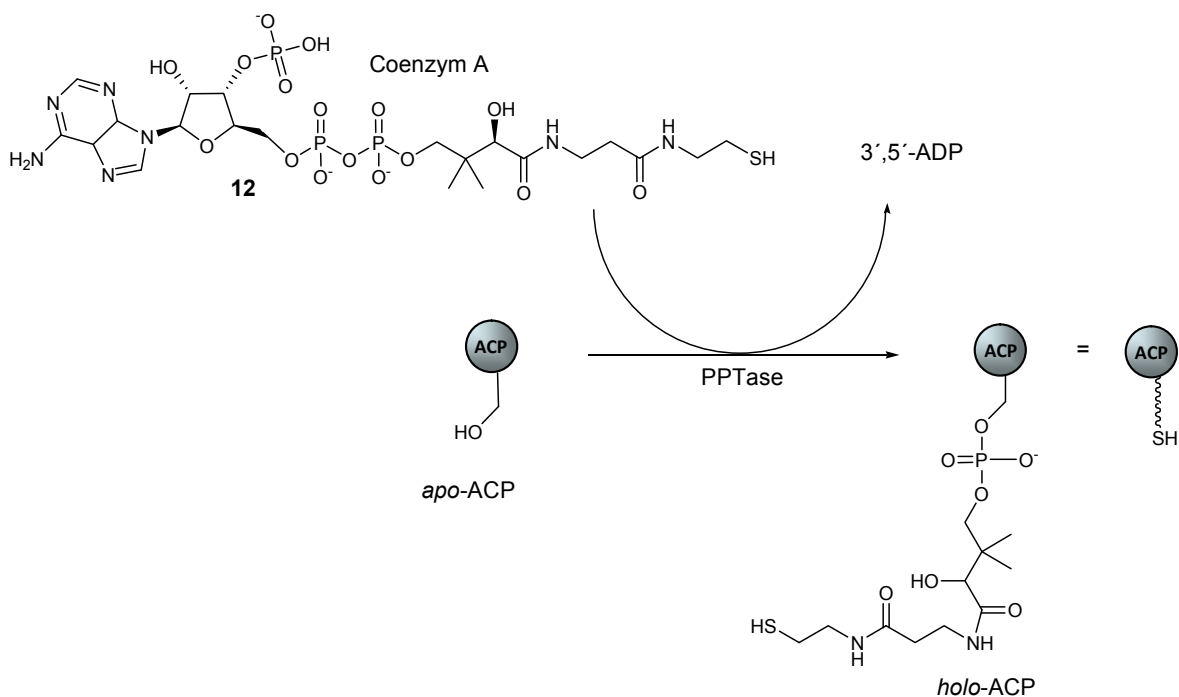


Abb. 3-3: PPTase-katalysierte Reaktion von der inaktiven *apo*-ACP zur aktiven *holo*-ACP.

Daraufhin können die Starter- bzw. Elongationssubstrate durch die AT auf die aktivierten *holo*-ACPs übertragen werden (Abb. 3-4, A). Zur Kettenverlängerung wird im 1. Schritt die Startereinheit vom *holo*-ACP auf ein konserviertes Cystein der KS übertragen und dann an das Elongationssubstrat, das an der nächsten *holo*-ACP lokalisiert ist, unter CO_2 -Abspaltung übertragen. Daraufhin erfolgt wiederum eine Übertragung von dem *holo*-ACP an die nächste KS, die wiederum unter CO_2 -Abspaltung eine Kondensationsreaktion mit dem Elongationssubstrat des *holo*-ACP katalysiert. Abb. 3-4, B zeigt die KS-katalysierte Kettenverlängerung am Beispiel der Übertragung der Startereinheit von der ersten *holo*-ACP auf das Elongationssubstrat der zweiten *holo*-ACP. Die weiteren Reaktionszyklen verlaufen analog, sodass das jeweilige Intermediat an ein konserviertes Cystein der KS übertragen wird und durch Wiederholungen der Claisen-artigen Kondensationsreaktion die Acylkette um jeweils eine Verlängerungseinheit verlängert wird.

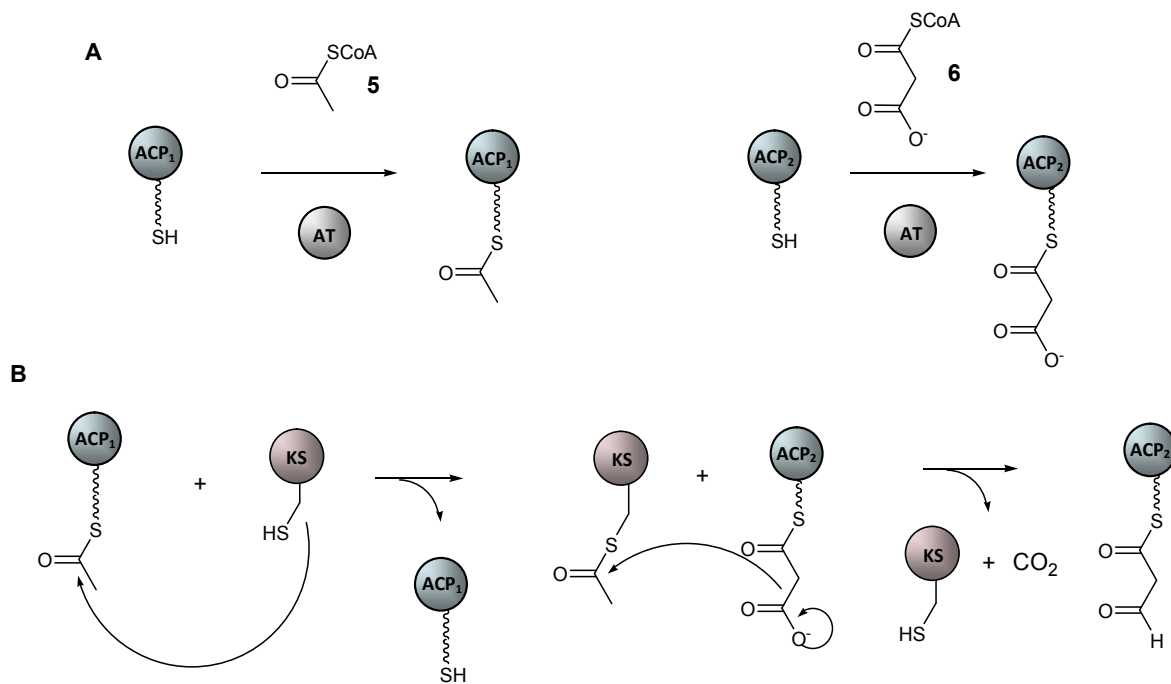


Abb. 3-4: Reaktionen, die zur Kettenverlängerung der Polyketide führen.

(A) AT-katalysierte Substratübertragung auf das *holo*-ACP; (B) Übertragung der Startereinheit von dem ACP auf die KS mit folgender KS-katalysierter Claisen-artiger Kondensation. Der Reaktionsverlauf wird mit Acetyl-CoA 5 als Startersubstrat und Malonyl-CoA 6 als Elongationssubstrat beschrieben. Je nach PKS werden auch andere Substrate verwendet (vgl. Abb. 3-2). ACP₁ und ACP₂ stellen die ACPs von aufeinanderfolgenden Modulen dar. Anstelle von Acetyl-CoA 5 an ACP₁ befindet sich zum Zeitpunkt späterer PKS-Biosyntheseschritte das jeweilige PKS-Intermediat an dem ACP.

Der Reaktionsverlauf ist bei bakteriellen Typ I-PKS dabei nicht-iterativ, sodass jede KS nur eine Kettenverlängerung katalysiert (vgl. 3.3). Die Kettenlänge des Acylrückgrates spiegelt dabei direkt die Anzahl der Module und damit der von der PKS katalysierten Erweiterungszyklen wieder, und das Vorhandensein von KR-, DH- und ER-Domäne bestimmt den Grad der Reduktion (Abb. 3-5).²⁰⁻²²

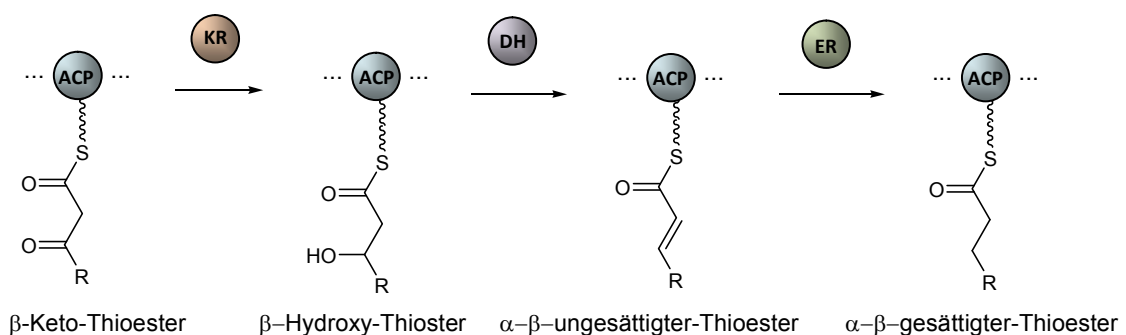


Abb. 3-5: Reduktionsgrad am PKS-Intermediat katalysiert durch KR, DH und ER.

Da das Polyketid direkt die Abfolge der Module und die darin enthaltene Domänen widerspiegelt, wird dieser Zusammenhang als Colinearitätsregel bezeichnet. Sobald alle Reaktionszyklen durchlaufen sind, wird das Produkt von der PKS durch die TE hydrolysiert. Einige Polyketide zyklisieren bei der Hydrolyse.²³ Außerdem können nach der Hydrolyse verschiedene sogenannte

„Tailoring-Enzyme“ Modifikationen am Polyketid katalysieren. Ein Beispiel hierfür ist eine Funktionalisierung des Polyketids mit Zuckern durch Glykosyltransferasen, wie es z.B. bei der Modifikation des von *Saccharopolyspora erythrea* produzierten Polyketids 6-Deoxyerythronolid B zum Erythromycin A **2** der Fall ist (vgl. Abb. 3-6).²⁴

Die Fettsäure-Biosynthese findet im Primärmetabolismus statt, wogegen Polyketide zu den Sekundärmetaboliten gehören. Daher sind die Biosynthesewege funktionell klar voneinander abgegrenzt. Dies spiegelt sich ebenfalls in der Funktion einiger Enzyme wieder. Beispielsweise wird die Aktivierung der inaktiven *apo*-ACPs in die aktiven *holo*-ACPs der FAS durch andere Enzyme gewährleistet als die Aktivierung der ACPs der PKS-Systeme.²⁵⁻²⁷

3.3 Einteilung von PKS

Da die enzymatischen Syntheseapparate von Polyketiden unterschiedliche Strukturen und Funktionen besitzen, werden sie in verschiedene Typen eingeteilt.¹² Die Einteilung erfolgt dabei in Typ I, Typ II und Typ III-PKS (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Polyketid-Synthase Typen sowie Untertypen, verwendete Verlängerungseinheiten und produzierende Organismen.²

PKS-Typ	Verlängerungseinheiten	Organismen
Modulare Typ I-PKS (nicht iterativ) Untertypen: <i>cis</i> -AT, <i>trans</i> -AT	verschiedene Verlängerungseinheiten	Bakterien, Protisten
Iterative Typ I-PKS Untertypen: NR-, PR-, HR-PKS*	nur Malonyl-CoA	hauptsächlich Pilze, einige Bakterien
(iterative) Typ II-PKS	nur Malonyl-CoA	ausschließlich Bakterien
(iterative) Typ III-PKS	nur Malonyl-CoA, bis auf zwei Ausnahmen ^{28,29}	hauptsächlich Pflanzen, einige Bakterien und Pilze
PKS-NRPS-Hybrid	Malonyl-CoA, Aminosäuren	Bakterien (modular) Pilze (iterativ)

*NR (non-reducing)-PKS, PR(partially reducing)-PKS, HR(highly reducing)-PKS.

Typ I-PKS existieren vorwiegend in Bakterien und Pilzen. Erst seit kurzem sind Typ I-PKS auch aus Protozoen wie Dinoflagellaten bekannt.³⁰⁻³² Typ I-PKS besitzen einen modularen Aufbau. Eine weitere Einteilung der Typ I-PKS erfolgt aufgrund der iterativen und nicht-iterativen enzymatischen Katalyse. Im Fall der iterativen PKS katalysiert ein Modul mehrere Kettenverlängerungen des Polyketids. Dieser Typ kommt vorwiegend in Pilzen vor.³³ Ein Beispiel hierfür ist die Lovastatin **15**-Biosynthese.^{33,34} Je nach Grad der Reduktion werden die iterativen Pilz-PKS in NR(non-reducing)-PKS, PR(partially reducing)-PKS und HR(highly reducing)-PKS unterteilt. Obwohl die Katalyse der einzelnen Domänen

mehrfach durchlaufen wird, kann der Grad der Reduktion variieren. Dies bedeutet, dass nicht in jeder Katalyserunde alle Domänen katalytisch aktiv werden. Welche Mechanismen daran beteiligt sind, ob eine Domäne in dem jeweiligen Katalysezyklus aktiv ist oder nicht, ist bisweilen meist unbekannt.²

Bei nicht-iterativen Typ I-PKS katalysiert jedes Modul eine Kettenverlängerung. Diese Enzyme sind typisch für Bakterien und bilden riesige Multienzymkomplexe aus. Am Beispiel der Bacillaen-PKS konnte gezeigt werden, dass die Größe im Bakterium mit der eines Ribosoms vergleichbar ist.³⁵ Die schon lange bekannte und sehr gut untersuchte Erythromycin-PKS besitzt einen multimodularen Aufbau, der einer nicht-iterativen PKS des Typ I entspricht (Abb. 3-6). Die Entdeckung und Untersuchung neuer PKS-Cluster und dessen Polyketide wird durch die Korrelation zwischen modularem Aufbau der PKS und Struktur des Polyketids vereinfacht, da durch die Abfolge der Module die Struktur des Polyketids vorhergesagt werden kann und auf der anderen Seite anhand der Struktur des Polyketids die Architektur der PKS-Module postuliert werden kann. Außerdem ist es möglich durch kombinatorische Biosynthese maßgeschneiderte Polyketide zu erhalten.³⁶ Hierzu wird durch eine veränderte Modulreihenfolge oder Änderungen der Domänenabfolge innerhalb des Moduls die Biosynthese gezielt verändert. Neben reinen Typ I-PKS existieren Mischformen aus Nicht-Ribosomal-Peptid-Synthetasen (NRPS) und Typ I-PKS.²¹ Dies führt auf der Ebene der Polyketide zu Hybriden aus Polyketid-Peptid-Metaboliten.

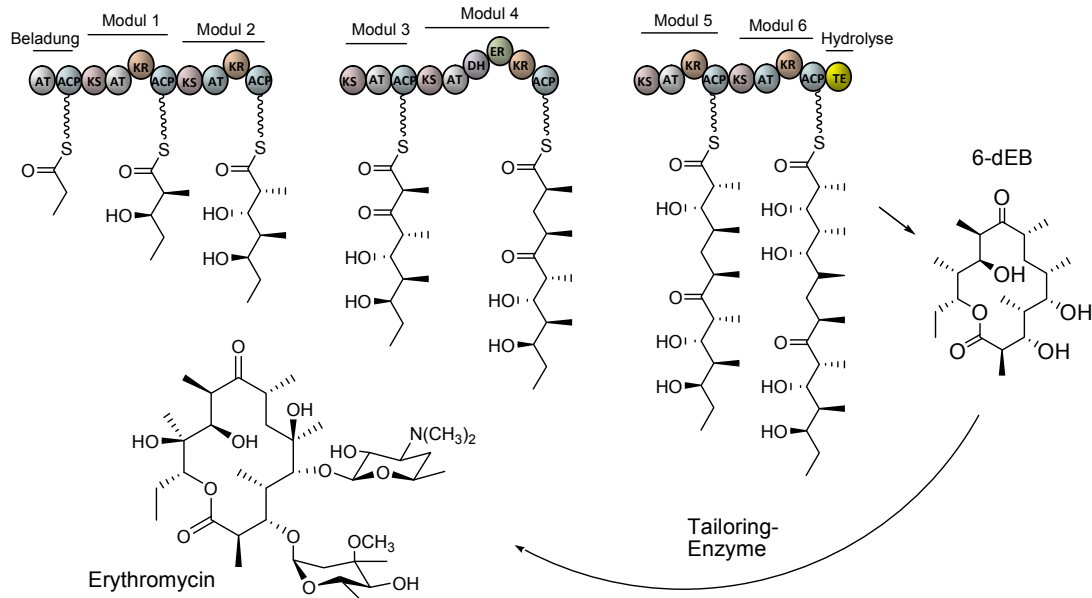


Abb. 3-6: Architektur einer nicht-iterativen Typ I-PKS am Beispiel von Erythromycin A 2.

Die für die Biosynthese des Erythromycin A 2 wichtige Biosynthese des Desoxyerythronolid B 13 (6-dEB) durch die Desoxyerythronolid-B-Synthase (DEBS). Tailoring-Enzyme modifizieren das 6-dEB 13 zum Antibiotikum Erythromycin A 2.²⁴

Einige der nicht-iterativen Typ I-PKS weisen Abweichungen zum oben genannten Schema (Abb. 3-6) auf. Besonderheiten sind dabei, dass einige Module offensichtlich keine Kettenverlängerung durchführen, einige Module mehr als eine Kettenverlängerung katalysieren oder die Struktur des Bausteins in der Polyketidstruktur nicht zur Domänenabfolge im PKS-Modul passt. Diese Besonderheiten treten vornehmlich in „*trans*-AT-PKS“ auf. Diese Untergruppe der nicht-iterativen Typ I-PKS zeichnet sich dadurch aus, dass die AT-Domänen nicht wie bei den herkömmlichen und schon lange bekannten „*cis*-AT-PKS“ in die Module integriert sind, sondern die Substratbeladung der ACPs durch freistehende, akzessorische ATs gewährleistet wird.^{37,38} Da die in dieser Arbeit untersuchten PKS-Systeme zu diesem Untertyp gehören, erfolgt deren Beschreibung unter Abschnitt 3.3.1.

Typ II-PKS kommen ausschließlich in Prokaryoten vor. Bis auf die Biosynthese des Anthrachinon aus *Photorabdus luminescens*³⁹ und die Biosynthese des Alkaloids Aurachin aus *Stigmatella aurantiaca*⁴⁰ stammen alle bisher bekannten Typ II-PKS Systeme aus Actinomyceten.² Die Biosynthese der Polyketide wird bei dieser Gruppe von PKS durch nichtmodulare, iterativ arbeitende Systeme durchgeführt. Es existieren zwei KS-Einheiten (KS_{α} und KS_{β}) sowie ein ACP. Dieser Aufbau wird als Minimal-PKS bezeichnet und ist für die Biosynthese der Polyketidkette verantwortlich. Weitere Enzyme, wie z.B. Ketoreductasen, Cyclasen, Aromatasen bestimmen die Funktionalisierung sowie das Faltungsmuster der Kette und agieren als akzessorische Proteine.²

Typ III-PKS waren lange Zeit nur aus Pflanzen bekannt. Mittlerweile wurden diese Systeme allerdings auch in Bakterien^{41,42} und Pilzen⁴³ gefunden. Die enzymatischen Systeme der Chalcon/Stilben-Synthasen, die für die Biosynthese dieser Polyketide verantwortlich sind, sind multifunktionell. Von ihnen wird die Startereinheit ausgewählt, die Kettenverlängerung katalysiert und ebenfalls die Faltung und Funktionalität des Polyketids katalysiert. Die Größe des Hohlraums innerhalb des Enzyms legt in Analogie zu den FAS die Länge des Polyketids fest.²

Desweiteren sind verschiedene Mischformen von PKS bekannt. Sie werden als PKS-Hybride bezeichnet. Es existieren Hybride aus z.B. Typ III/Typ I, Typ I/Typ II und FAS/PKS.²

Zum Vergleich der verschiedenen Systeme zeigt Abb. 3-7 eine FAS sowie eine iterative Typ I-PKS, eine Typ II- und eine Typ III-PKS. Als Beispiel einer nicht-iterativen Typ I-PKS wurde bereits in Abb. 3-6 die Erythromycin A 2-Biosynthese veranschaulicht.

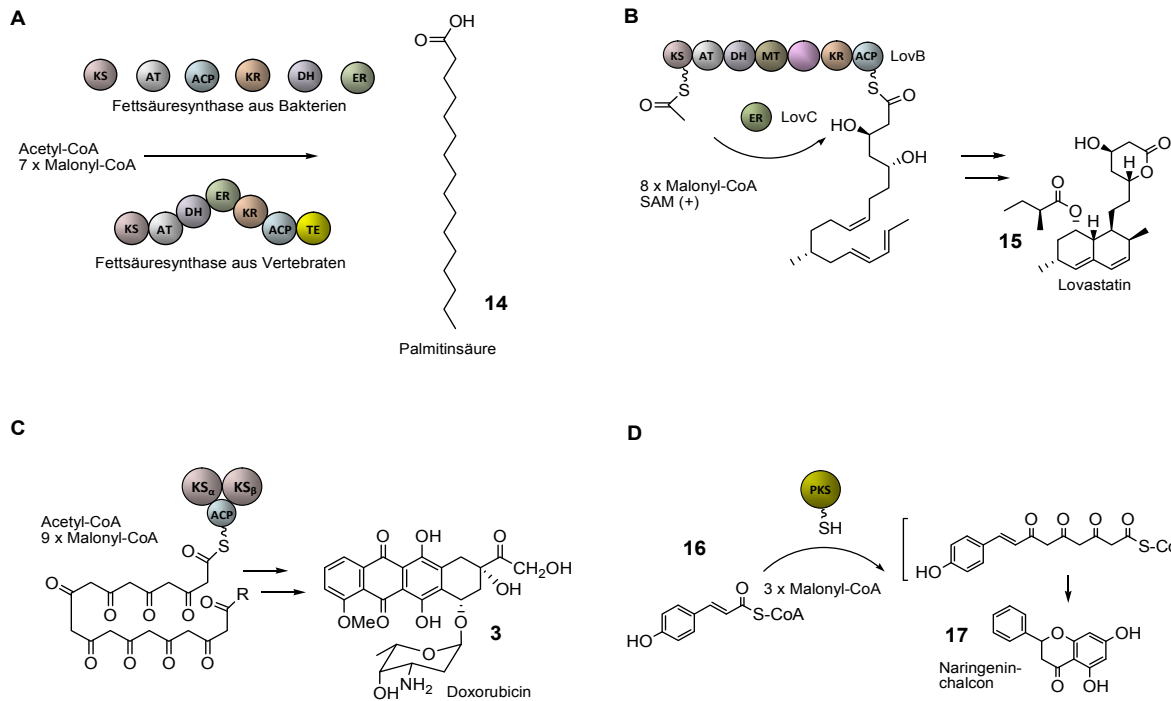


Abb. 3-7: Aufbau und Biosynthese von FAS und PKS.

(A) FAS von Bakterien und Vertebraten. (B) Iterative Typ I-PKS am Beispiel der Lovastatin 15-Biosynthese.² (C) Typ II-PKS am Beispiel der Doxorubicin 3-Biosynthese.² (D) Typ III-PKS am Beispiel der Naringenin-chalcon 17-Biosynthese.²

3.3.1 Modulare *trans*-AT Typ I-PKS

Wie bereits erwähnt, existiert unter den Typ I-PKS Systemen der Untertyp der *trans*-AT PKS. Der erste *trans*-AT Gencluster, der gefunden wurde, stammte aus *Bacillus subtilis*.⁴⁴ Allerdings konnte dem Gencluster zu Beginn kein Produkt zugeordnet werden. Mittlerweile stellte sich Bacillaen **30** als Metabolit des Clusters heraus.^{45,46} Das erste Polyketid, welches direkt einem putativen *trans*-AT Gencluster zugeordnet werden konnte, war Pederin **20**.³⁸ *Trans*-AT PKS unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht bezüglich der herrkömmlichen Gruppe der *cis*-AT PKS. Bei *trans*-AT PKS Systemen fehlen im Gegensatz zu den *cis*-AT PKS Systemen die intramodularen Substrat-übertragenden AT-Domänen. Die Acylierung der ACPs in den einzelnen Modulen wird stattdessen durch freistehende ATs übernommen (Abb. 3-8).

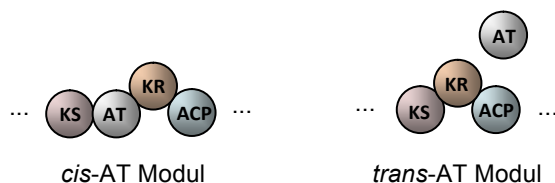


Abb. 3-8: Architektur von *cis*- und *trans*-AT-PKS Modulen.

Die Architektur des Moduls mit KS, KR und ACP-Domänen wurde willkürlich ausgewählt und dient nur als Beispiel. Die Funktion der ATs ist in beiden Modultypen gleich.

In bisher entdeckten *trans*-AT PKS-Clustern existieren ein bis drei der akzessorischen ATs. Sie existieren als einzelne Gene, liegen als Tandem-ATs vor oder sind fusioniert mit Oxidoreductase Domänen. Letztere haben dabei die Funktion einer in *trans* agierenden ER.⁴⁷ Für die iterative Substratübertragung auf die einzelnen Module sind die Tandem-ATs oder einzelnen ATs zuständig was zuerst für den Leinamycin-Gencluster durch *in vitro* Experimente gezeigt werden konnte.³⁷

Neben experimentellen und biosynthetischen Untersuchungen der *trans*-AT Gencluster wurde auch ihre Phylogenie untersucht. Diese Analysen ergaben, dass sich *cis*- und *trans*-AT Gencluster evolutiv völlig unabhängig voneinander aus einfachen FAS-Systemen entwickelt haben (Abb. 3-9).⁴⁸

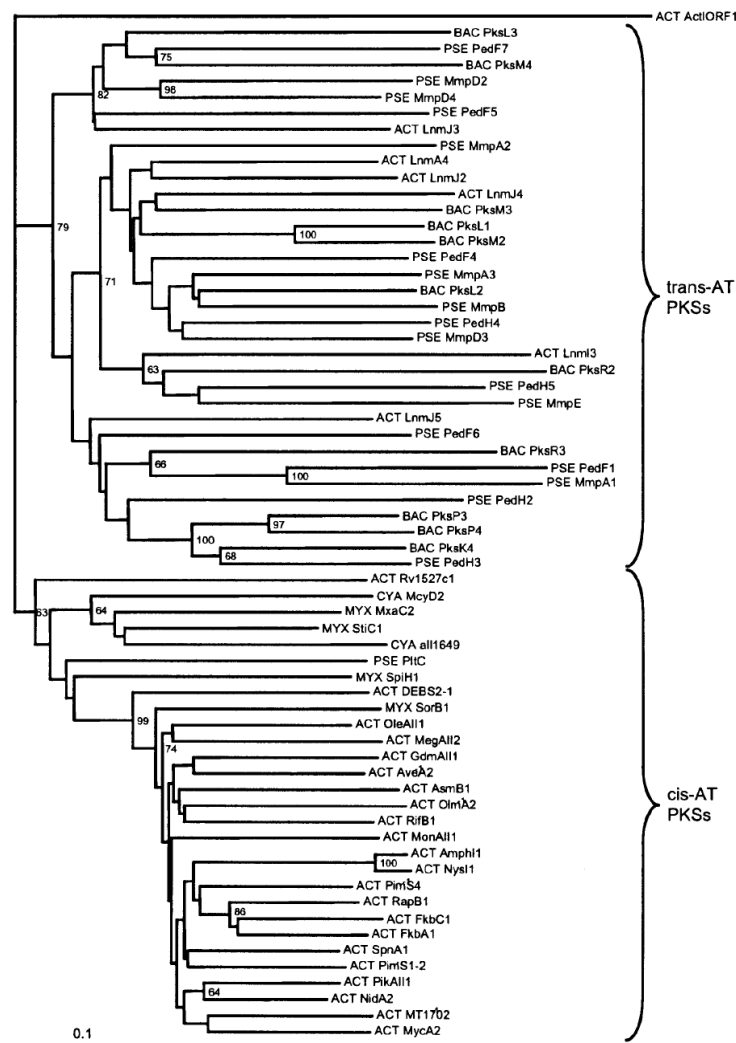


Abb. 3-9: Phylogenetische Analyse der KS-Domänen von *cis*-AT und *trans*-AT PKSs.⁴⁸

Außerdem legen weitere phylogenetische Studien nahe, dass die beiden Systeme über unterschiedliche evolutive Mechanismen entstanden sind. *Cis*-AT Gencluster scheinen durch Duplikationen einzelner Module entstanden zu sein, worauf eine optionale Änderung in den einzelnen Domänen der Module erfolgte.⁴⁹ *Trans*-AT Gencluster bilden dagegen DNA-Mosaik

Strukturen, die sich wahrscheinlich als Konsequenz multipler horizontaler Gentransfers zwischen Bakterien ausgebildet haben und aus der Assemblierung von einzelnen Teilen ganzer Gencluster zusammengefügt wurden.⁵⁰ Unbekannt ist bisher, warum diese strikt getrennten evolutiven Wege sich entwickelt haben, da die Mechanismen und Endprodukte der Biosynthesen doch sehr ähnlich sind.

Die aus der Evolution resultierenden getrennten Entwicklungen in der Architektur der PKS weisen nicht nur die oben genannten Unterschiede bezüglich der in *trans* agierenden Enzyme auf, sondern es ergeben sich auch zahlreiche weitere Unterschiede bezüglich der Architektur und der katalysierten Reaktionen. Ein Vergleich zwischen *trans*-AT- und *cis*-AT-PKS ergibt, dass eine weitaus höhere Diversität hinsichtlich der Funktionen der Module besteht. Diese gesteigerte Anzahl von Modularchitektur-Polyketidstruktur-Beziehungen ergibt sich aus häufigen, ungewöhnlichen Anordnungen der Domänen innerhalb der Module, der Integration neuer Domänen oder sich wiederholender Domänen sowie aus Modulen, die scheinbar nicht zur Biosynthese der resultierenden Polyketide passen. Ein Beispiel für die ungewöhnliche Domänenarchitektur stellt ein Modul dar, welches aus einer KS, mehreren optionalen Domänen und zwei oder mehreren, aufeinanderfolgenden ACPs besteht. Diese Modularchitektur ist aus *cis*-AT Genclustern, bis auf wenige Ausnahmen in Cyanobakterien^{51,52}, nicht bekannt. Beteiligt sind solche Module unter Beteiligung verschiedener akzessorischer Proteine bei der Einführung von β -Verzweigungen in die wachsende Polyketidkette.⁵³

Einerseits führt die Vielfalt in der Modularchitektur zu einer gesteigerten Diversität der Polyketide, andererseits wird es schwieriger, aus der PKS-Architektur direkt die Struktur abzuleiten, da aus der Domänenabfolge nicht direkt die Struktur abgelesen werden kann, wie dies bei *cis*-AT PKS der Fall ist. Gleichzeitig wird es auch schwieriger, Gencluster zu identifizieren, deren Metabolite bereits bekannt sind.

Allerdings zeigen neue Ansätze, dass aus biosynthetischen Studien und phylogenetischen Studien Regeln für die Biosynthese der *trans*-AT PKS erstellt werden können.⁵⁰ Grundlage hierfür bildet die phylogenetische Analyse der KS-Domänen. Dabei zeigte sich, dass über die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den KS-Domänen vorausgesagt werden kann, welche Ansprüche an das zu prozessierende Polyketidintermediat (z.B. Startereinheit, α -methyliert, α,β -ungesättigt, β -hydroxyliert, reduziert) existieren (Abb. 3-10).

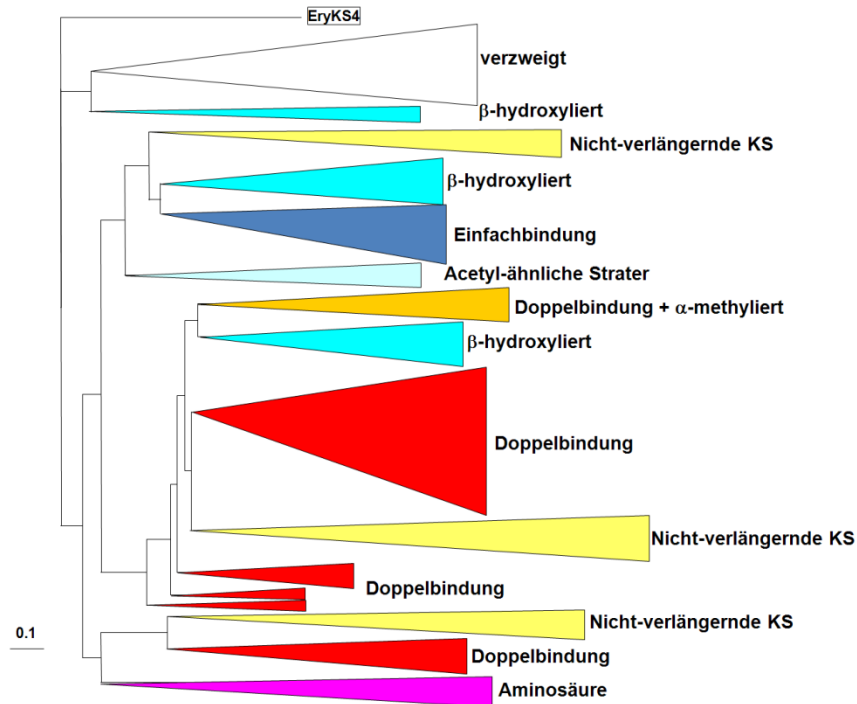


Abb. 3-10: Phylogenetische Analyse der KS-Domänen von *trans*-AT PKS.⁵⁰

Diese Phylogenie ist bei einem Vergleich mit KS-Domänen aus *cis*-AT Genclustern völlig gegensätzlich, da in diesen die phylogenetische Einteilung der verwandschaftlichen Beziehungen der *cis*-AT Gencluster zueinander entspricht (Abb. 3-11).⁴⁹

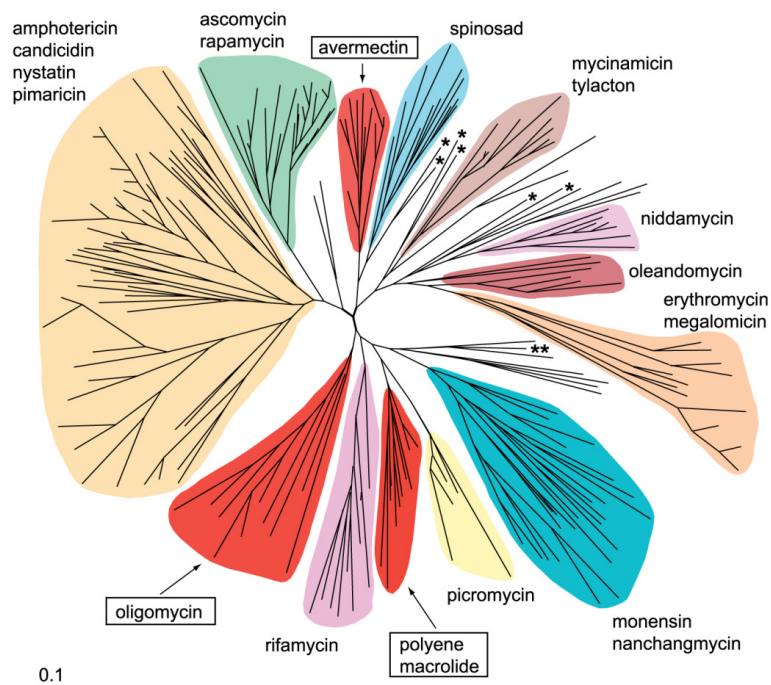


Abb. 3-11: Phylogenetische Analyse der KS-Domänen von *cis*-AT PKS.⁴⁹

Durch erwähnte Beziehungen in *trans*-AT Clustern kann über eine phylogenetische Analyse der KS-Domänen, innerhalb einer PKS direkt die Struktur des Polyketids vorausgesagt werden. Neu

entdeckte KS-Domänen von *trans*-AT Genclustern können über die bioinformatische Einordnung in diesen Baum bezüglich des prozessierten Intermediats charakterisiert werden. Die Anwendung dieser Methoden führte zur erfolgreichen Vorhersage der Polyketid-Struktur eines *trans*-AT Gen-Clusters aus *Burkholderia thailandensis* und der damit verbundenen Detektion von Thailandamid A und B.⁵⁰

Gleichzeitig folgen aus der Analyse Konsequenzen für die Biosynthese von nicht-natürlichen Polyketiden durch rekombinante Techniken. Es kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, welche Module miteinander rekombiniert werden können und zu einer funktionierenden Polyketidbiosynthese führen würden.

3.3.2 NRPS-PKS-Hybride

In Pilzen und Bakterien existiert eine weitere Gruppe von Megasyntasen, die ebenfalls hochaktive Naturstoffe in Form von Peptiden biosynthetisch produziert.⁵⁴ Aufgrund der Bioaktivitäten zählen diese Peptide zu den wichtigsten Quellen für antibakterielle, antifungale, immunsuppressive, antivirale und antitumorale Wirkstoffe.⁵⁵ Dazu gehören unter anderen die β -Lactame, wie Penicillin und Cephalosporin.

Im Gegensatz zur ribosomalen Proteinbiosynthese können bei der Biosynthese dieser Peptide nicht nur proteinogene sondern auch hunderte von nicht proteinogenen Aminosäuren verwendet werden. Weitere Strukturelemente können heterozyklische Elemente, D-Aminosäuren sowie glykosylierte und *N*-methylierte Elemente sein.⁵⁶ Die Biosynthese wird dabei durch NRPS katalysiert. Die Strukturen in Abb. 3-12 zeigen zwei Beispiele, die von NRPS hergestellt werden. Das Vancomycin **18** wird von Actinomyceten produziert und hat antibiotische Aktivität,^{57,58} Hormaomycin **19** wird von *Streptomyces griseoflavus* W384 produziert⁵⁹ und hat verschiedene Bioaktivitäten. Es kann beispielsweise eine Sporulation hervorrufen, die Antibiotikaproduktion in anderen Actinomyceten anregen und hat antibiotische Wirkung gegen Gram-positive Bakterien.⁵⁹

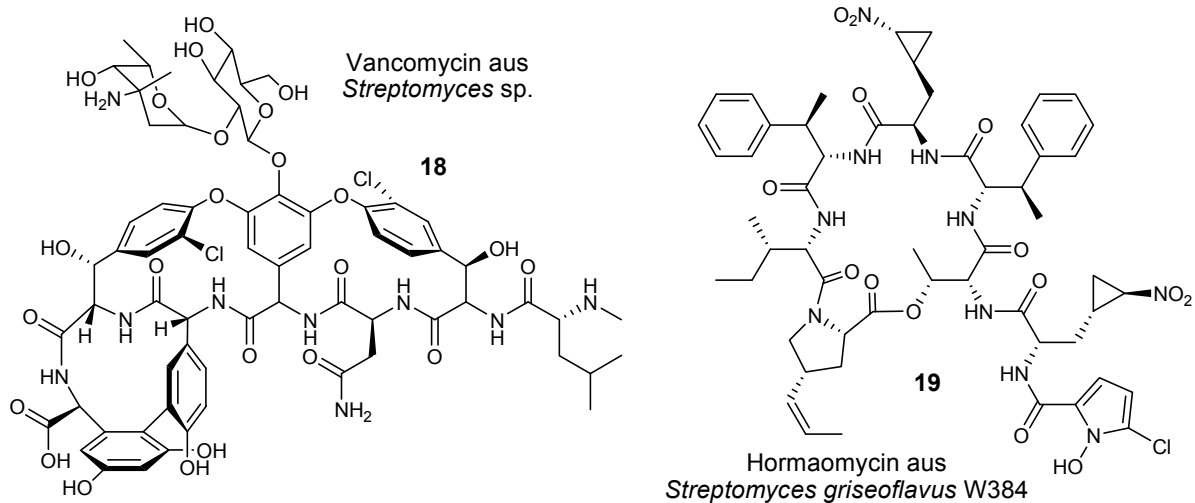


Abb. 3-12: Nichtribosomale Peptide mit Produzenten.

Der Aufbau der NRPS ähnelt durch die modulare Architektur dem Aufbau der PKS. Die Module enthalten dabei mindestens drei Domänen. Eine Adenylierungsdomäne (A-Domäne), die Kondensationsdomäne (C-Domäne) sowie ein Peptidylcarrierprotein (PCP-Domäne). Auch die Funktionsweise der einzelnen Domänen ist vergleichbar mit der Funktionsweise der Polyketidsynthase-Domänen. Das Peptidylcarrierprotein wird durch eine posttranslationale Modifikation aktiviert. Hierfür ist, wie bei den ACPs der PKS, eine PPTase zuständig. Daraufhin wählt die A-Domäne die Aminosäure aus und transferiert sie durch eine ATP-katalysierte Reaktion auf das aktivierte PCP. Die C-Domäne katalysiert die Peptidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren. Daher kann die A-Domäne mit der AT und die C-Domäne mit der KS bei der Polyketidbiosynthese verglichen werden. Dem Initiierungsmodul fehlt eine C-Domäne, da das erste Modul keine Kondensation von Peptiden katalysieren muss. Ebenfalls vorhanden sind intermodulare, optionale Domänen. Dabei handelt es sich bei den NRPS um Epimerisierungs-Domänen (E-Domänen), die eine Umwandlung von L- in D-Aminosäuren katalysieren sowie verschiedene N-Methylierungs, Oxidations- und Reduktionsdomänen. Der Katalysezyklus der einzelnen Module kann, wie bei PKS, linear, nicht-linear oder iterativ erfolgen.

Wie schon erwähnt, existieren NRPS-PKS-Hybride. Die resultierenden Polyketid-Peptid Strukturen beinhaltet Aminosäuren und kurzkettige Carbonsäuren.⁶⁰ Diese Kombinationen der unterschiedlichen Module war aufgrund der funktionellen Verwandtschaft von PKS und NRPS in der evolutiven Entwicklung der Gencluster möglich.⁵⁴

Beispiele für diese NRPS-PKS-Hybride sind die in dieser Arbeit betrachteten Pederin- und Psymberin-Enzyme.^{38,61} Weitere Metabolite, die auf Basis dieser Hybride produziert werden sind das Epothilon D,⁶² Jamaicamid A⁵¹ und Myxothiazol A.⁶⁰

3.4 Substanzen der Pederinfamilie

Der erste Metabolit, der einem *trans*-AT Gencluster zugeordnet werden konnte, war das Pederin **20**.³⁸ Pederin **20** ist der Namensgeber einer ganzen Gruppe von Naturstoffen, die sich neben anderer biologisch wichtiger Eigenschaften durch hochinteressante Bioaktivitäten gegenüber Tumorzellen auszeichnet.⁶³ Weitere Vertreter der Pederinfamilie sind beispielsweise das Psymberin **21**,⁶⁴ Onnamid A **22**⁶⁵ und Mycalamid A **23**^{66,67} (Abb. 3-13).

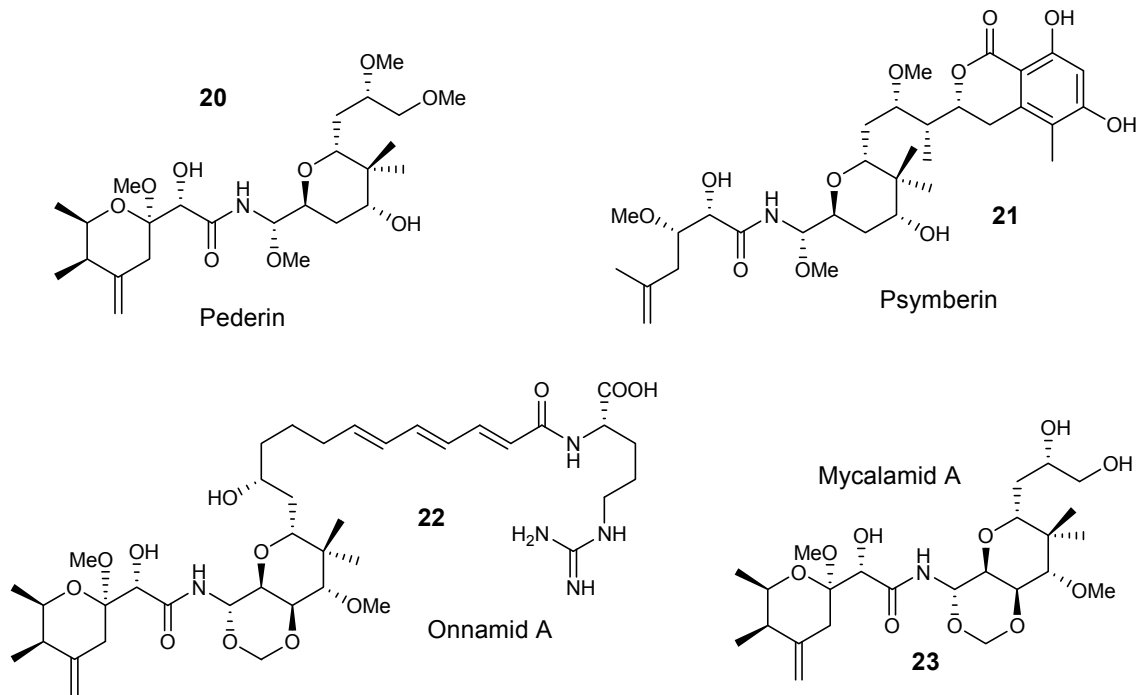


Abb. 3-13: Substanzen der Pederinfamilie.

Pederin **20** ist in der Hämolymphe von Käfern der Gattung *Paederus* und *Paederidus* vorhanden.⁶⁸ Die anderen Vertreter der Pederinfamilie stammen häufig aus Schwämmen und wurden bei der Suche nach pharmakologisch aktiven Substanzen entdeckt.⁶³ In den Organismen dienen die Substanzen der Pederinfamilie häufig zur Verteidigung gegenüber Frassfeinden.^{63,69} Ihre Biosynthese erfolgt nicht durch die Käfer oder Schwämme selbst, sondern durch bakterielle Symbionten.^{38,65,70} Die Naturstoffe und deren Bioaktivitäten sind zeitlich vor der Entdeckung der entsprechenden Genclustern bekannt gewesen. Aufgrund ihrer hochinteressanten Eigenschaften lag das Bestreben in der Identifikation der Produzenten, der Isolierung der Biosynthesegene sowie der Aufklärung der Mechanismen der Biosynthese, insbesondere deshalb, weil die Substanzen eine begrenzte Bioverfügbarkeit aufweisen. Dieses Bestreben zeigt sich beispielsweise an dem Aufwand, der betrieben wurde, um genügend Substanz für Strukturaufklärungen zu erhalten. Beim Psymberin **21** waren 600 Schwammextrakte von *Psammocinia* aff. *bulbosa* erforderlich, die über 11 Jahre Arbeit erhalten wurden.⁶⁴ Bei Pederin **20** wurden allein für die Bestimmung der Summenformel und zum Erhalt erster Strukturansätze 25 Millionen Käfer gesammelt und extrahiert.⁷¹ Die Isolierung der entsprechenden Gene stellt ebenfalls

eine enorme Herausforderung dar, da beispielsweise in Schwämmen eine enorme Diversität an symbiontischen Mikroorganismen herrscht.^{72,73} Die molekularbiologischen Fortschritte der letzten Jahrzehnte ermöglichte es jedoch die Gesamt-DNA des Wirts und der Symbionten (auch als metagenomische DNA bezeichnet) zu isolieren und aus der komplexen DNA-Vielfalt die Gene zu identifizieren, die für die Biosynthese der Polyketide zuständig sind.^{74,75} Diese Fortschritte haben auch ein gewaltiges biotechnologisches Potential, da die isolierten Gencluster auf kultivierbare Mikroorganismen übertragbar sind und die Produktion der Substanzen die begrenzte Verfügbarkeit überwinden könnte. Auf diese Weise könnten neue Therapeutika auf Basis der Polyketide entwickelt werden.

Das Interesse, die Polyketide der Pederinfamilie durch eine nachhaltige Produktion für pharmakologische Fragestellungen zugänglich zu machen, begründet sich auch aus den bereits bekannten Bioaktivitäten. Pederin **20** wirkt beispielsweise in Konzentrationen von 1,5 ng pro mL als Inhibitor der Proteinbiosynthese und DNA-Synthese in eukaryotischen Zellen und induziert dadurch bei einigen Zelllinien Apoptose.⁷⁶ Spätere Studien zeigten, dass die IC₅₀-Werte von Pederin **20** bei einigen Tumorzelllinien im subnanomolaren Bereich liegen und es die Lebensdauer von Mäusen mit soliden Tumoren erhöhen kann.⁶³ Psymberin **21** wurde parallel von der Arbeitsgruppe Crews aus dem Schwamm *Psammocinia* aff. *bulbosa* und von der Arbeitsgruppe Pettit als Irciniastatin A aus dem Schwamm *Ircinia ramosa* entdeckt.^{64,77,78} In weiteren pharmakologischen Untersuchungen zeigte sich, dass Psymberin **21** hochselektiv gegen solide Tumore wirkt.⁶⁴ Weitere interessante Aktivitäten zeigten Onnamid A **22** und Theopederin B, da sie ebenfalls im nanomolaren Bereich gegen verschiedene Zelllinien cytotoxische Aktivität aufweisen und bei HeLa-Zellen die Apoptose induzieren sowie inhibierend auf die Proteinbiosynthese wirken.⁷⁹ Als weiteres Beispiel sollen an dieser Stelle die Substanzen Mycalamid A **23** und B aufgeführt werden. Auch sie besitzen starke Wachstumsinhibierende Wirkung auf verschieden humane Tumorzelllinien (u. a. HL-60, HT-29, A549 Tumorzelllinien, B16 Melanomzelllinie, Lewis Lungenkarzinom Zelllinie, M5076 Ovarien Sarkomzelllinie, Kolon 26 Karzinomzelllinie und humane MX-1, CX-1, Burkitt's Lymphom Tumorzelllinie sowie P388 Leukämie Zelllinie)⁶⁶ und weisen ebenfalls antivirale Wirkung auf.⁶⁷

3.4.1 Pederin und dessen Biosynthese

Wie erwähnt, kann das cytotoxische Pederin **20** in Käfern der Gattung *Paederus* und *Paederidus* gefunden werden. Die Käfer nutzen Pederin **20** als chemische Waffe, um sich und ihre Nachkommen vor Fraßfeinden zu schützen.⁶⁹ Die Weibchen der Käfer geben das Toxin über die Eier an ihre Nachkommen weiter, wo es in den Larven gespeichert werden kann.⁶⁸ So werden Pederin **20** enthaltende Larven geschützt, wogegen Pederin **20**-lose Larven gefressen werden.⁶⁹ Interessanterweise enthalten nicht alle Käfer Pederin **20** in großen Mengen. 85 % der Weibchen

((+)-Weibchen) enthalten Pederin **20** in hohen Konzentrationen in der Hämolymphe. Dagegen enthalten die restlichen 15 % der Weibchen ((-)-Weibchen) und die Männchen nur geringe Konzentrationen Pederin **20**. In den Männchen und (-)-Weibchen bleibt die Menge Pederin **20** über den Lebenszyklus konstant. Allerdings steigt die Pederin **20**-Menge in den (+)-Weibchen über den Lebenszyklus an und weist darauf hin, dass eine Pederin **20**-Produktion vorliegt. Gleichzeitig sind nur in diesen Käferweibchen die Pederin **20**-Konzentrationen hoch genug um die Larven ausreichend mit Pederin **20** zu versorgen. Überträgt man jedoch die Eier der (+)-Weibchen auf (-)-Weibchen, so produzieren auch diese Käfer Nachkommen, die Pederin **20** produzieren können.⁶⁸ Somit lag nahe, dass die eigentliche Produktion von Pederin **20** nicht vom Käfer selbst erfolgte.

Mittlerweile ist bekannt, dass es sich beim Pederin-Produzenten um bakterielle Symbionten des Käfers handelt. Dies ergaben Studien, die der Isolierung des putativen Biosynthese-Genclusters von Pederin **20** aus metagenomischen Studien dienten.^{38,70,80} Neben dem putativen Pederin-Gencluster wurden Gene, ORFs, Insertionssequenzen und Transposons gefunden, die eine große Ähnlichkeit zu DNA-Regionen von *Pseudomonas aeruginosa* aufwiesen.⁸¹ Weiterhin zeigten auch 16s rRNA-Analysen, dass in (+)-Käferweibchen ein Bakterium vorhanden ist, das Verwandtschaft zu *Pseudomonas aeruginosa* aufweist.⁸²

Zeitlich früher wurden ebenfalls schon Daten generiert, die einen symbiontischen, bakteriellen Pederin-Produzenten nahe legen. Einerseits wies die schon erwähnte Übertragung der Eier von (+)-Käferweibchen auf (-)-Käferweibchen daraufhin, dass die genetische Information nicht in den Eiern selbst gespeichert ist, sondern exogen von einem bakteriellen Symbionten aus den (+)-Käferweibchen stammt. Zusätzlich wird dieser Effekt durch eine Behandlung der Eier mit Antibiotika vor der Übertragung auf die nicht produzierenden (-)-Käfer behindert.⁸³ Zum Anderen konnte festgestellt werden, dass eine Behandlung der Eier mit Kälte und Hitze vor der Übertragung ebenfalls einen Effekt auf die Pederin **20**-Produktion der Nachkommen hat. Diese Ergebnisse wiesen zusätzlich auf einen Symbionten hin und legten keine Sporenbildung nahe.⁸⁴

Alle Daten legen somit einen bakteriellen symbiontischen Pederin **20**-Produzenten nah. Ähnliche Ergebnisse konnten für Polyketide der Bryostatinreihe gezeigt werden. Hier wurde ebenfalls bewiesen, dass die Gene der Polyketidproduktion auf „*Candidatus Endobugula sertula*“ liegen, einem bakteriellen Symbionten des marinen Moostierchens *Bugula neritina*.⁵

Interessanterweise stammen alle übrigen bisher bekannten Polyketide der Pederinfamilie aus Schwämmen. Daher sind Analysen bezüglich der evolutiven Abstammung der Gencluster sehr interessant. Es könnte sein, dass sich der Pederin-Gencluster als sogenannte Genominsel über

horizontalen Gentransfer in das Bakteriengenom integriert hat⁸¹ und sich daraufhin durch genetische Adaption des Bakteriums und des Käfers eine Symbiose ausgebildet hat.³⁸

Pharmakologisch weist Pederin **20**, wie schon erwähnt, hervorragende antitumorale Wirkung auf. Jedoch kann durch den direkten Kontakt der Haut mit den Käfern eine Dermatitis auftreten. Diese äußert sich durch das Auftreten von Läsionen, Vesikel und Pusteln.⁶⁹ Besonders häufig tritt diese Form der Kontakt-Dermatitis in Gebieten auf, wo die Käfer beheimatet sind. Klimatisch gesehen sind es heiße Gegenden wie die Türkei und Indien.^{85,86} Historisch werden sogar drei der zehn biblischen Plagen auf ein massenhaftes Vorkommen der Käfer zurückgeführt.⁸⁷

Durch die Entdeckung des Genclusters wurden zahlreiche Möglichkeiten zur Produktion und zur Erforschung der Biosynthese erschlossen. Eine Kultivierung des Organismus war bislang nicht erfolgreich, sodass der Gencluster die einzige Ressource darstellt, die eine Erforschung der Biosynthese sowie eine biotechnologische Produktion von Pederin **20** ermöglicht. Mehrere Totalsynthesen konnten zwar erfolgreich durchgeführt werden, zeigten sich aber als unwirtschaftlich durch die Anzahl der notwendigen Syntheseschritte.⁸⁸⁻⁹⁰

Der Pederin-Gencluster codiert für ein PKS-NRPS Hybrid vom Typ I. Die AT-Domänen agieren in *trans*. Große Teile konnten durch das Screenen von metagenomischen DNA-Bibliotheken entdeckt werden.^{38,80} Ein weiterer Teil wurde durch die Sequenzierung des Symbiontengenoms identifiziert.⁷⁰ Bezüglich der genomischen Lokalisation konnte festgestellt werden, dass drei Bereiche existieren, die in unterschiedlichen Abschnitten des Genoms lokalisiert sind. Es handelt sich somit um einen „ungeclusterten Gencluster“.⁸⁰ Diese scheinen aufgrund der Tatsache, dass bei der Typ I *trans*-AT PKS des Bryostatin dieses Phänomen ebenfalls auftritt, durchaus bei symbiontischen PKS-Clustern vorzukommen.⁵ Aufgrund der vorhandenen enzymatischen Funktionen, die auf dem Gencluster kodiert sind, konnte eine Biosynthese postuliert werden (Abb. 3-14).⁷⁰

Funktionelle Studien an den entsprechenden Enzymen des Genclusters konnten bereits an *O*-Methyltransferasen (MT) und ATs durchgeführt werden und beweisen die Funktionalität des Genclusters.^{91,92} Weitere Biosyntheseschritte konnten über die Colinearitätsregel⁹³ für PKS-Systeme bzw. über die Colinearitätsregel für *trans*-AT PKS Systeme⁵⁰ hergeleitet werden. Eine weitere Beschreibung von ungewöhnlichen Biosyntheseschritten erfolgt unter 3.4.3.

3.4.2 Psymberin und dessen Biosynthese

Psymberin **21** wurde, wie erwähnt, parallel von zwei Arbeitsgruppen entdeckt und ist von der Arbeitsgruppe Crews aus dem Schwamm *Psammocinia* aff. *bulbosa* sowie unter dem Namen Irciniastatin A aus dem Schwamm *Ircinia ramosa* von der Arbeitsgruppe Pettit isoliert worden.^{64,78} Gesammelt wurden die Schwämme in Malaysia bzw. Papua Neuguinea. Die endgültige Strukturaufklärung und stereochemische Charakterisierung konnte aufgrund der Totalsynthese von Psymberin **21** realisiert werden.⁷⁷ Weitere Synthesen von Psymberin-Analoga zeigten, dass die Dihydro-Isocoumarin-Einheit der Struktur für die pharmakologische antitumorale Wirkung sehr wichtig ist.⁹⁴ Erst seit kurzem, ist der Biosynthese-Gencluster bekannt, wodurch eine Biosynthese postuliert werden konnte (Abb. 3-15).⁶¹

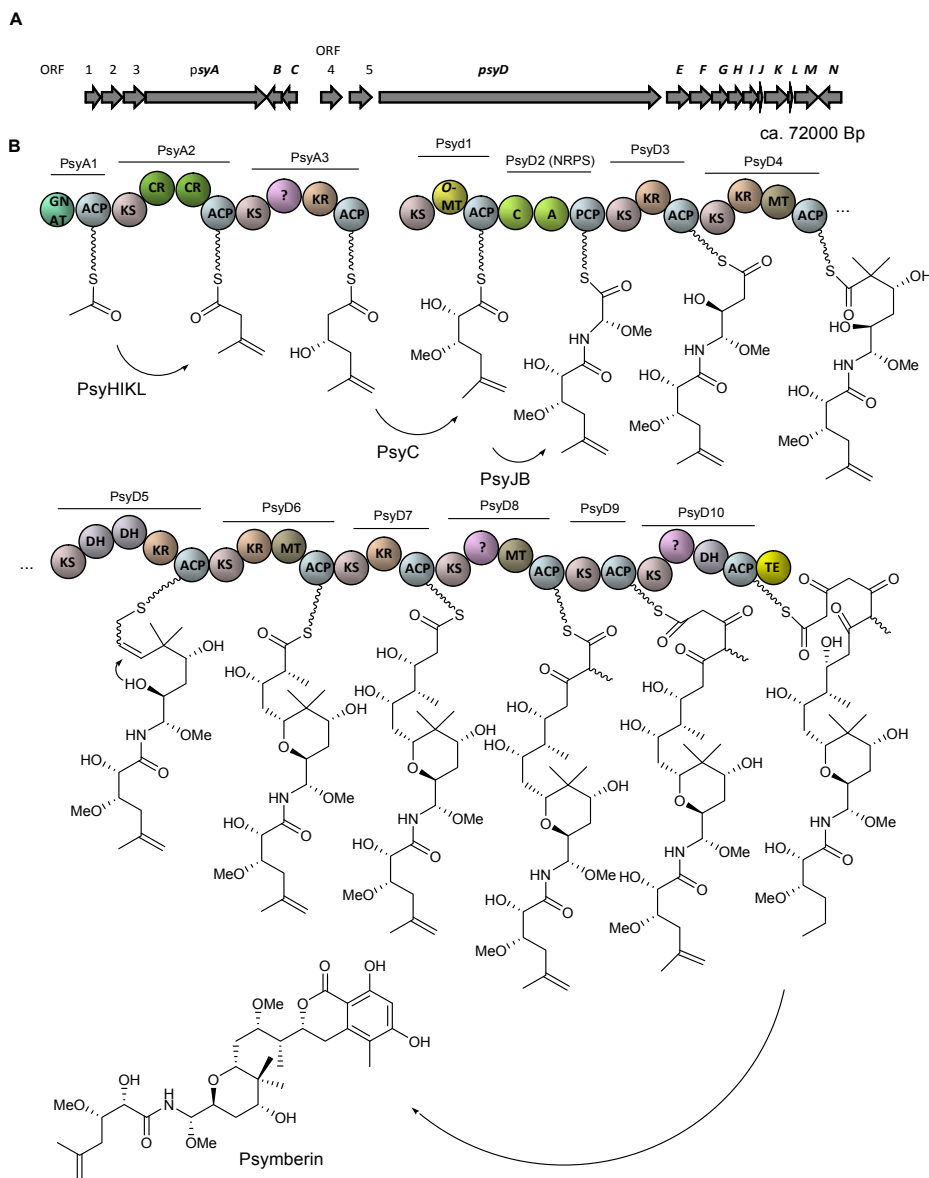


Abb. 3-15: Gencluster und postulierte Biosynthese von Psymberin **21**.⁶¹

(A) Schematisch dargestellter Psymberin Gencluster. Nummerierte Gene gehören nicht zum Psymberin Biosynthese-Cluster; (B) Putative Biosynthese des Psymberins **21**.

Auch in diesem Fall passt die entsprechende Colinearitätsregel, sodass nach Anwendung der phylogenetischen Regeln für *trans*-AT PKS,⁵⁰ die Polyketidstruktur perfekt mit dem Psymberin-Gencluster korreliert.⁶¹ Die Entdeckung der Biosynthesegene offenbart die Möglichkeit die Biosynthese von Psymberin zu untersuchen und ermöglicht eine nachhaltige biotechnologische Produktion des Naturstoffs. Eine weitere Beschreibung ungewöhnlicher Biosyntheseschritte erfolgt unter 3.4.3.

3.4.3 Ungewöhnliche Biosyntheseschritte der Pederin- und Psymberin-Biosynthese

Einige Biosyntheseschritte der Psymberin **21**- und Pederin **20**-Biosynthese sind außergewöhnlich und können nicht über die herkömmlichen Colinearitätsregeln für PKS-Systeme erklärt werden. Biosynthetisch realisiert werden sie von neuartigen Modulen und Domänen.

Eine Besonderheit der Psymberin **21**- und Pederin **20**-Biosynthese sind die in *trans* agierenden AT. Die Unterschiede zwischen *cis*- und *trans*-AT PKS sind genauer unter Abschnitt 3.3 beschrieben. Experimentell konnte die acylierende Funktion der entsprechenden AT an mehreren PKS-Biosynthesen untersucht werden.^{37,38,53,95,96} Auch für die Biosynthese von Polyketiden durch nicht kultivierte bakterielle Symbionten konnte am Beispiel der AT BryP aus der Bryostatin-Biosynthese die Funktion der AT genauer charakterisiert werden.⁹⁶

Eine weitere Besonderheit ist die Initiierung der Polyketidbiosynthese. In üblichen PKS-Systemen initiiert eine AT die Übertragung des ersten Intermediats (üblicherweise Acetyl-CoA **5**). Bei der Pederin **20**- und Psymberin-PKS existiert eine GCN5-verwandte *N*-Acetyltransferase (GNAT) Domäne zu Beginn des ersten Moduls. Dass diese für die Initiierung der Biosynthese zuständig ist konnte bisher bei Psymberin **21** und Pederin **20** nicht nachgewiesen werden, jedoch bei dem Polyketid Curacin A.⁹⁷ An der GNAT-Domäne des Curacin A konnte gezeigt werden, dass sie Acetyl-CoA **5** auf das jeweilige ACP übertragen kann. Zusätzlich konnte eine decarboxylierende Funktion an Malonyl-CoA **6** nachgewiesen werden, sodass je nach verfügbarem Substrat Acetyl-CoA **5** oder Malonyl-CoA **6** zur Initiierung der Polyketidbiosynthese verwendet werden kann. Da die GNAT-Domänen der Pederin **20**- und Psymberin **21**-Biosynthese eine hohe Ähnlichkeit mit der GNAT-Domäne der Curacin A-Biosynthese aufweisen, besitzen sie sehr wahrscheinlich die selben Funktionen.⁹⁷

Eine weitere Besonderheit der Psymberin **21**- und Pederin **20**-Biosynthese ist die Einführung einer Exomethylengruppe an C-2 bzw. C-4 (vgl. Abb. 4-2). Die Einführung solcher β -Verzweigungen ist bis auf wenige Ausnahmen in Cyanobakterien^{51,52} nur aus *trans*-AT PKS-Systemen bekannt. Biosynthetische Studien zeigten am *pksX*-Gencluster, das für die Biosynthese des Bacillaens **30** zuständig ist,⁴⁶ dass verschiedene akzessorische Proteine für die Einführung verantwortlich sind.⁵³

Auch am Curacin A konnte die Beteiligung der akzessorischen Proteine nachgewiesen werden.⁵² Homologe Proteine zum *pksX*-Cluster sind im Pederin- und Psymberin-Cluster vorhanden. Daher liegt es nah, dass die Biosynthese der Exomethylengruppe analog verläuft. Zu den Enzymen gehören eine Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A Synthase-artiges Enzym (HMGS), Enzyme der Crotonase (CR)-Superfamilie sowie ein einzelstehendes ACP und eine einzelstehende KS. Eine genaue Beschreibung der putativen Biosynthese erfolgt unter 5.1.4.

In Polyketiden werden herkömmlicherweise Hydroxylgruppen durch Reduktion der Ketofunktion über KR-Domänen an der β -Position eines Thioesterintermediates eingeführt. Bei Psymberin **21** und Pederin **20** befindet sich jedoch an C-5 bzw. an C-7 (vgl. Abb. 4-2) eine Hydroxy-Gruppe an einer Stelle, die der α -Position entspricht. Diese Funktionalisierung ist sehr ungewöhnlich und scheint von einzelstehenden Enzymen katalysiert zu werden. Geeignete Kandidaten wären im Fall von Psymberin **21** PsyC und PsyK sowie bei Pederin **20** PedK. PsyC und PedK zeigen aufgrund von PSI-BLAST-Analysen eine entfernte Verwandtschaft zu Fe(II)- α -Ketoglutarat abhängigen α -Hydroxylasen, wie z. B. Phytanoyl-CoA-Hydroxylasen.⁹⁸ Daher sind sie geeignete Kandidaten, α -Hydroxylierungen an Polyketiden durchzuführen. Fe(II)- α -Ketoglutarat abhängige Enzyme katalysieren eine enorme Vielfalt von Reaktionen. Sie haben Bedeutung bei Proteinmodifikationen, der Reparatur von alkylierter DNA und RNA und bei der Biosynthese von Antibiotika und Naturstoffen von Pflanzen. Außerdem sind die Reaktionen im Lipidmetabolismus von Bedeutung sowie bei der Biodegradation einer Vielzahl von Substanzen.⁹⁸

PsyK ist ebenfalls ein Kandidat, für die enzymatische Katalyse einer α -Hydroxylierung. Es hat eine große Ähnlichkeit zu einer FAD-abhängigen Oxygenasedomäne der Myxothiazolbiosynthese. Diese katalysiert eine Hydroxylierung eines Glycinrestes.⁹⁹ Da Psymberin **21** eine Amino-Acetal-Funktion besitzt, die durch eine Hydroxylierung eines Glycinbausteins erzeugt wird,⁶¹ könnte die Hydroxylierung ebenfalls durch PsyK eingeführt werden.

Im ersten Modul von PsyD der Psymberin **21**-Biosynthese befindet sich eine ungewöhnliche *O*-Methyltransferase (*O*-MT)-Domäne, zu der Homologe in den Genclustern der Myxothiazol-,¹⁰⁰ Stigmatellin-¹⁰¹ und Jamaicamid-Biosynthese⁵¹ codiert werden. Aufgrund der modularen Position der Domäne deutet alles daraufhin, dass durch diese Domäne Methoxygruppen in wachsende Polyketidketten eingeführt werden.⁶¹ Eine genauere biochemische Charakterisierung einer solchen PKS-Domäne erfolgte bislang nicht.

3.5 Aufklärung von Biosyntheseschritten *in vivo* und *in vitro*

Um die Biosynthese von Polyketiden zu erforschen, lassen sich verschiedene Methoden anwenden. Von Vorteil ist dabei, wenn der produzierende Organismus kultiviert werden kann, denn dies erleichtert die Isolierung der Gene. Über die Architektur der PKS können Strukturen und Biosynthese-Wege postuliert werden. Mittels rekombinanter Techniken können Veränderungen im Gencluster vorgenommen werden (z. B. Gen-Knock-Out-Experimente), die Rückschlüsse auf Funktionen von Enzymen zulassen, die an Biosyntheseschritten beteiligt sind. Außerdem besteht die Möglichkeit markierte Substrate zu füttern, deren Einbauposition detektiert werden kann. Dies liefert Einsichten in die Vorstufen, die in die Polyketide eingebaut werden. Diese Strategien fallen alle unter eine Gruppe von Nachweismethoden, die *in vivo* durchgeführt werden. Da die Polyketide der Pederinfamilie aus bakteriellen Symbionten stammen und diese auch nach vielen Versuchen bisher nicht kultiviert werden konnten, können diese Methoden bisher nicht angewendet werden. Als Konsequenz kann die Erforschung der Biosynthese von Polyketiden aus den bakteriellen Symbionten bisher nur über *in vitro*-Experimente mit heterolog exprimierten Proteinen oder Proteindomänen durchgeführt werden. Ein anderer Ansatz ist der Transfer der Gene auf kultivierbare Organismen und Erzeugung eines Polyketid-Produzenten, um *in vivo* Experimente zu ermöglichen.

3.5.1 Proteinexpression von Polyketidsynthasen zur *in vitro*-Analyse

Zur *in vitro*-Analyse von Biosyntheseschritten werden die Gensequenzen der interessierenden Proteine in Expressionsvektoren kloniert und die Proteine heterolog exprimiert. Dies erfolgt meistens in *E. coli*. Hierbei beeinflussen zahlreiche Faktoren, wie erfolgreich die Expression und Aufreinigung des Enzyms ist. Dabei kann zwischen Einflüssen auf Ebene der DNA, auf Ebene der Transkription und Translation, auf Ebene der Proteine sowie auf Ebene der Proteinreinigung unterschieden werden.¹⁰² Auf Basis der DNA und der verwendeten Plasmide wird die Proteinexpression durch die Plasmidkopienzahl sowie die strukturelle und segregative Plasmidstabilität beeinflusst. Die verwendeten Promotoren, die Sequenz der ribosomalen Bindestelle, die Stabilität der mRNA, die verwendeten Start- und Stop-Codons sowie der Codongebrauch beeinflussen die Proteinexpression auf Basis der Transkription und Translation. Auf Proteinebene sind die Proteolyse, die Proteinfaltung und Maßnahmen zur Lokalisierung der exprimierten Proteine besonders hervorzuheben. Auf der Ebene der Aufreinigung spielen der Zellaufschluss und die verwendete Reinigungsmethode eine Rolle.

Um zeitnah ein geeignetes Expressionssystem zu realisieren, werden kommerziell erhältliche Expressionsvektoren verwendet. Daher sind die Optimierungsmöglichkeiten bezüglich der oben genannten Punkte durch die Bandbreite der auf dem Markt befindlichen Vektoren begrenzt und eine „trial and error“ Strategie verschiedener Expressionsvektoren sinnvoll. Diese Vorgehensweise ist

ebenfalls bei der Auswahl des *E. coli*-Expressionsstammes zu empfehlen, da für das jeweilige Protein meist keine genauen Ansprüche bekannt sind, die an den Proteinbiosyntheseapparat gestellt werden. Die Protein-codierende Sequenz, die über PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor kloniert wird, ist aufgrund der Sequenz aus dem jeweiligen PKS-Gencluster klar definiert und nicht variabel. Optimierungsmöglichkeiten ergeben sich in diesem Punkt ausschließlich durch synthetisch hergestellte Gene. Zusammenfassend bilden das Expressionsplasmid, der Expressionsstamm und die Sequenz des proteincodierenden Gens die Grundlage für eine erfolgreiche Expression und führen häufig zumindest zu geringen Proteinmengen, die für eine grundlegende Charakterisierung der Enzyme ausreichen. Hier treten die Produktivität und Ausbeute, im Gegensatz zu Systemen in denen die Enzyme später in biotechnologischen Prozessen eingesetzt werden, in den Hintergrund.

Dennoch treten in vielen Fällen Schwierigkeiten auf. Beispielsweise, sowie die häufigsten Probleme sind die Ausbildung von sogenannten „inclusion bodies“ und eine nicht korrekte Faltung der Proteine. Dies hat zur Folge, dass die Proteine nur unlöslich und damit inaktiv aufgereinigt werden können. Im Folgenden werden einige Aspekte zur Optimierung genauer beschrieben, nach denen die Expression von PKS-Proteinen im Rahmen der vorliegenden Arbeit optimiert wurden. Die genauere Beschreibung erfolgt für den Codongebrauch, die Proteolyse, die Proteinfaltung und die Lokalisation der exprimierten Proteine.

Bezüglich des Codongebrauchs reicht es häufig aus, die ersten Protein-codierenden Codons auf den Codongebrauch von *E. coli* abzustimmen, oder es kann auch ein komplett synthetisch hergestelltes Gen verwendet werden.^{103,104} Eine wichtige Rolle scheint der Codongebrauch zu spielen, wenn ein sehr langes Gen und damit ein für die Zelle energetisch aufwändiges Protein exprimiert werden soll. Hier zeigt sich eine Beziehung zwischen Codon Präferenz und Translationseffizienz.¹⁰⁵ Bei PKS-Proteinen könnte die Codon Präferenz daher ebenfalls sehr wichtig sein, da bei der Expression von PKS-Modulen sehr lange Gene exprimiert werden.

Die Proteolyse kann durch die Verwendung von Protease-defizienten *E. coli* Stämmen¹⁰⁴ oder durch Co-Expression von Proteaseinhibitoren reduziert werden¹⁰⁶. Es kann ebenfalls vorkommen, dass die Proteine in der Zelle stabil sind, allerdings nach dem Zellaufschluss proteolytisch angegriffen werden. Hier helfen Proteasehemmer,¹⁰⁷ die Reduktion der Temperatur oder eine Zugabe von Chelatbildnern, die die für Proteasen wichtigen Metallionen komplexieren¹⁰⁸.

Der entscheidendste Faktor, der für die Aktivität und damit auch für die biosynthetische Untersuchung von PKS-Proteinen erforderlich ist, ist die korrekte Faltung der Proteine sowie die Vermeidung von inclusion bodies. Im Allgemeinen bestimmt die AS-Sequenz die Faltung der Proteine. Es wird seit langem versucht, Regeln zu finden, die die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen berechenbar

machen.¹⁰⁹ Es wurde vermutet, dass die räumliche Anordnung eines Proteins dem Zustand der niedrigsten freien Energie entspricht. Dabei musste allerdings festgestellt werden, dass ein nur auf diesem Prinzip beruhender Faltungsvorgang eine immense Zeit in Anspruch nehmen würde.¹¹⁰ In den Zellen falten sich Proteine allerdings in wenigen Sekunden. Die Forschung an zellulären Faltungswegen zeigte eine Beteiligung verschiedener weiterer Proteine, die die räumliche Struktur der Proteine unterstützen und katalysieren. Diese Proteine bezeichnet man als Chaperone, von denen in *E. coli* zwei Systeme bekannt sind.¹¹¹ Das eine System besteht aus DnaK, DnaJ und GrpE. DnaJ bindet an das ungefaltete Protein und ermöglicht dadurch die Anlagerung von DnaK. Dieser Prozess erfolgt unter ATP-Verbrauch, woraufhin GrpE das entstandene ADP vom Proteinkomplex ablöst. In einem weiteren Schritt erfolgt - ebenfalls unter ATP-Verbrauch - die Ablösung von DnaK, DnaJ und GrpE, und das Protein wird frei gegeben. Teile der Sequenzabschnitte des Proteins verbleiben während der Bindung im ungefalteten Zustand und sind daher nur im Komplex in der ungefalteten Form stabil. Auf diese Weise können falsche Faltungswege unterdrückt werden und nur die korrekten Faltungswege prozessiert werden. Ein weiteres Chaperon-System besteht aus den Proteinen GroEL und GroES. Diese Proteine sind große zylindrische Proteine. Ungefaltete Proteine können in diesen GroEL-GroES-Komplexen unter ATP-Verbrauch korrekt gefaltet werden.¹¹¹ In wie weit Chaperone bei der natürlichen Faltung von PKS involviert sind, ist bisher weitgehend unbekannt. Am Beispiel der Albicidin Biosynthese konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Homolog des *E. coli* Hitzeschockprotein HtpG essentiell ist für die Polyketid Biosynthese.¹¹² Ein weiteres Beispiel zeigen höhere Erythromycin C-Ausbeuten bei der heterologen Expression in *E. coli* unter Co-Expression von GroEL und GroES.¹¹³ Daher und aufgrund dass PKS riesige Multienzymkomplexe sind, ist eine Beteiligung solcher Systeme naheliegend. Eine absolute Notwendigkeit scheint jedoch nicht vorhanden zu sein, da in den PKS-Genclustern sehr selten Chaperone vorhanden sind.¹¹⁴ Aufgrund der Betrachtungen bietet sich auch bei der heterologen Expression von PKS-Komponenten eine Co-Expression oder eine Erhöhung der natürlichen Expression von Chaperone an. Mittlerweile existieren einige Plasmide, die die Co-Expression von Chaperonen ermöglichen.^{115,116} Die natürliche Expression der Chaperone kann u. a. durch die Zugabe von Ethanol gesteigert werden.^{117,118} Auch die Inkubationstemperatur kann bei der Verhinderung von Proteinaggregaten hilfreich sein und die korrekte Faltung der Proteine hervorrufen. Beispielsweise konnte bei der Expression einer 5-Lipoxygenase in *E. coli* eine Aggregatbildung verhindert werden, indem vor der Induktion der Expression die Temperatur auf 16 °C gesenkt wurde.¹¹⁹ Ebenfalls auf eine verbesserte Proteinfaltung deutet die durch den P_M-Promotor induzierte heterologe Expression des Polyketids Myxochromide S in *Pseudomonas putida* hin. Hier konnte durch eine Absenkung der Temperatur von 30 °C auf 16 °C die Metabolitproduktion um das 1000 fache erhöht werden.¹²⁰ Auch bei der Proteinexpression von PKS-Komponenten (ACPs) konnten die Absenkung der Temperatur bereits erfolgreich eingesetzt

werden.¹²¹ Eine weitere Methode lösliches Protein zu erhalten ist eine Fusion mit anderen Proteinen, die man als Faltungvermittler bezeichnen kann. Dazu gehören Fusionen mit Thioredoxin, der Glutathion-S-Transferase, das Protein A oder auch das Maltose-Bindeprotein. Letztendlich muss jedoch jedes Protein individuell bezüglich der Faltung und Vermeidung von „inclusion bodies“ optimiert werden.

Die Beeinflussung der Lokalisation der Proteine bietet eine weitere Optimierungsmöglichkeit für eine erfolgreiche Proteinexpression in *E. coli*. Dieses Gram-negative Bakterium enthält die zellulären Kompartimente Cytoplasma und Periplasma. Einige Proteine werden bevorzugt im Periplasma korrekt gefaltet. Das Periplasma ist im Gegensatz zum Cytoplasma geeigneter zur Ausbildung von Disulfidbrücken, da das vorherrschende Milieu oxidierend ist. Diese Tatsache kann genutzt werden, indem die Proteine gezielt über verschiedene Signalsequenzen und Sekretionstypen vom Cytoplasma ins Periplasma transferiert werden^{122,123} und dort die Disulfidbrücken-abhängige und korrekte Faltung erfolgt.

Außer den oben genannten Faktoren sind posttranslationale Modifikationen häufig essentiell für die Aktivität einiger Enzyme. Bei PKS-Systemen ist die Einführung eines Phosphopantethein-Arms an die ACPs die einzige bekannte posttranslationale Modifikation (vgl. 3.2). Für die Expression von PKS bedeutet das, dass diese Modifikationen vom Expressionswirt vorgenommen bzw. eine rekombinante PPTase co-exprimiert werden muss. Bei *E. coli* werden häufig die PPTasen Sfp aus *Bacillus subtilis*¹²⁴ und Svp aus *Streptomyces verticillus*¹²⁵ verwendet. Allerdings kann die Phosphopantetheinylierung ebenfalls nach erfolgter Aufreinigung der ACP-enthaltenden Proteine durchgeführt werden.

3.5.2 Heterologe Expression von PKS-Clustern

Die Übertragung von PKS-Genclustern aus symbiontischen Organismen birgt ein enormes Potential. Es könnte einerseits die schlechte Bioverfügbarkeit von pharmakologisch hochinteressanten Substanzen beseitigt werden sowie andererseits das *in vivo*-Studium der Biosynthese ermöglichen. Für eine erfolgreiche Polyketid-Produktion können einige Voraussetzungen definiert werden, die der heterologe Stamm mitbringen sollte. Im Allgemeinen ist die PKS Aktivität an keinerlei weitere zelluläre Faktoren oder Organellen geknüpft. Dies zeigt sich daran, dass eine *in vitro*-Biosynthese von Polyketiden durch isolierte PKS-Enzyme möglich ist.¹¹⁴ Dies bedeutet, dass eine Produktion möglich sein sollte, wenn eine erfolgreiche Genexpression, eine Verfügbarkeit der Substrate sowie die Fähigkeit des Organismus zur Phosphopantetheinylierung der ACPs vorhanden ist.¹¹⁴ Zusätzlich sollte der Organismus resistent gegen das produzierte Polyketid sein.¹¹⁴ Sicherlich müssen weitere genetische, transkriptionelle und translationelle Faktoren berücksichtigt werden. Die Sequenz des PKS-Cluster sollte bezüglich des G/C-Gehalts und des Codongebrauchs möglichst ähnlich dem

Produktions-Organismus sein. Weiterhin sollte die Transkriptions- und Translations-Maschinerie des Produzenten in der Lage sein, die sehr großen Cluster zu prozessieren und die regulatorischen Elemente, wie Promotoren, zu nutzen. Gleichzeitig müssen die Transkriptions- und Translations-Produkte stabil sein. Außerdem werden häufig andere Faktoren diskutiert, die wichtig für die Prozessivität von PKSs sind. Dazu gehören u.a. Chaperone. Am Beispiel der Albicidin Biosynthese konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein Homolog des *E. coli* Hitzeschockprotein HtpG essentiell ist für die Polyketid-Biosynthese.¹¹² Im Allgemeinen stellt sich jedoch die Frage nach der absoluten Notwendigkeit dieser Faktoren, da bisher fast nie Chaperon-Proteine gefunden wurden, die in PKS-Gencluster codiert waren.¹¹⁴ Letztendlich kann daher festgestellt werden, dass unter Beachtung der oben genannten Punkte eine heterologe Expression der PKS und damit verbundenen Biosynthese des Polyketids möglich sein kann, jedoch die Forschung an auxiliären Faktoren gerade erst begonnen hat und weiteren Aufschluß über die benötigten Faktoren zur heterologen Expression von PKS geben werden.

Eine erfolgreiche Produktion von Polyketiden durch heterologe Mikroorganismen wurde bereits an einigen Beispielen gezeigt. So konnte die Vorstufe des Antibiotikums Erythromycin A 6-dEB **13** durch einen speziell genetisch manipulierten *E. coli* produziert werden.¹²⁶ Eine weitere Studie verwendete *Pseudomonas putida* als heterologen Organismus. Dieser Stamm war in der Lage das Polyketid-nichtribosomale Peptid-Hybrid Myxochromide S zu produzieren.¹²⁰ Ebenfalls konnte die Produktion von Epothilon in *Streptomyces coelicolor* durchgeführt werden.¹²⁷ Dieser Stamm hat gegenüber dem natürlichen Produzenten *Sorangium cellulosum* den Vorteil, dass er genetisch leichter zu modifizieren ist und ein 10 fach schnelleres Wachstum besitzt.

3.6 Suche nach neuen Naturstoffen, kombinatorische Biosynthese und biotechnologische Nutzung

Die Entdeckung von neuen Naturstoffen als Quelle für pharmakologische Anwendungen hat große Bedeutung. Besonders durch die von Mensch, Tier und Mikroorganismus ausgebildeten Resistenzen gegenüber bereits existierenden Wirkstoffen bieten Naturstoffe im Allgemeinen sowie Polyketide im Speziellen ein sehr großes Potential.¹²⁸

Die Suche nach neuen bioaktiven Naturstoffen kann auf Basis von Screenings erfolgen.¹²⁹ Actinomyceten gelten als eines der produktivsten bakteriellen Quellen für antibiotisch wirkende Substanzen.¹³⁰ Zahlreiche Antibiotika konnten bereits entdeckt werden und in der medizinischen Therapie angewendet werden. Aus Kalkulationen von Baltz *et al.* resultiert allerdings, dass die bisher entdeckten Substanzen nur ca. 1-3 % der gesamten von Actinomyceten produzierten Antibiotika erschöpfen.^{131,132} Daher steckt in weiteren Screenings ein gewaltiges Potential. Actinomyceten

kommen gewöhnlicherweise im Erdboden vor. Allerdings zeigen auch „exotische“ Orte ein großes Reservoir für bioaktive Substanzen. Beispielsweise konnte aus Meeresbewohnern wie Schwämmen und Tunicaten eine große Diversität an Naturstoffen isoliert werden.¹³³ Allerdings liegt der Ursprung der Naturstoffproduktion in diesen Tieren häufig in bakteriellen Symbionten, die oft nicht kultivierbar sind.¹³⁴ Schließlich sind nur 0,1 bis 1 % der existierenden Mikroorganismen unter herkömmlichen mikrobiologischen Methoden kultivierbar.¹³⁰ Bei wenigen Symbionten gelang jedoch die Kultivierung. Die antitumoraktiven Polyketide Rhizonin und Rhizoxin konnten durch die Kultivierung von *Burkholderia rhizoxina*, einem Symbionten des Pilzes *Rhizopus microsporus*, isoliert werden und der bakterielle Symbiont als Polyketidproduzent identifiziert werden.^{135,136} Diese Arbeiten zeigen ebenfalls die Möglichkeit auf, neue Naturstoffe zu entdecken.

Bei nicht-kultivierten Organismen kann nur die Isolierung der Biosynthesegene zur Entdeckung neuer Pharmaka führen. Dies ermöglicht zudem die Erforschung der Biosynthese und die Übertragung der Gencluster auf kultivierbare Mikroorganismen und kann daher zur nachhaltigen biotechnologischen Produktion der Naturstoffe genutzt werden.^{114,134}

Eine weitere Methode, neue Naturstoffe zu erhalten, ist die kombinatorische Biosynthese.¹³⁷ Bei PKS-Systemen sind hierdurch bereits zahlreiche neue Polyketidstrukturen entstanden.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Zur Veränderung der resultierenden Polyketidstruktur werden die biosynthetisch aktiven Proteine und Enzyme gezielt miteinander rekombiniert. Die strukturellen Veränderungen in den Polyketiden können zu verbesserten oder neuen pharmakologischen Wirkungen führen. Umfangreiche Studien zur rekombinanten Biosynthese fanden beispielsweise an der Erythromycin-PKS statt.¹⁴¹ Auch durch den Einbau von zugeführten, nicht-natürlichen Bausteinen in die Polyketidstruktur können neue Polyketidstrukturen generiert werden.^{142,143} Außerdem können Veränderung der Tailoring-Enzymen die Produktion neuartiger Substanzen bewirken.¹⁴⁴ Eine weitere Methode ist unter dem Namen Mutasyntese bekannt, bei der einzelne Biosynthesegene ausgeschaltet wurden und zur Komplementierung der Mutation strukturell veränderte Intermediate gefüttert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Fütterung von *p*-Cyanobenzoat zum Stamm *S. lividans* ZX1::pHJ97, der Mutationen in der Aureothin-PKS enthält. Das zugegebene Substrat wird von der PKS erkannt und das resultierende, nichtnatürliche Polyketid (Aureonitril) hat eine signifikant erhöhte cytostatische Wirkung.¹⁴⁵

Als weitere Möglichkeit bietet sich die chemische Synthese an, wodurch ebenfalls Naturstoffe und ihre Analoga erzeugt werden können. Dabei dienen die Strukturen bereits bekannter bioaktiver Substanzen oder das entsprechende Pharmakophor als Grundlage für den Strukturaufbau. Häufig sind chemische Totalsynthesen strukturell komplexer Substanzen allerdings nicht wirtschaftlich. Für die Synthese von Bryostatinen sind beispielsweise mehr als 70 Syntheseschritte erforderlich.¹⁴⁶ Teilweise werden auch semisynthetische Methoden eingesetzt, um Modifikationen der von

Organismen produzierten Strukturen zu erhalten.¹⁴⁷ Dabei zielt die Synthese häufig darauf ab, durch die Derivatisierung eine spezifischere Wirkung zu erzeugen und Nebenwirkungen zu vermeiden.¹⁴⁸ Ein Beispiel für einen semisynthetisch produzierten Naturstoff ist Ecteinascidin-743 (Yondelis).¹⁴⁹ Durch diese Methode konnte das Verfügbarkeitsproblem zur pharmazeutischen Nutzung behoben werden und bereits für die Sekundärtherapie resistenter Weichteilsarkome eingesetzt werden.¹⁵⁰ Ursprünglich stammt Yondelis aus der karibischen Seescheide *Ecteinascidia turbinata*. In einigen Fällen sind auch chemoenzymatische Methoden erfolgreich. Dabei werden gezielt Syntheseschritte durch rekombinant produzierte Enzyme übernommen. Für das Enterocin, eine antibakterielle Substanz aus *Streptomyces maritimus*, konnte sogar schon eine Totalsynthese auf enzymatischem Weg durchgeführt werden.¹⁵¹

4 Zielsetzung

Wie unter Abschnitt 3.5 beschrieben, kann die experimentelle, biochemische Erforschung der Biosynthese von Polyketiden aus nicht kultivierbaren, symbiontischen Bakterien über *in vitro* Experimente mit heterolog exprimierten Proteinen der PKS erfolgen. In dieser Arbeit sollten daher verschiedene Biosynthesegene der Psymberin **21**- und Pederin **20**-Biosynthese in Expressionsvektoren kloniert werden. Durch die Klonierung werden die Proteine fusioniert mit spezifischen Aufreinigungs-Tags exprimiert. Nach der Überexpression der Proteine in *E. coli* sollten die verschiedenen Enzyme über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Der Einsatz der Enzyme in verschiedenen biochemischen Assays und Analysemethoden sollte weitere Informationen über ihre Funktion liefern.

Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung der *trans*-AT-katalysierten ACP Acylierungsreaktion (Abb. 3-4, A und Abb. 4-1). In *trans*-AT PKS-Genclustern existieren häufig 2 oder mehr ATs. Dabei ist bisher nicht bekannt, welche Funktion mehrere ATs besitzen. Für einige ACPs und ATs der Pederin **20**-Biosynthese lagen bereits Ergebnisse aus der Dissertation von Katrin Zimmermann vor.⁹¹ Basierend auf diesen Arbeiten sollte die Substratübertragungsreaktion von PedD an einem ganzen PKS-Modul sowie an einzelnen ACPs der Psymberin-PKS getestet werden. Die zweite AT der Pederin-PKS, PedC, konnte in den Arbeiten von Katrin Zimmermann als Fusion mit dem Maltosebindeprotein exprimiert werden. Allerdings zeigte PedC keine Acylierungsaktivität. Daher sollten die Experimente an PedC als Fusion mit kürzerem Affinitäts-Tag wiederholt werden, um Informationen zu erhalten, welche Funktion die beiden ATs in der Biosynthese des Pederins **20** haben. Für die neu zu exprimierenden ACPs sollten geeignete PPTasen eingesetzt werden, die die inaktive *apo*-Form in die aktive *holo*-Form überführen (Abb. 3-3). Analytisch sollten die Assays über massenspektroskopische Verfahren und unter Verwendung radioaktiv markierter Substrate verfolgt werden. Zusätzlich sollte die AT-katalysierte Substratübertragung kinetisch unter Verwendung eines gekoppelten Assays (Abb. 5-25) charakterisiert werden. Konkret sollten in den Assays die einzelnen ACPs PedN, PsyA-ACP₃, PsyD-ACP₁, die Doppel-ACP von PedI3 und das komplette Modul PedI3 getestet werden. Für die Phosphopantetheinylierung sollten die PPTasen Sfp oder Svp eingesetzt werden. Die ATs PedD und PedC sollten dann auf eine Katalyse der Substratübertragung getestet werden. Die Reaktionen der einzelnen Proteine ist in folgender Abbildung zusammengefasst (Abb. 4-1).

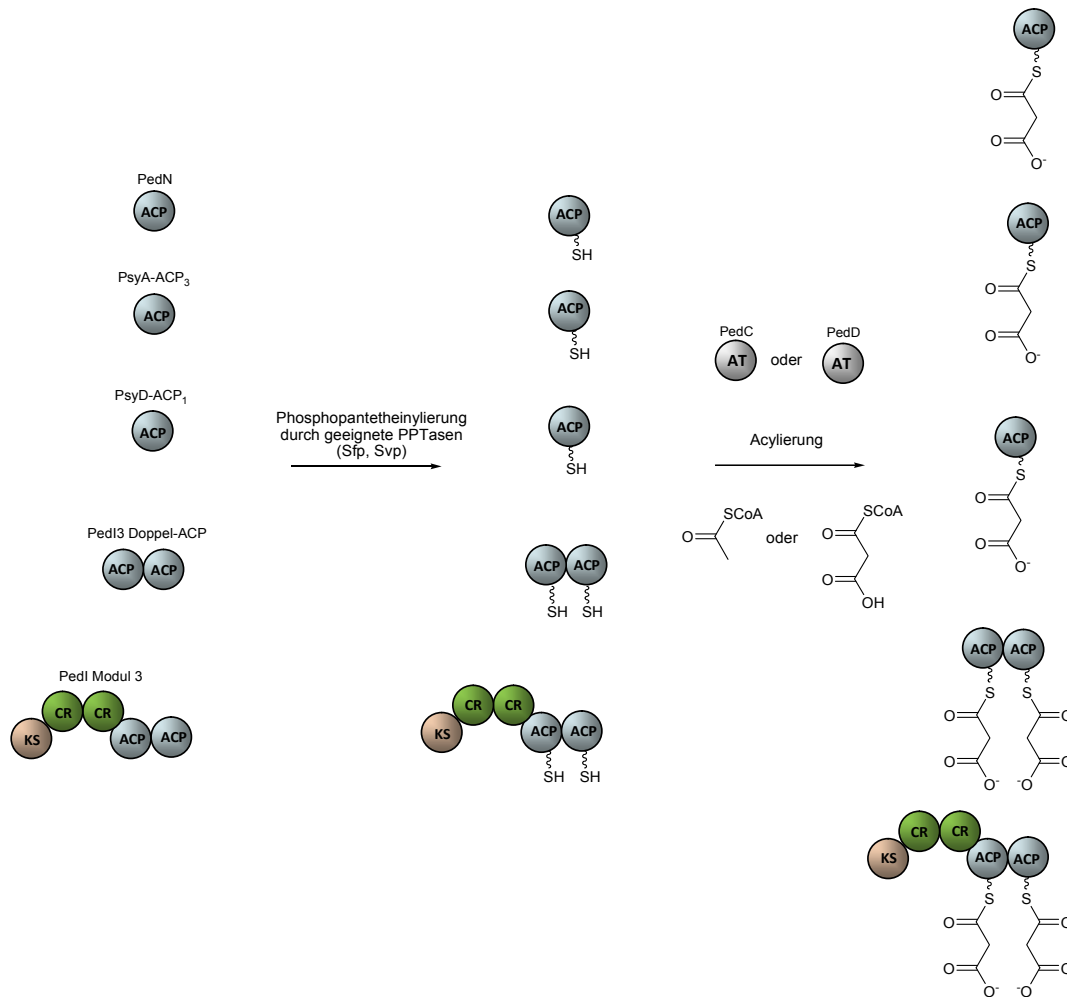


Abb. 4-1: Schematische Darstellung der untersuchten Phosphopantetheinylierung und Acylierung.

Die Reaktionen sind für die einzelnen ACPs (PedN, PsyA-ACP₃, PsyD-ACP₁), die Doppel-ACP von Ped13 sowie für das komplette Modul Ped13 dargestellt, und die Darstellung enthält alle ACPs, die in den Assays getestet werden sollten. Die Acylierung ist am Beispiel des Substrates Malonyl-CoA **6** dargestellt.

Ein weiterer Hauptaspekt dieser Arbeit war die Untersuchung von neuartigen Biosyntheseschritten der Psymberin- und Pederin-PKS. Dazu gehören die Einführung von β -Verzweigungen, α -Hydroxylierungen sowie Methoxylierungen (Abb. 4-2).

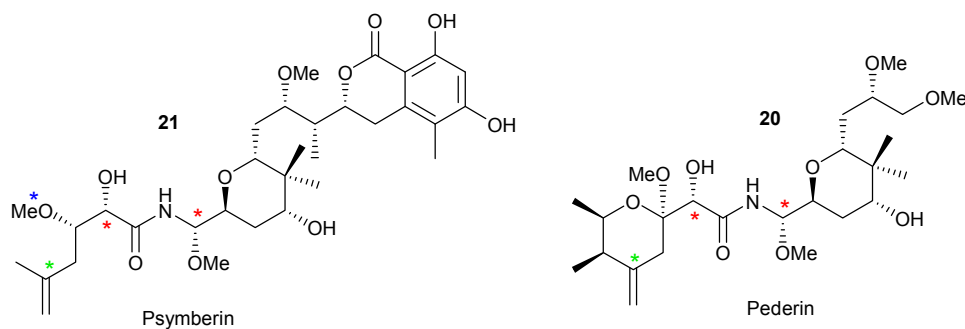


Abb. 4-2: Neuartige Biosyntheseschritte der Pederin- und Psymberin-PKS.

Markiert sind die Positionen, an denen bei der PKS-Biosynthese die neuartigen Biosyntheseschritte (β -Verzweigung (*), α -Hydroxylierung (*) und Methoxylierung (*)) durchgeführt werden.

β -Verzweigungen werden in Form von Exomethylengruppen im Psymberein **21** und Pederin **20** an C-2 bzw. C-4 eingeführt (Abb. 4-2). Beim Pederin **20** erfolgt die Biosynthese am Polyketidintermediat von Modul 3. Daher stellt das Modul PedI3 den zentralen Bestandteil zur Charakterisierung der enzymatischen Reaktion dar und sollte daher für enzymatische Assays heterolog exprimiert werden. Weitere akzessorische Enzyme, die an der Biosynthese beteiligt sein könnten, sind die KS PedM, das HMGS PedP, das ACP PedN sowie die CR PedL. Diese sollten ebenfalls überexprimiert werden und zusammen mit PedI3 in Enzymassays eingesetzt werden. Die Analytik der Assays sollte dabei über massenspektroskopische Analysen von Intermediat-beladenen Proteinfragmenten erfolgen.

Hydroxylierungen an der α -Position können über bereits bekannte PKS-Mechanismen nicht eingeführt werden. Daher stellt die Einführung dieser Funktionalität im Pederin **20** und Psymberein **21** eine interessante Fragestellung dar. Beim Psymberein **21** sind die Enzyme PsyC (putative Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängige α -Hydroxylase) und PsyK (putative FAD-abhängige Oxidoreductase) geeignete Kandidaten für die Einführung von α -Hydroxylierungen. Daher sollten diese Enzyme überexprimiert werden und mit synthetisch hergestellten PKS-Intermediaten hinsichtlich einer biosynthetischen Umsetzung getestet werden. Für Experimente mit ACP-gebundenen Substraten sollte PsyA-ACP₃ überexprimiert werden. Zusätzlich eignet sich die Detektion von Co-Faktoren zur Charakterisierung von Enzymen. Deshalb sollte versucht werden, an PsyC gebundenes Fe (II) zu detektieren.

In der Psymberein-PKS existiert eine *O*-MT Domäne, die nur selten in PKS-Systemen vorkommt. Bisher steht der experimentelle Nachweis der methoxylierenden Funktion dieser Domänen aus. Daher sollte die *O*-MT Domäne überexprimiert werden und in Enzymassays biochemisch charakterisiert werden. Die Reaktion sollte unter Verwendung synthetisch hergestellter Intermediate studiert werden. Falls die Umsetzung unter diesen Bedingungen nicht erfolgreich sein sollte, sollen ebenfalls ACP-gebundene Intermediate als Substrat verwendet werden. Für die Experimente mit ACP-gebundenen Substraten sollte PsyD-ACP₁ überexprimiert werden.

Die *in vitro*-Untersuchungen sollten einen tieferen Einblick in die Biosynthese von Psymberein **21** und Pederin **20** ermöglichen. Gleichzeitig stellen die Assays mit Proteinen der Psymberein **21**-Biosynthese die ersten funktionellen Studien der Psymberein-PKS dar. Daher kann über diese Experimente eine Funktion des Genclusters nachgewiesen werden. Außerdem können die Ergebnisse aus den Assays Informationen liefern, die die Eignung der Domänen und Enzyme für die kombinatorische Biosynthese zur Generierung von nicht-natürlichen Polyketidstrukturen ermöglichen.

Ziel war es auch, geeignete Expressionssysteme und Stämme für die Überexpression von PKS aus Symbionten zu entwickeln, Aufarbeitungsmethoden zu erarbeiten und zu verbessern sowie

analytische Ansätze zu testen und für zukünftige Arbeiten an *trans*-AT PKS Systemen zur Verfügung zu haben.

Als Alternative zur Erforschung der Biosynthese von Polyketiden mit dem *in vitro*-methodischen Ansatz existiert die Möglichkeit, Gencluster auf kultivierbare Organismen zu übertragen und durch eine heterologe Expression *in vivo* Untersuchungen zu ermöglichen. Dies hätte auch weitreichende Konsequenzen für die Bioverfügbarkeit der Substanzen und es könnte eine nachhaltige Produktion etabliert werden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls ein heterologer Pederin **20**-Produzent etabliert werden. Als Ausgangspunkt standen die Stämme *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID sowie *Pseudomonas stutzeri* JM300 PHB65IIA zur Verfügung. In diese Stämme wurden bereits alle Gene des Pederin-Clusters in das Genom integriert. mRNA-Analysen zeigten jedoch, dass die Gene *pedNML* nicht transkribiert werden. Daher sollten Plasmide generiert werden, die die fehlenden Transkripte komplementieren. Die resultierenden Stämme sollten daraufhin auf eine erfolgreiche Biosynthese von Pederin **20** in Kultivierungen getestet werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Expression und *in-vitro*-Studien von Polyketidsynthaseenzymen

5.1.1 Untersuchung von posttranslationalen Modifikationen von ACP

ACPs übernehmen in der Biosynthese von Polyketiden eine zentrale Funktion. Für die Aktivierung der ACPs von der *apo*-Form in die *holo*-Form durch eine posttranslationale Modifikation sind PPTasen zuständig. Sie übertragen einen 4'-Phosphopantetheinarm von CoA **12** auf ein Serin eines konservierten Aminosäuremotivs. Dieses Motiv ist charakteristisch für ACPs und befindet sich an der ersten der 4 vorhandenen α -Helices.

Diese posttranslationale Modifikation musste bei der Expression und dem folgenden Einsatz von ACPs in Enzymassays berücksichtigt werden. Für die Einführung des Phosphopantetheinarms besteht die Möglichkeit der Co-Expression einer PPTase während der Expression der ACPs oder der Einsatz einer getrennt exprimierten und aufgereinigten PPTase *in vitro*. Hierfür eignet sich die PPTase Sfp aus *Bacillus subtilis*¹²⁴ oder die PPTase Svp aus *Streptomyces verticillus* ATCC15003¹²⁵. In dieser Arbeit wurde der Vektor pHIS8-*svp* zur Co-Expression der PPTase Svp verwendet und eine *in vitro*-Phosphopantetheinylierung durch den *in vitro*-Einsatz von Sfp (codiert auf dem Plasmid pET-sfp) erreicht.

An PedN und dem Doppel-ACP von PedI3 konnte bereits die Phosphopantetheinylierung durch co-exprimiertes Svp nachgewiesen werden.⁹¹ Um jedoch katalytische Funktionen der Pederin-PKS studieren zu können, ist es notwendig, die Phosphopantetheinylierung an einem ganzen Modul der Pederin-PKS nachzuweisen. Hierzu wurde Modul PedI3 ausgewählt, da es zwei ungewöhnliche CR-Domänen enthält und an ihm vermutlich die β -Verzweigung stattfindet. Außerdem ist das Studium der ATs mit ganzen Modulen sinnvoller als mit ACPs. Ebenfalls wurde in der Arbeitsgruppe Piel die Sequenz des Psymberin-Gene aufgeklärt.⁶¹ Hierzu stellte sich die Frage, ob ACPs der Psymberin-PKS auf die gleiche Weise posttranslational modifiziert werden können. Für diesen Nachweis wurden die ACPs PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ ausgewählt.

5.1.1.1 Klonierung des Moduls *pedI3*

Um die Phosphopantetheinylierungsreaktion der Svp an einem kompletten Modul zu testen, wurde das Modul *pedI3* auf zwei verschiedenen Varianten kloniert. Die erste Variante diente dazu, *pedI3* in den Vektor pHIS8-*svp* zu bringen und die posttranslationale Modifikation durch eine Co-Expression der Svp zu erreichen. Die Aufreinigung ist bei dieser Strategie über einen N-terminalen Octahistidyl-Tag möglich. Die zweite Variante wurde parallel kloniert und kann dazu verwendet

werden, das Modul über *Bam*HI/*Eag*I-Schnittstellen in eine MCS eines geeigneten anderen Expressionsvektors zu bringen. *Bam*HI und *Eag*I sind Standardrestriktionschnittstellen in vielen MCS. Dabei wurde kein Stop-Codon verwendet um eine breitere Tag-Variabilität zur Aufreinigung zu erhalten. Die Tag-Variabilität erhöht sich, da durch die Auswahl des Expressionsvektors wahlweise N-terminal oder C-terminal ein Aufreinigungs-Tag angefügt werden kann. Dies kann eine Rolle bei der Expression, der Proteinfaltung, Aufreinigung sowie der Aktivität der Enzyme spielen. Die zweite Variante diente als Sicherheitsstrategie falls die erste Variante zur Expression des Moduls nicht erfolgreich gewesen wäre.

Für beide Varianten wurden der Anfang und das Ende des Moduls bestimmt. Dies erfolgte mit Hilfe von Proteinsequenzen der Module EryA₃, PikA₃ und PikA₄ sowie EpoB. Diese Module von den PKS-Genclustern des Erythromycin A **2**, Pikromycin und des Epothilon konnten bereits funktionell exprimiert werden und eignen sich daher hervorragend zur Festlegung der Grenzen des Moduls *Ped*I3.¹⁵²⁻¹⁵⁵

Die Klonierung des Moduls *ped*I3 in den Vektor pHis8-*svp* erfolgte in mehreren Schritten (Abb. 5-1). Als Grundlage für die Klonierungen diente das Cosmid pPS9D2, das das Modul *ped*I3 enthält.⁸⁰ Eine Amplifikation des kompletten Moduls durch PCR ist aufgrund der Länge und der daraus entstehenden Kosten der notwendigen Sequenzierung nicht effektiv. Daher wurden der Modulanfang sowie das Modulende mittels PCR amplifiziert und der Mittelteil von dem Cosmid pPS9D2 mit Hilfe von Restriktionsenzymen ausgeschnitten. Gleichzeitig wurden während der PCR des Modulanfangs und des Modulendes ein Stop-Codon und geeignete Schnittstellen für den Transfer in den Vektor pBluescript SK(+) an die Fragmente angefügt. In 5'-Richtung vom Modulanfang wurde eine *Bam*HI-Schnittstelle angefügt und in 3'-Richtung vom Modulende wurde ein Stop-Codon (TGA) mit darauffolgender *Eag*I-Schnittstelle angefügt. Die verwendeten Primer zur PCR-Amplifikation sind in der Tab. 6-11 aufgeführt. Modulanfang und -ende wurden mit Hilfe einer T/A-Klonierung (vgl. 6.5.14) zwischenkloniert. Als Vektor diente pGEM T-Easy. Die entstandenen Plasmide pHN1 (Modulanfang) und pHN11 (Modulende) wurden in *E. coli* XL1 blue transformiert, und die darin enthaltenen Inserts konnten mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus den Plasmiden herausgeschnitten werden. Im Falle des Modulanfangs dienen die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Cl*aI als Restriktionsenzyme. Das Modulende wurde mit Hilfe von *Bsp*EI und *Eag*I isoliert. Da die Enzyme *Cl*aI und *Bsp*EI methylierungsempfindlich sind, wurden die Konstrukte pHN1 und pHN11 zuvor in den nichtmethylierenden *E. coli*-Stamm ET 12567 transferiert. Gleiches erfolgte mit dem Cosmid pPS9D2, da der Mittelteil ebenfalls mit den Enzymen *Cl*aI und *Bsp*EI aus dem Cosmid geschnitten wurde. Die Fragmente wurden mit Hilfe einer Gelelektrophorese (6.5.7) und anschließender Gelisolation (6.5.8) aufgereinigt und konnten in einer Ligation (6.5.11) eingesetzt

werden. Der Vektor pBluescript SK(+) wurde vor der Ligation mit *Bam*HI und *Eag*I in der MCS geschnitten, sodass der Vektor kompatible Enden für die Insertionsfragmente aufwies. Alle Fragmente wurden in einer 4-Punkt-Ligation zusammengefügt und die erhaltenen Plasmide mittels Restriktionsanalyse sowie PCR analysiert. Dies war aufgrund der Komplexität der 4-Punkt-Ligation von höchster Wichtigkeit, da viele falsche Ligationen zu verzeichnen waren. Nach der Identifikation des richtigen Plasmids war der fertige Shuttle-Vektor pHN9 entstanden. Aus dem Plasmid pHN9 wurde erneut das Insert ausgeschnitten, um einen Transfer in den Expressionsvektor pHis8-*svp* zu ermöglichen. Ein Transfer über die vorhandenen Schnittstellen *Bam*HI und *Eag*I war nicht möglich, da die *Eag*I/*Not*I-Schnittstelle im Expressionsvektor bereits für die Klonierung des *svp*-Gens verwendet wurde. Daher wurde die im Folgenden erläuterte Strategie verwendet. Der Vektor pHis8-*svp* wurde mit dem Restriktionsenzym *Hind*III geschnitten und das Plasmid pHN9 mit *Eag*I. Die linearisierten Plasmide wurden mit Hilfe der T4-Polymerase an den vorhandenen kompatiblen Enden in glatte Enden überführt (6.5.13) Die Reaktionsansätze wurden daraufhin mit *Bam*HI weiter verdaut, sodass der Vektor und das Insert jeweils ein kompatibles *Bam*HI-Ende und ein kompatibles glattes Ende aufwies. Nach erfolgter Ligation und Transformation konnten die positiven Klone durch die Kanamycin Resistenz selektiert werden und die Plasmide durch Restriktion charakterisiert werden. Das fertige Expressionsplasmid wurde mit pHN10 bezeichnet.

Die beschriebene Klonierungsstrategie wurde zur Verdeutlichung in der Abb. 5-1 schematisch dargestellt.

Für die zweite Variante wurde die gleiche Strategie verwendet. Der Unterschied besteht in der Klonierung des Modulendes. Hier wurde beim Primerdesign kein Stop-Codon angefügt. Die resultierenden Plasmide tragen die Bezeichnungen pHN2 (kloniertes PCR-Fragment des Modulendes), pHN3 (fertiggestellter Shuttle-Vektor von *ped*13). Somit entspricht das Plasmid pHN2 dem Plasmid pHN11 bzw. pHN3 dem Plasmid pHN9 mit dem Unterschied des fehlenden bzw. vorhandenen Stop-Codons. Eine Übertragung von *ped*13 in einen Expressionsvektor erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht, da zuvor die Expression mit dem Plasmid pHN10 getestet wurde.

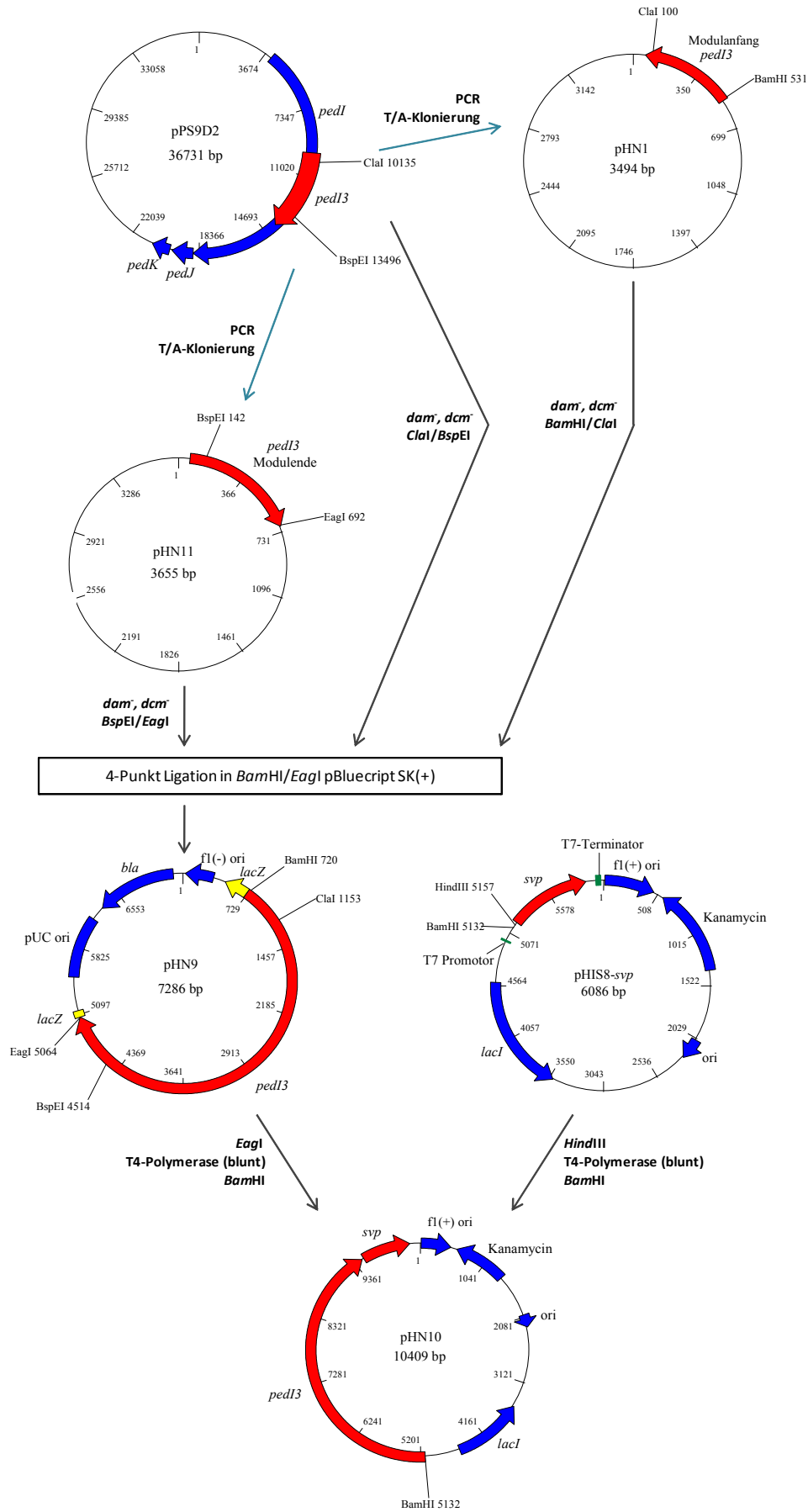


Abb. 5-1: Klonierung des Ped13-Expressionsplasmids pHN10.

5.1.1.2 Klonierungen zur Fusion des *pedF*-Linkers sowie der Linker *eryA*_{1,2} mit *pedI3*

Zur vollen Funktionalität eines exprimierten Moduls konnte an der Picromycin/Methymycin-PKS (PICS) beobachtet werden, dass ein 50-100 Aminosäure enthaltender Linker am 5`-Ende des Moduls notwendig ist.^{156,157} Daher wurden vor das Modul *pedI3* drei unterschiedliche molekulare Linker kloniert. Verwendung fanden hierbei der *pedF*-Linker als Pederin-spezifischer Linker sowie der *eryA*-Linker in zwei Varianten. Letztere wurden schon zur Funktionalisierung des zweiten Moduls der PICS verwendet.¹⁵⁶

Die genauen Fusionsstellen an das Modul *pedI3* wurde in Anlehnung an die Literatur¹⁵⁶ durchgeführt und mit Proteinalignments bestimmt (vgl. 6.6.1).

Bei der Klonierungsstrategie (Abb. 5-2 und Abb. 5-3) wurden zur Fusion Schnittstellen ausgenutzt, die in der fusionierten Sequenz aus Linker und Modul vorhanden sind. Die Zielsequenz des Modulanfangs fusioniert mit dem *eryA*-Linker enthält die Schnittstelle *Hpy188I* und die Zielsequenz des Modulanfangs fusioniert mit dem *pedF*-Linker enthält die Schnittstelle *Bsu36I*. Diese Schnittstellen wurden nun so ausgenutzt, dass an die PCR-Primer Nucleotide angefügt wurden und somit im Falle des Erythromycin Linkers am 5`-Ende eine *Hpy188I*-Schnittstelle entstand und beim *pedF*-Linker am 5`-Ende eine *Bsu36I*-Schnittstelle. Bei dem jeweiligen kompatiblen Modulanfang wurden eine *Hpy188I*-Schnittstelle bzw. *Bsu36I*-Schnittstelle mit Hilfe der PCR-Primer an das 3`-Ende angefügt. Dadurch entstehen geeignete Enden zur Fusion der Linker mit dem Modul *pedI3*.

Als Grundlage für die Klonierung von *eryA*-Linker_{1,2} und Modul *pedI3* diente das Plasmid pHN9. Es wurde mit *Bam*HI und *Cl*al geschnitten und zur Integration von Modulanfang und Linker vorbereitet. Zur Amplifikation des *eryA*-Linkers_{1,2} wurde als Templat die genomische DNA von *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 verwendet. Dabei wurde am 5`-Ende die Schnittstelle *Bam*HI und am 3`-Ende eine *Hpy188I*-Schnittstelle angefügt. Die Primer sind in Tab. 6-11 angegeben. Parallel wurde der Modulanfang von *pedI3*, mit den 5`-angefügten Basen zur Restriktion mit *Hpy188I* und den 3`-angefügten Basen zur Restriktion mit *Cl*al, neu amplifiziert. Die Primer sind ebenfalls in Tab. 6-11 aufgeführt. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pBluescript SK(+) mittels T/A-Klonierung zwischenkloniert. Auf diese Weise entstanden die Plasmide pHN8 und pHN18. Diese enthalten den *eryA*-Linker_{1,2}. Das ebenfalls erhaltene Plasmid pHN13 enthält den Modulanfang zur Fusion mit den Linkern über *Hpy188I*. Die Linker wurden aus den Plasmiden pHN8 und pHN18 durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hpy188I* isoliert. Der Modulanfang wurde analog über eine Restriktion von pHN13 mit *Hpy188I* und *Cl*al isoliert. Die beiden erhaltenen Fragmente konnten daraufhin über eine 3-Punkt-Ligation in das *Bam*HI/*Cl*al vorbereitete Plasmid pHN9 inseriert werden. Die erfolgreiche Ligation ergab die Fusion aus *eryA*-Linker und *pedI3*. Die entstandenen Plasmide tragen die Bezeichnung pHN15 und pHN19. Aus den genannten Plasmiden konnte analog zu der

bereits beschriebenen Methode zur Übertragung des Moduls *ped3* vom Lagerungsplasmid auf den Expressionsvektor pHS8-*svp* (vgl. 5.1.1.1) die Fusionsprodukte transferiert werden. Dabei entstanden die Expressionsplasmide pHN17 (*eryA*-Linker₁ fusioniert mit *ped3*) sowie pHN20 (*eryA*-Linker₂ fusioniert mit *ped3*). Zur Verdeutlichung zeigt Abb. 5-2 schematische die Vorgehensweise.

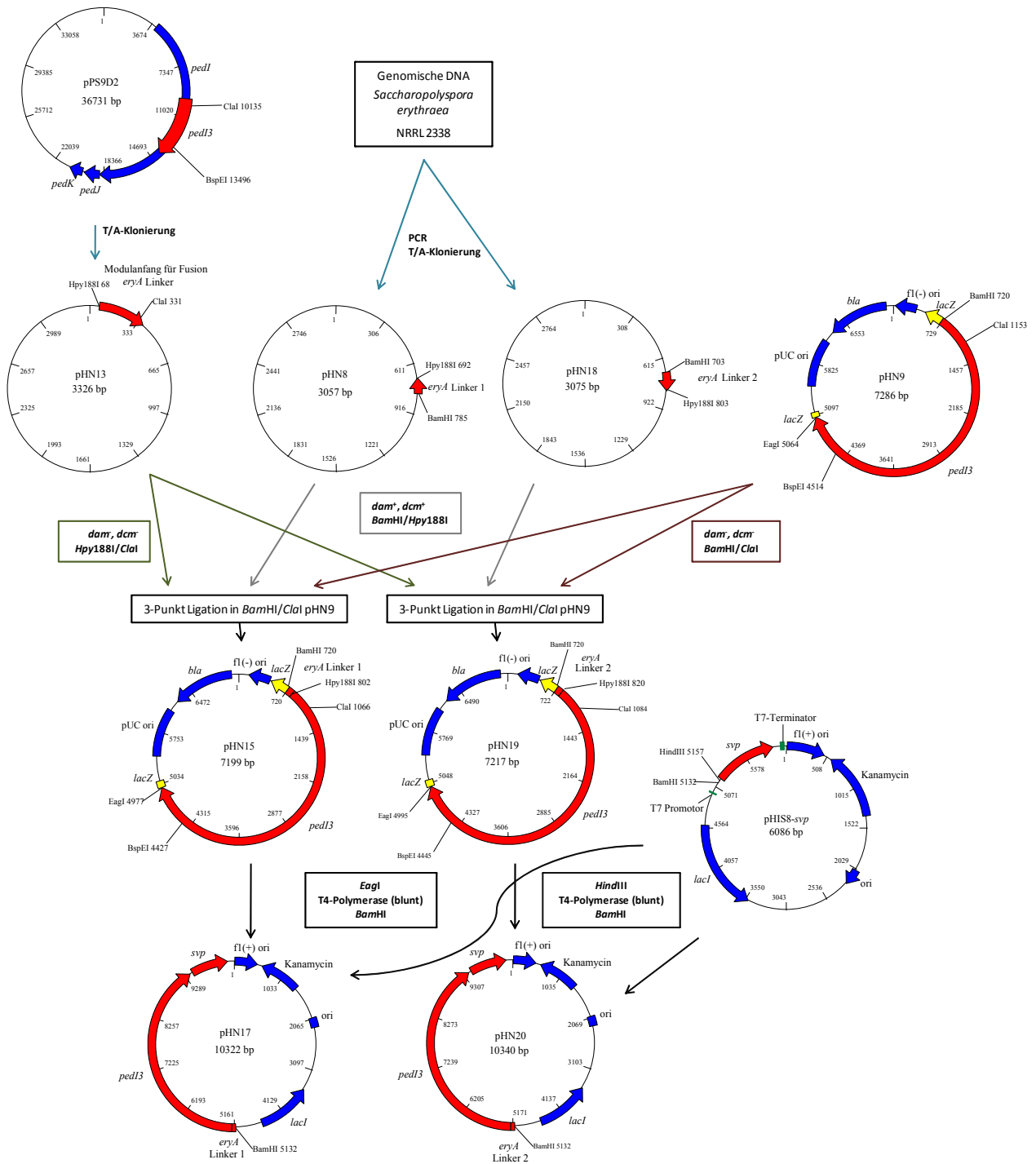


Abb. 5-2: Klonierung des Fusionsproduktes aus *eryA*-Linker_{1,2} und *ped3*.

Als Grundlage für die Fusion des *pedF*-Linkers mit *pedI3* diente das Plasmid pHN9 (Abb. 5-3). Dieses wurde mit *Bam*HI und *Cl*al geschnitten und zur Integration von *pedF*-Linker und Modulanfang vorbereitet. Zur PCR-Amplifikation des *pedF*-Linkers wurde als Templat das Cosmid pPD23E7 verwendet.³⁸ Dabei wurden mittels geeigneter Primer am 5`-Ende die Schnittstelle *Bam*HI und am 3`-Ende eine *Bsu*36I-Schnittstelle angefügt. Die Oligonucleotide sind in Tab. 6-11 dargestellt. Parallel wurde der Modulanfang von *pedI3* mit den 5`-angefügten Basen zur Restriktion mit *Bsu*36I und den 3`-angefügten Basen zur Restriktion mit *Cl*al amplifiziert. Die entsprechenden Primer sind ebenfalls in Tab. 6-11 dargestellt. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pBluescript SK(+) mittels T/A-Klonierung zwischenkloniert. Auf diese Weise entstanden pHN7, das den *pedF*-Linker enthält und pHN12, das den Modulanfang für die Fusion mit dem Linker über die *Bsu*36I-Schnittstelle trägt. Der Linker wurde aus dem Plasmid pHN7 durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Bsu*36I und darauf folgender Gelextraktion isoliert. Der Modulanfang wurde analog über eine Restriktion mit *Bsu*36I und *Cl*al isoliert. Die beiden Fragmente konnten daraufhin über eine 3-Punkt-Ligation in das *Bam*HI/*Cl*al verdaute Plasmid pHN9 inseriert werden. Das entstandene Plasmid wurde mit pHN14 bezeichnet. Das Fragment aus *pedF*-Linker und *pedI3* konnte analog zu der bereits beschriebenen Methode zur Übertragung des Moduls *pedI3* vom Lagerungsplasmid auf den Expressionsvektor pHis8-*svp* (vgl. 5.1.1.1) genutzt werden. Die folgende schematische Abb. 5-3 verdeutlicht die Vorgehensweise.

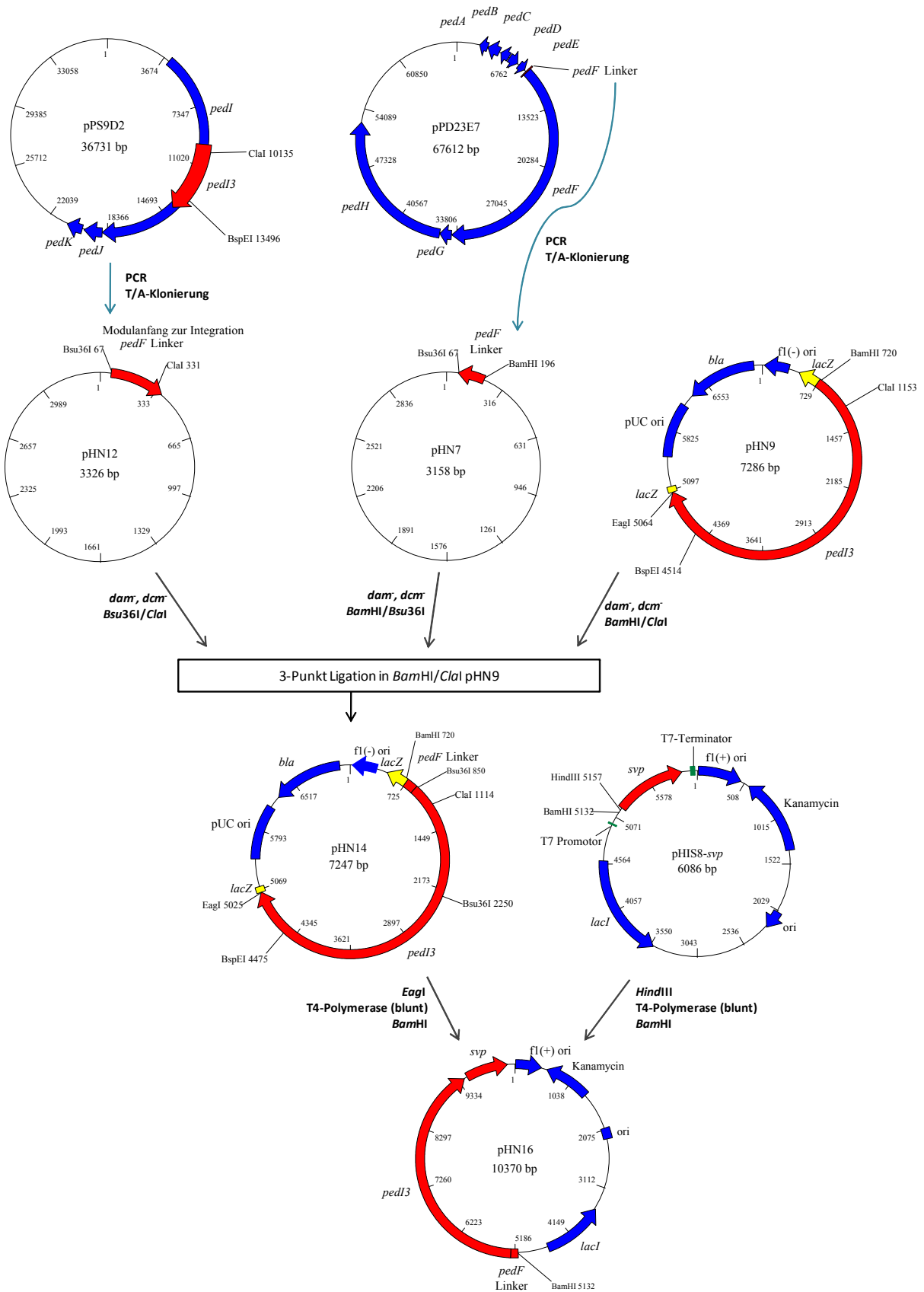


Abb. 5-3: Klonierung des Fusionsproduktes aus dem *pedF*-Linker und *ped3*.

5.1.1.3 Klonierung von *psyA*-ACP₃ und der *psyD*-ACP₁

Um die Phosphopantetheinylierungsreaktion an einzelnen ACPs der Psymberein **21**-Biosynthese zu überprüfen, wurden die Modul-integrierten ACPs *psyA*-ACP₃ sowie *psyD*-ACP₁ in verschiedene Vektoren kloniert (Abb. 5-4 und Abb. 5-5). Als Expressionsvektoren wurden pHIS8-*svp*, pASK-IBA3 und pASK-IBA5 verwendet. Dadurch konnte eine Variabilität in Aufreinigungstags sowie in der Induktionsintensität der Proteinexpression erreicht werden. So standen nach der Klonierung und Expression ein N-terminales His-Tag und ein N- bzw. C-terminales Strep-Tag II Protein zur Verfügung. Die Expression des His-Tag Proteins konnte unter der Regulation des IPTG-induzierbarem T7-Promotors und die Expression der Strep-Tag II Proteine unter der Kontrolle des Anhydrotetracyclin-induzierbarem Tet-Operons erfolgen. Bei den Strep-Tag II-Fusionsproteinen erfolgte keine Phosphopantetheinylierung durch die Co-Expression der *Svp* sondern die posttranslationale Modifikation musste im Anschluss an die Expression durch eine separat exprimierte PPTase erfolgen.

Bei der Klonierung wurden die entsprechenden Genabschnitte mittels PCR amplifiziert. Als Templat diente das Cosmid pPSKF1.⁶¹ Durch das Primerdesign wurden jeweils geeignete Schnittstellen an die Sequenzen angefügt. Die Primer sind in Tab. 6-11 aufgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels T/A-Klonierung in pBluescript SK(+) transferiert. Dabei entstanden für *psyA*-ACP₃ die Plasmide pHN75, pHN61 und pHN63. Analog entstanden für *psyD*-ACP₁ die Plasmide pHN76, pHN67 und pHN69. Die Übertragung von *psyA*-ACP₃ aus dem jeweiligen Lagerungsplasmid auf den Expressionsvektor erfolgte bei pHN75 mit *Bam*HI/*Hind*III, bei pHN63 mit *Eco*RI/*Pst*I und bei pHN65 mit *Eco*RI/*Nco*I. Das isolierte Fragment aus pHN75 wurde in pHIS8-*svp*, aus pHN61 in pASK-IBA3 und aus pHN63 in pASK-IBA5 ligiert. Die Expressionsplasmide tragen die Bezeichnung pHN77, pHN62 und pHN64. Der Transfer von *psyD*-ACP₁ vom jeweiligen Lagerungsplasmid auf den Expressionsvektor erfolgte bei pHN77 mit *Bam*HI/*Hind*III und bei pHN67 und pHN69 jeweils mit *Bsa*I/*Bsa*I. Das isolierte Fragment aus pHN77 wurde in pHIS8-*svp*, aus pHN62 in pASK-IBA3 und aus pHN64 in pASK-IBA5 ligiert. Die so erhaltenen Expressionsplasmide wurden mit pHN78, pHN68 und pHN70 bezeichnet. Die Klonierung von pHN60 und pHN66 wird im folgenden Abschnitt 5.1.1.4 beschrieben. Die Plasmide pHN60 bzw. pHN66 unterscheiden sich im Gegensatz zu den Plasmiden pHN77 bzw. pHN78 durch das Fehlen des *svp*-Gens.

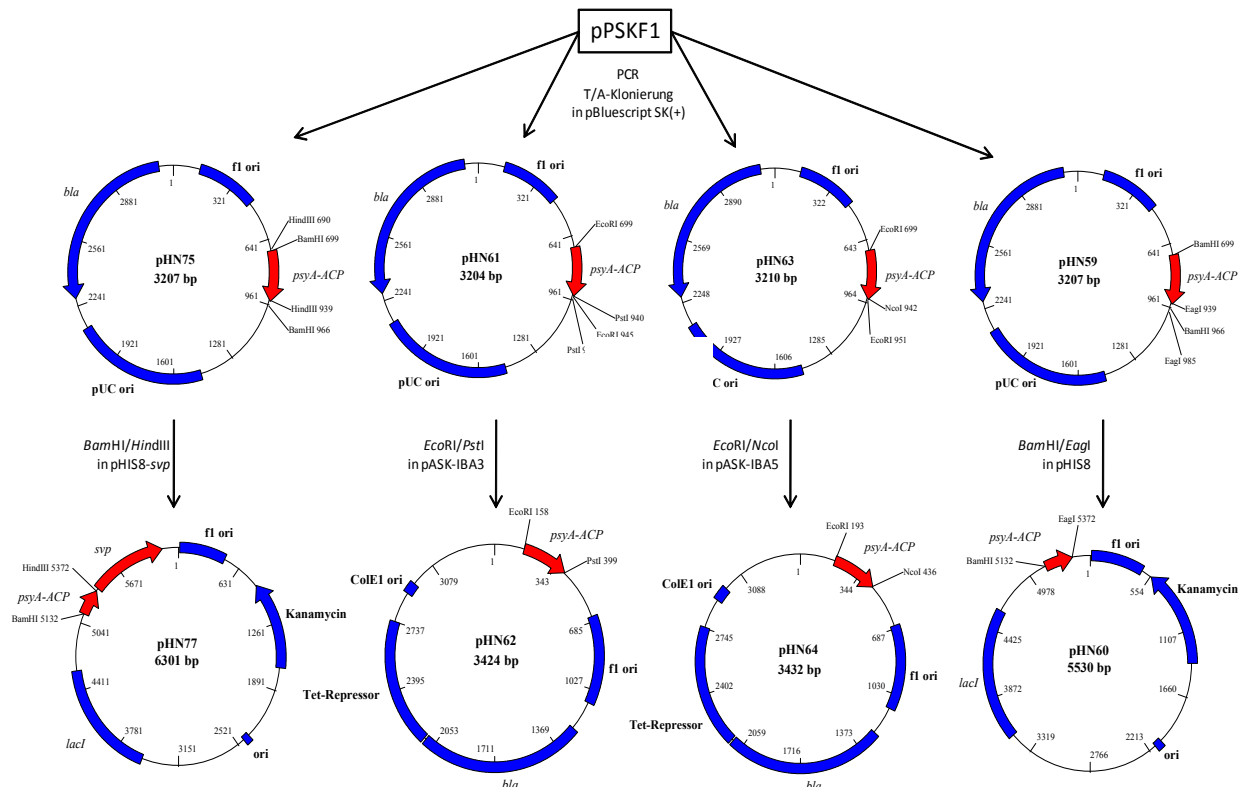


Abb. 5-4: Klonierung der PsyA-ACP₃-Expressionsplasmide pHN77, pHN62, pHN64 und pHN60. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPSKF1⁶¹ PCR-amplifiziert.

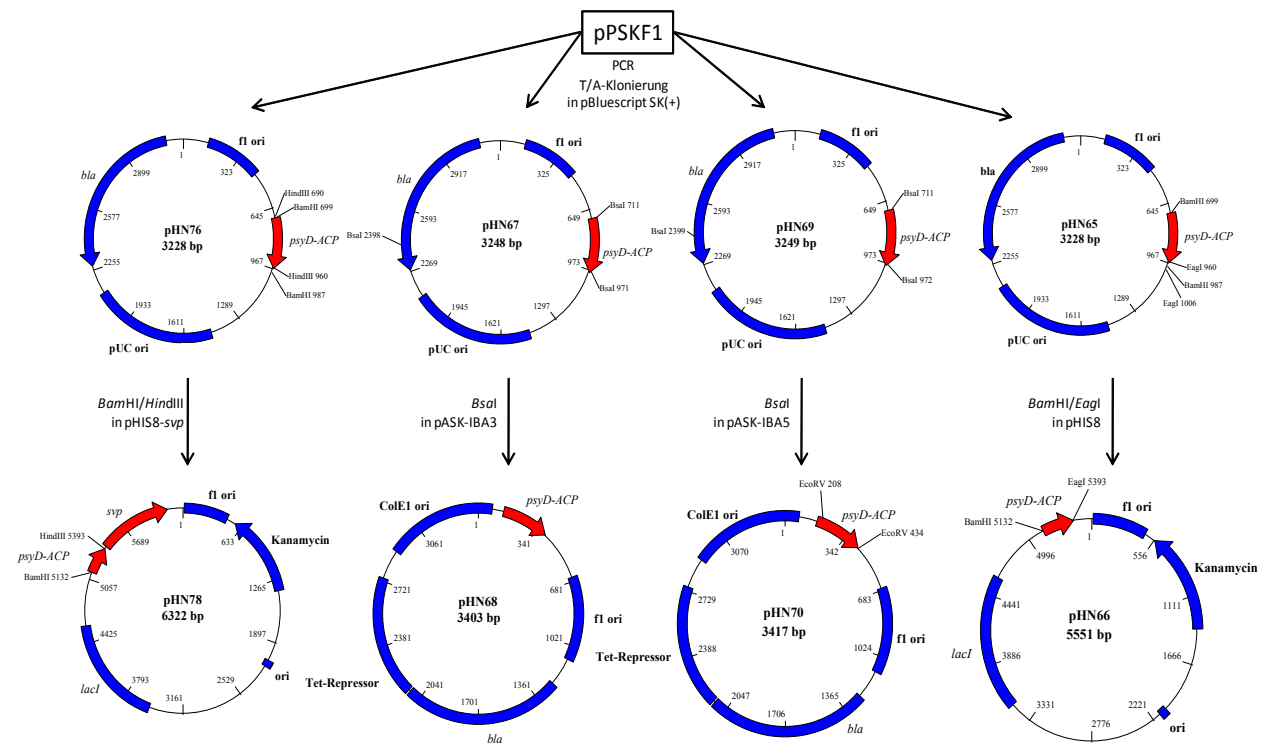


Abb. 5-5: Klonierung der PsyD-ACP₁-Expressionsplasmide pHN78, pHN68, pHN70 und pHN66. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPSKF1⁶¹ PCR-amplifiziert.

5.1.1.4 Entfernung der *svp* aus den Expressionsplasmide

Für die Untersuchung der posttranslationalen Modifikation waren Negativkontrollen notwendig. Hierzu waren Expressionssysteme notwendig, die die ACPs auch ohne Phosphopantetheinarm exprimieren. Dies war durch die Entfernung des *svp*-Gens aus pHIS8-*svp* möglich. Bei *in vitro*-Experimenten mit der *sfp* wird der PPTase-Reaktionsassay nicht durchgeführt. Zusätzlich muss dabei beachtet werden, dass die in *E. coli* vorkommenden PPTasen AcpS und EntD ebenfalls Modifikationen an Carrierproteinen (CP) durchführen können.²⁵⁻²⁷ Allerdings ist die PPTase AcpS für die Modifizierung von FAS ACP zuständig und modifiziert für gewöhnlich keine PKS ACP. Ausnahmen stellen hier die CP einiger *Streptomyces* spp. PKS dar.¹⁵⁸ Die PPTase EntD modifiziert nur das CP des Enterobactinsystems und sollte daher keine Modifikation der hier exprimierten ACPs der Pederin- oder Psymberin PKS vornehmen.²⁵

Zur Expression der zu untersuchenden *apo*-ACPs wurde aus den Expressionsplasmiden von *pedI3* und dessen Linkerfusionsprodukten die *svp* mittels Restriktion ausgeschnitten. Dazu wurden pHN10, pHN16, pHN17 und pHN20 mit *NotI* geschnitten. Die Plasmide wurden isoliert und religiert. Die resultierenden Expressionsplasmide pHN33, pHN34, pHN35 und pHN36 standen für die Expression von *pedI3* und dessen Linkerfusionsprodukte ohne der Co-Expression der *svp* zur Verfügung.

Auch für die Expression des ACP der Psymberin **21**-Biosynthese sollten Expressionssysteme bereitstehen, die ohne Co-Expression der *svp* durchgeführt werden konnten. Zur Expression von *psyA*-ACP₃ bzw. *psyD*-ACP₁ existieren, wie bereits in Abschnitt 5.1.1.3 beschrieben, die Plasmide pHN77, pHN62 und pHN64 bzw. pHN78, pHN68 und pHN70. Bei den Plasmiden pHN62, pHN64, pHN68 und pHN70 wird aufgrund der Verwendung der Vektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5 kein *svp* co-exprimiert. Die Phosphopantetheinylierung kann daher durch eine *in vitro* Reaktion mit der PPTase *Sfp* untersucht werden. Die Plasmide pHN77 und pHN78 enthalten aufgrund der Verwendung des Vektors pHIS8-*svp* das Gen für eine Expression von *svp*. Eine Entfernung der PPTase wäre zwar über einen *NotI*-Verdau möglich gewesen, da jedoch das ACP *psyA*-ACP₃ und *psyD*-ACP₁ in einem zeitlich früheren Experiment in den Vektor pHIS8 kloniert wurde, war dieser Schritt nicht mehr notwendig. In dieser Klonierung wurden die Sequenzen PCR-amplifiziert. Als Templat diente das Cosmid pPSKF1.⁶¹ Durch den Primerdesign wurden geeignete Schnittstellen an die Sequenz angefügt. Die Primer sind der Tab. 6-11 aufgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels T/A-Klonierung in pBluescript SK(+) ligiert. Dabei entstand das *psyA*-ACP₃ enthaltende Plasmid pHN59. Analog entstand das *psyD*-ACP₁ enthaltende Plasmid pHN65. Die Übertragung von *psyA*-ACP₃ und *psyD*-ACP₁ vom Shuttle-Vektor auf den Expressionsvektor erfolgte mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI/*Eag*I. Die durch Ligation erhaltenen Expressionsplasmide wurden mit pHN60 für *psyA*-ACP₃ und pHN66 für *psyD*-ACP₁ bezeichnet.

5.1.1.5 Zusammenfassende Übersicht der Expressionsplasmide zur ACP-Analyse

Die folgende Tab. 5-1 gibt einen Überblick über die fertiggestellten Plasmide zur Überexpression der einzelnen ACPs der Psymberin **21**-Biosynthese (*psyA*-ACP₃ und *psyD*-ACP₁) sowie des ACP-enthaltenden Moduls *pedI3* und dessen Linkerfusionsprodukte.

Tab. 5-1: Übersicht über die fertiggestellten Expressionsplasmide zur Überexpression von ACPs und ACP-enthaltender Proteine.

Bezeichnung	Expressionsvektor	Aufreinigungs-Tag	Exprimiertes Protein	Regulation
pHN10	pHIS8- <i>svp</i>	N-terminaler His ₈ -Tag	<i>holo</i> -PedI3	T7-Promotor
pHN16	pHIS8- <i>svp</i>	N-terminaler His ₈ -Tag	Fusion PedF-Linker/ <i>holo</i> -PedI3	T7-Promotor
pHN17	pHIS8- <i>svp</i>	N-terminaler His ₈ -Tag	Fusion EryA-Linker ₁ / <i>holo</i> -PedI3	T7-Promotor
pHN20	pHIS8- <i>svp</i>	N-terminaler His ₈ -Tag	Fusion EryA-Linker ₂ / <i>holo</i> -PedI3	T7-Promotor
pHN33	pHIS8	N-terminaler His ₈ -Tag	<i>apo</i> -PedI3	T7-Promotor
pHN34	pHIS8	N-terminaler His ₈ -Tag	Fusion PedF-Linker/ <i>apo</i> -PedI3	T7-Promotor
pHN35	pHIS8	N-terminaler His ₈ -Tag	Fusion EryA ₁ -Linker/ <i>apo</i> -PedI3	T7-Promotor
pHN36	pHIS8	N-terminaler His ₈ -Tag	Fusion EryA ₂ -Linker/ <i>apo</i> -PedI3	T7-Promotor
pHN60	pHIS8	N-terminaler His ₈ -Tag	<i>apo</i> -PsyA-ACP ₃	T7-Promotor
pHN62	pASK-IBA3	C-terminaler Strep Tag II	<i>apo</i> -PsyA-ACP ₃	Tet-Operon
pHN64	pASK-IBA5	N-terminaler Strep Tag II	<i>apo</i> -PsyA-ACP ₃	Tet-Operon
pHN66	pHIS8	N-terminaler His ₈ -Tag	<i>apo</i> -PsyD-ACP ₁	T7-Promotor
pHN68	pASK-IBA3	C-terminaler Strep Tag II	<i>apo</i> -PsyD-ACP ₁	Tet-Operon
pHN70	pASK-IBA5	N-terminaler Strep Tag II	<i>apo</i> -PsyD-ACP ₁	Tet-Operon
pHN77	pHIS8- <i>svp</i>	N-terminaler His ₈ -Tag	<i>holo</i> -PsyA-ACP ₃	T7-Promotor
pHN78	pHIS8- <i>svp</i>	N-terminaler His ₈ -Tag	<i>holo</i> -PsyD-ACP ₁	T7-Promotor

Die in der Tabelle dargestellten Plasmide ermöglichen die Expression der interessierenden ACPs. Jedes ACP ist dabei in der *holo*- bzw. *apo*-Form exprimierbar. Für die Strep-Tag Proteine ist eine Phosphopantetheinylierung mittels Sfp möglich.

5.1.1.6 Expression von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten

Die Expression des Moduls PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukte konnte durch eine sukzessive Optimierung der Expressionsbedingungen erfolgreich durchgeführt werden. Für die Expression der *holo*-Module kamen die Expressionsplasmide pHN10, pHN16, pHN17 und pHN20 zum Einsatz. Die *apo*-Module wurden über die Plasmide pHN33, pHN34, pHN35 und pHN36 exprimiert. Die Optimierung der Expression erfolgte zuerst am *holo*-Modul PedI3 mit dem Plasmid pHN10 und wurde später auf die Linkerfusionsprodukte und *apo*-Module übertragen. Die Plasmide wurden in Expressionsstämme transformiert. Dabei kamen die Stämme *E. coli* BL21 DE3 und *E. coli*

Rosetta-gami 2 DE3 pLysS zum Einsatz. Die genauen Expressionsbedingungen sind direkt zu den einzelnen Expressionen ausgewiesen (Abb. 5-6 bis Abb. 5-9).

Zur Optimierung wurden die Expressionstemperaturen von 16 °C, 20 °C, 24 °C, 28 °C, 30 °C und 37 °C getestet. Die Expressionszeiten variierten zwischen 2, 4, 6, 8, 12, 14 und 16 h. Die Induktionsstärken lagen bei 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM und 1 mM IPTG-Endkonzentration in der Expressionskultur und es wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 2 induziert. Es wurden die Medien TB, HSG, LB und das "Overnight Express Autoinduction TB Medium" getestet. Den Puffern der Zellyse und den Elutionspuffern wurden die Detergentien Igepal, Tween und Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,1 % zugegeben. Diese Detergentien werden häufig bei der Aufreinigung von Membranproteinen eingesetzt und stabilisieren hydrophobe, nach außen gerichtete Regionen dieser Proteine.¹⁵⁹ Falls hydrophobe Regionen bei dem Modul PedI3 vorhanden sein sollten, könnten die Detergentien zum Erhalt löslichen Proteins von Vorteil sein.

Die erfolgten Versuchsreihen zeigten eine erfolgreiche Expression in *E. coli* BL21 DE3 bei 16 °C und einer Induktionsstärke von 0,5 mM IPTG (Endkonzentration). Die Kultivierung wurde in 200 mL LB-Medium durchgeführt. Die Schüttelkolben hatten keine Schikanen und es waren keine Detergentien bei der Zellyse und Aufreinigung nötig. Im Prozessverlauf wurde die Kultur bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 angezogen. Vor der Induktion mit einer Endkonzentration von 0,5 mM IPTG wurde die Kultur auf 16 °C abgekühlt. Die Proteinexpression erfolgte bei 16 °C für 12 h. Die Aufreinigung des Octahistidyl-getagtem PedI3 erfolgte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter steigender Imidazol-Konzentration im Elutionspuffer. Die Analytik der Expression erfolgte mittels SDS-PAGE. Anhand eines Vergleichs mit dem gleichzeitig aufgetragenen Proteinmarker konnten die erhaltenen Fraktionen auf eine positive Expression und erfolgreiche Aufreinigung überprüft werden (Abb. 5-6). Alle anderen Testexpressionen zeigten unlösliches PedI3 im Pellet (Daten nicht dargestellt). Auch die Expression in *E. coli* Rosetta-gami 2 DE3 pLysS führte zu keinem löslichem Protein in den Elutionsfraktionen (Daten nicht dargestellt).

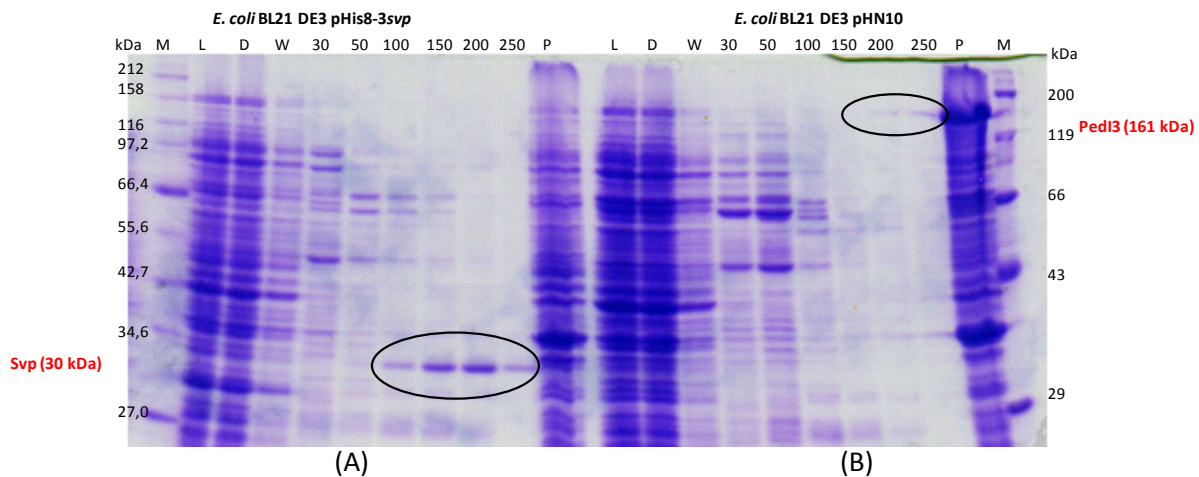


Abb. 5-6: Proteingel der Expression des 161 kDa Moduls Ped13 aus *E. coli* BL21 DE3 pHN10 (B).

Als Negativkontrolle wurde *E. coli* BL21 DE3 pHis8-*svp* verwendet (A). Expression: 200 mL LB-Medium. 16 °C; 12 h; 0,5 mM IPTG. M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, 30 = 30 mM Imidazol Elutionsfraktion, 50 = 50 mM Imidazol Elutionsfraktion, 100 = 100mM Imidazol Elutionsfraktion, 150 = 150 mM Imidazol Elutionsfraktion, 200 = 200 mM Imidazol Elutionsfraktion, 250 = 250 mM Imidazol Elutionsfraktion, P = Pellet; SDS-PAGE(Trenngel): 12 %.

Auf dem Proteingel ist zu erkennen, dass das Modul Ped13 exprimiert wird. Dies zeigt sich in den relativ schwachen Banden der 200 und 250 mM Elutionsfraktionen. Durch eine Bestimmung der Proteinkonzentration konnte die Ped13-Konzentration mit $9 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ quantifiziert werden. Allerdings ist der weitaus größere Anteil von Ped13 unlöslich im Pellet. Im Vergleich mit der Negativkontrolle aus *E. coli* BL21 DE3 pHis8-*svp* zeigt sich, dass nur im Stamm *E. coli* BL21 DE3 pHN10 ein Überexpression eines 161 kDa großen Proteins zu verzeichnen ist. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass die Bande aufgrund eines nativen *E. coli* Proteins vorhanden war. Besonders auffällig zeigt sich dieses Ergebnis im Pellet. Die Negativkontrolle wurde parallel und unter den gleichen Expressionsbedingungen exprimiert. In der Negativkontrolle wurde ein ca. 30 kDa großes Protein exprimiert. Dabei handelt es sich um die PPTase Svp, die aufgrund der fehlenden Integration eines Gens in die MCS von pHis8-*svp* als His₈-Fusionsprotein exprimiert wird.

Aufgrund der sehr geringen Konzentrationen an löslichem Protein in den Elutionsfraktionen wurde nach weiteren Verbesserungsmethoden gesucht. Außerdem erwies sich die Expressionsmethode als nicht reproduzierbar genug. Einige Expressionen lieferten die beschriebenen Proteinkonzentrationen wogegen andere Expressionen, unter gleichen Bedingungen, kein Ped13 in den Elutionsfraktionen zeigte. Eine Maßstabsvergrößerung der Kultivierung brachte keine höheren Proteinkonzentrationen und auch die Optimierung der Kultivierungsdauer zeigte keine verbesserten Ergebnisse. Da der weitaus größte Anteil der exprimierten Proteine im Pellet vorlag, konnte vermutet werden, dass die Faltung der Proteine nicht korrekt erfolgt oder eine Bildung von „inclusion bodies“ eine mögliche Ursache sein könnte. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, wurde versucht, mit einer Co-Expression von Chaperonen bessere Ergebnisse zu erzielen. In einigen Studien zeigte die Co-Expression von Chaperonen eine verbesserte Löslichkeit der Proteine, verhinderte die

Aggregation des überexprimierten Proteins oder machte die Expression der Proteine überhaupt erst möglich.^{113,115,116}

Für die Co-Expression von Chaperonen wurden die Plasmide pKJE7, pG-KJE8, pG-Tf2, pGro7 und pTf16 verwendet.^{115,116} Dazu wurde zuerst eines der genannten Chaperone-Plasmide in *E. coli* BL21 DE3 transformiert und anschließend eines der Plasmide pHN10, pHN16, pHN17 und pHN20 durch eine erneute Transformation in die Zellen gebracht. Die Kultivierungsbedingungen wurden identisch zur bereits erfolgreichen Expression des Moduls PedI3 ohne Chaperone durchgeführt. Zur Induktion der Chaperone über das *araB/araC*-System wurde das Medium vor der Kultivierung mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/mL Arabinose supplementiert. In einigen Plasmiden findet der *Pzt1*-Promotor Verwendung. Bei diesen Plasmiden wurde die Chaperon-Expression mit einer Endkonzentration von 10 ng/mL Tetracyclin induziert.

Nach den erfolgten Experimenten zeigten die Expressionen mit *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 stark erhöhte Konzentrationen von PedI3 in den Elutionsfraktionen (Abb. 5-7). Die durch das Plasmid pKJE7 co-exprimierten Chaperone sind DnaK (70 kDa), DnaJ (40 kDa) und GrpE (22 kDa). Die Co-Expressionen der Chaperone durch die Plasmide pG-KJE8, pG-Tf2, pGro7 und pTf16 wurden ebenfalls durchgeführt. Jedoch konnten hier keine Verbesserungen erzielt werden (Daten nicht dargestellt). Die Verwendung der Plasmide pG-Tf2, pGro7 und pTF16 lieferte ausschließlich unlösliches Protein im Pellet und pG-KJE8 zeigte ähnliche Ergebnisse wie pKJE7. Hierbei ist anzunehmen, dass die erhöhten Proteinkonzentrationen durch die Co-Expression der Chaperone von pG-KJE8 auf dem gleichen Effekt beruhen wie bei dem Plasmid pKJE7, da bei pGKJE8 neben den Chaperonen GroEL und GroES die Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE kodiert sind, wie dies auch bei pKJE7 der Fall ist.

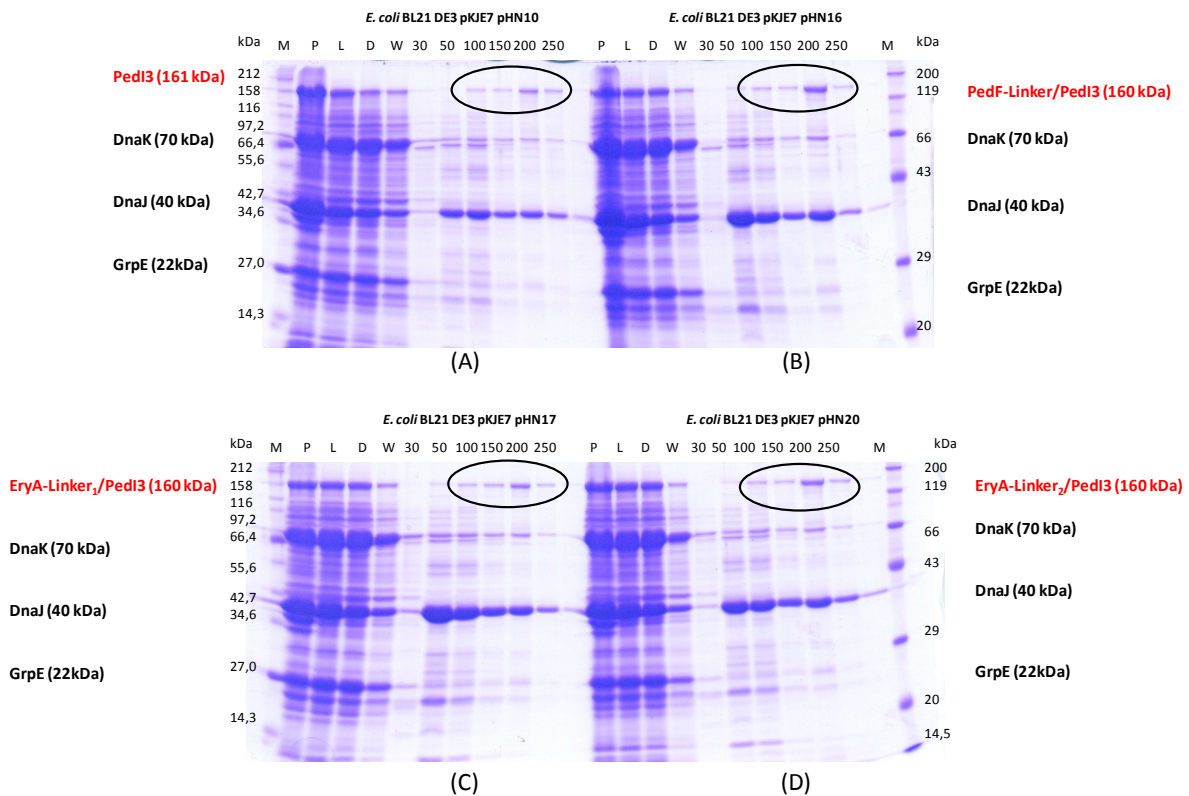


Abb. 5-7: Proteinexpression von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten unter Co-Expression von DnaK, DnaJ und GrpE.

(A) PedI3 aus *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 pHN10; (B) PedF-Linker/PedI3 aus *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 pHN16; (C) EryA-Linker₁/PedI3 aus *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 pHN17; (D) EryA-Linker₂/PedI3 aus *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 pHN20. Expression: 200 mL LB-Medium. 16 °C; 12 h; 0,5 mM IPTG; 0,4 mg x mL⁻¹ Arabinose.

M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, 30 = 30 mM Imidazol Elutionsfraktion, 50 = 50 mM Imidazol Elutionsfraktion, 100 = 100mM Elutionsfraktion, 150 = 150 mM Imidazol Elutionsfraktion, 200 = 200 mM Imidazol Elutionsfraktion, 250 = 250 mM Imidazol Elutionsfraktion, P = Pellet; SDS-PAGE (Trenngel): 12 %.

Die Proteingele unter Co-Expression von Chaperone (Abb. 5-7) zeigen im Vergleich zu der Expression ohne Chaperone (Abb. 5-6) stark erhöhte Proteinkonzentrationen von PedI3 und dessen Linkerfusionsproteinen. In den Elutionsfraktionen sind außerdem große Mengen an Chaperon-Proteinen vorhanden. Die Chaperon-Proteine tragen keinen His-Tag, sodass angenommen wurde, dass die Chaperone mit den Zielproteinen assoziiert sind und nur indirekt durch die Wechselwirkungen mit dem PedI3 auf der Ni-NTA-Säule gebunden werden. Dieser Effekt zeigte sich besonders deutlich bei dem 40 kDa großen DnaJ. Diese Vermutung der indirekten Elution mit dem Zielprotein PedI3 erhärtete sich, da die Konzentrationen von Chaperon-Proteinen nicht sukzessive im Zuge der Elutionsfraktionen abgereichert werden, sondern in den Fraktionen verstärkt eluieren, die auch das Zielprotein enthalten. Besonders deutlich ist dies in den 200 mM Imidazol Elutionsfraktionen zu sehen. Eine genauere Betrachtung dieses Phänomens und Trennungsversuche von Zielprotein und Chaperone erfolgen unter Abschnitt 5.1.8. Da in den Elutionsfraktionen große Mengen an Chaperonen vorhanden sind erfolgte die Quantifizierung entsprechend 6.6.10.2 über die Bandenintensitäten auf den Proteingelen. Zur Quantifizierung wurden jeweils die

Proteinkonzentrationen der ausgeprägtesten Banden in der 200 mM Imidazol Elutionsfraktion verwendet (Abb. 5-8).

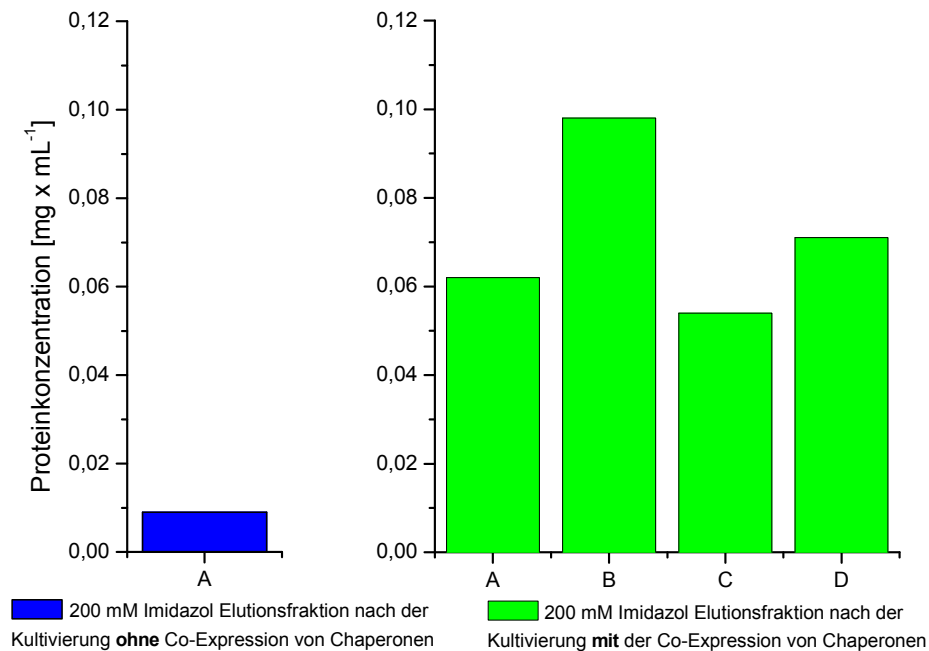


Abb. 5-8: Vergleich der erhaltenen Proteinkonzentrationen von PedI3 und PedI3-Linkerfusionsprodukten mit und ohne einer Co-Expression von Chaperonen.

Expression mit und ohne der Co-Expression der Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE. Dargestellt sind A = PedI3, B = PedF-Linker/PedI3, C = EryA-Linker₁/PedI3 und D = EryA-Linker₂/PedI3. Expression: 200 mL LB-Medium. 16 °C; 12 h; 0,5 mM IPTG; 0,4 mg x mL⁻¹ Arabinose.

Es zeigte sich, dass die Proteinkonzentration an löslichem PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten in den Elutionsfraktionen durch den Einsatz des Plasmids pKJE7 bzw. dessen kodierten Chaperonproteinen um das 6 bis 11 fache erhöht werden kann. Da in den übrigen Elutionsfraktionen unter Co-Expression von Chaperonen ebenfalls Zielprotein vorhanden war und dies bei der Kultivierung ohne Chaperonen nicht der Fall ist, liegen die realen Gesamtsteigerungswerte an aufgereinigtem, löslichem Protein sicherlich höher. Die Betrachtung der erhaltenen Steigerungsraten erfolgte auf Seiten der Expressionen ohne Chaperone bisher nur bei PedI3. Um auch die Konzentrationen der PedI3-Linkerfusionsprodukte ohne und mit der Co-Expression der Chaperone zu vergleichen, wurden alle Kultivierungen nochmals durchgeführt und qualitativ mittels SDS-PAGE verglichen (Abb. 5-9). Hierzu wurden die 150 mM und 200 mM Imidazol Elutionsfraktionen aufgetragen. Das Proteingel wurde mit größeren Probetaschen gegossen, um mehr Probe auftragen zu können und den Effekt deutlicher erkennen zu können (Abb. 5-9).

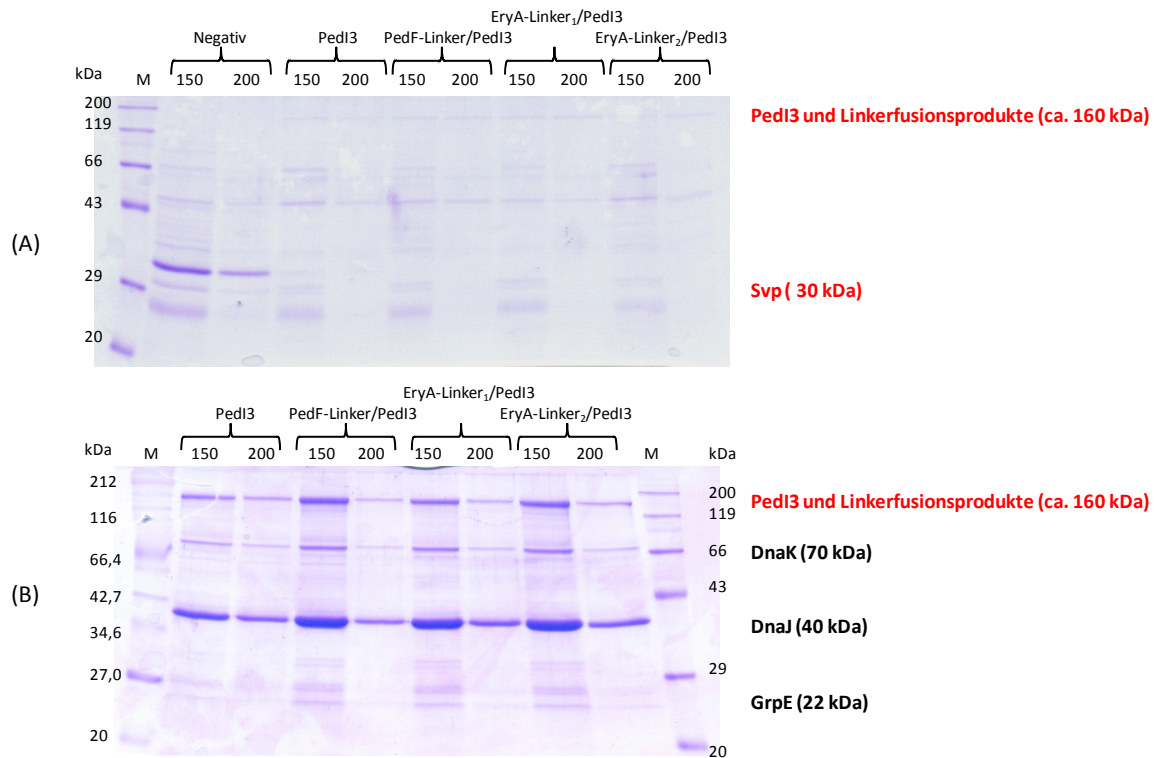


Abb. 5-9: Qualitativer Vergleich der Proteinkonzentrationen in den 150 mM und 200 mM Imidazol Elutionsfraktionen von PedI3 und den PedI3-Linkerfusionen.

(A) Expression ohne Co-Expression der Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE. **(B)** Expression mit der Co-Expression der Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE; SDS-PAGE (Trenngel): 12 %. Expression: 400 mL LB-Medium, 16 °C, 12 h, 0,5 mM IPTG, 0,4 mg x mL⁻¹ Arabinose.

Die Proteingele zeigen eine deutliche Steigerung der Konzentrationen von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten in den Elutionsfraktionen. Auffällig ist, dass die höchsten Proteinkonzentrationen in den 150 mM Imidazol Elutionsfraktionen vorhanden waren. Bei den Versuchen aus Abb. 5-7 zeigten sich die höchsten Proteinkonzentrationen in der 200 mM Imidazol Elutionsfraktion. Zu begründen ist dieser Effekt durch eine modifizierte Elutionsstrategie. In den Versuchen in Abb. 5-9 wurden drei Elutionsschritte mit 75 mM Imidazol Elutionspuffer durchgeführt während diese zusätzlichen Schritte vorher nicht durchgeführt wurden. Dies sollte dazu dienen, geringere Konzentrationen von Chaperonen in den 150 bis 250 mM Elutionsfraktionen zu erreichen und das Zielprotein sauberer zu erhalten. Dieser Effekt konnte jedoch nicht erreicht werden. Genauere Betrachtungen zur Reinheit des Zielproteins unter Co-Expression der Chaperone sind in Abschnitt 5.1.8 erläutert.

Insgesamt lag nach der sehr zeitaufwendigen und vielfältigen Optimierung eine geeignete Expressions- und Aufreinigungsmethode für die Proteine PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten vor. Zur weiteren Optimierung wurden die Medien TB und HSG verwendet und nochmals die Verwendung von Detergentien in den Lysepuffern und Elutionspuffern getestet (Daten nicht dargestellt). Da die Ergebnisse kaum Unterschiede zu den gezeigten Ergebnissen lieferten, wurde

keine weitere Optimierung durchgeführt. Bisher wurde ausschließlich über die Expression der *holo*-Enzyme berichtet. Die Expression der *apo*-Enzyme über die Plasmide pHN33 bis pHN36 in *E. coli* BL21 DE3 unter Co-Expression der pKJE7-kodierten Chaperone funktionierte identisch. Es wurden ähnliche Konzentrationen erreicht. Unter Abschnitt 5.1.2 werden die Module in *apo*- und *holo*-Form in Radioaktivitätsassays zur Überprüfung von Substratbeladungsreaktionen eingesetzt. Daher wurde auf weitere Abbildungen an dieser Stelle verzichtet.

5.1.1.7 Expression von PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁

Zur Untersuchung der Phosphopantetheinylierung einzelner ACPs des Psymberin-Clusters wurden PsyA-ACP₃ und die PsyD-ACP₁ exprimiert. Hierzu standen die unter 5.1.1.3 klonierten Expressionsplasmide zur Verfügung. Eine Übersicht bezüglich der vorhandenen Aufreinigungs-Tags sowie der Regulation der Expression ist in Tab. 5-1 wiedergegeben.

Die Expression der ACPs des Psymberin-Clusters wurde in *E. coli* BL21 DE3 durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass eine Expression und Aufreinigung in den Stämmen *E. coli* BL21 DE3 unter Verwendung der Plasmide pHN60, pHN66, pHN77 und pHN78 erfolgreich war (Abb. 5-10). In pHN60 und pHN66 wurde das jeweilige *apo*-ACP exprimiert, während in pHN77 und pHN78 aufgrund der Co-Expression von Svp das jeweilige *holo*-ACP exprimiert wurde. Die Aufreinigung erfolgte über einen Octahistidyl-Tag. Die Kultivierungen wurden in einem Kulturvolumen von 200 mL in LB-Medium durchgeführt. Abb. 5-10 zeigt die Expression der *apo*-ACPs PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁. Die Expression der entsprechenden *holo*-ACPs war unter den gleichen Bedingungen erfolgreich.

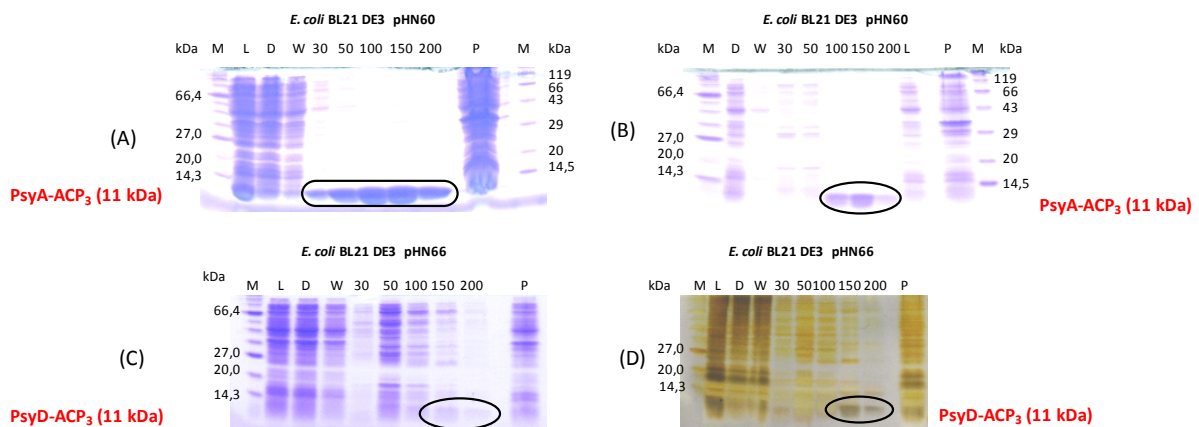


Abb. 5-10: Proteingele der Expressionen von *E. coli* BL21 DE3 pHN60 und pHN66.

(A) Expression: 16 °C; 14 h; 0,75 mM IPTG; Färbung: Coomassie; (B) Expression: 37 °C; 4 h; 0,75 mM IPTG; Färbung: Coomassie; (C) Expression: 16 °C; 14 h; 0,75 mM IPTG; Färbung: Coomassie; (D) Expression: 16 °C; 14 h; 0,75 mM; IPTG; Färbung: Silberfärbung. SDS-PAGE (Trenngel): 20 %.

M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, 30 = 30 mM Imidazol Elutionsfraktion, 50 = 50 mM Imidazol Elutionsfraktion, 100 = 100mM Elutionsfraktion, 150 = 150 mM Imidazol Elutionsfraktion, 200 = 200 mM Imidazol Elutionsfraktion, P = Pellet.

Die SDS-PAGE der aufgereinigten ACPs zeigen eine sehr gute Expression von PsyA-ACP₃. Die Expression kann sowohl bei 16 °C (Abb. 5-10, A) als auch bei 37 °C (Abb. 5-10, B) durchgeführt werden. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die sauberste Elutionsfraktion verwendet. Dabei konnten Proteinkonzentrationen zwischen 0,7 mg x mL⁻¹ und 1,3 mg x mL⁻¹ erreicht werden.

PsyD-ACP₁ wurde in wesentlich geringeren Konzentrationen erhalten. Die Expression war ausschließlich bei einer Temperatur von 16 °C (Abb. 5-10, C und D) erfolgreich. Auf dem Coomassie gefärbtem Gel ist das Protein kaum zu erkennen (Abb. 5-10, C). Durch die sensitivere Silberfärbung konnte es jedoch deutlich sichtbar gemacht werden (Abb. 5-10, D). Die Proteinkonzentrationsbestimmung der saubersten Elutionsfraktion lieferte Messwerte zwischen 0,04 mg x mL⁻¹ und 0,14 mg x mL⁻¹.

Die Expressionen von PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ als N-terminale und C-terminale Strep-Tag II Proteine über die Plasmide pHN62, pHN64, pHN68 und pHN70 wurden ebenfalls in *E.coli* BL21 DE3 getestet. Die Expressionsbedingungen wurden identisch zu den dargestellten Expressionen aus Abb. 5-10 gewählt. Die Proteingele zeigten keine Bande für das entsprechende Protein (Daten nicht dargestellt). Dies bedeutet, dass die Expression entweder nicht erfolgreich war oder das exprimierte Protein in nicht detektierbaren Konzentrationen vorlag. Da die ACPs kleine Proteine (ca. 10 KDa) sind, müssen die Proteine in relativ hohen Konzentrationen vorliegen, um eine detektierbare Bande auf den Proteingelen zu erzielen. Dies zeigte auch ein Vergleich zwischen den erreichten Proteinkonzentrationen für PsyD-ACP₁ mit den Gelbanden der Proteingele deutlich. Eine Bande konnte nur durch die Verwendung der Silberfärbung detektiert werden. Zusätzlich sind hier die verwendeten Promotoren von Bedeutung. Bei den erfolgreichen ACP-Expressionen aus Abb. 5-10 wurde zur Regulation der starke T7-Promotor verwendet. Die Expression wird bei pHN62, pHN64, pHN68 und pHN70 über das Tet-Operon reguliert, das eine wesentlich geringere Induktionsstärke besitzt. Daher kann angenommen werden, dass die Strep-getaggten ACPs zwar exprimiert werden, aber nicht in ausreichenden Konzentrationen für eine Detektion auf Proteingelen vorliegen. Unterstützend zu dieser Aussage können die Expressionen der PsyD-OMt unter Abschnitt 5.1.6.2 oder die Expression von PsyK unter 5.1.5.2 hinzugezogen werden. Diese zeigen eine unterschiedliche Expression des Proteins über den T7-Promotor und das Tet-Operon und unterstreicht die verschiedenen Expressionsintensitäten aufgrund des schwächeren Promotors. Eine weitere Untersuchung und Optimierung dieser Expressionsysteme wurde nicht vorgenommen, da die Proteine für weitere Experimente als His-Tag Proteine vorlagen.

5.1.1.8 Analytik der posttranslationalen Modifikation

Zur Analytik eignen sich massenspektroskopische Methoden. Eine erfolgte Phosphopantetheinylierung ist durch einen Massenunterschied von 339 Da gekennzeichnet. Dabei sind in der Literatur bereits zahlreiche methodische Ansätze bekannt, bei denen *holo*-ACPs und *apo*-ACPs sowie mit Biosynthese-Intermediaten beladene ACPs charakterisiert werden konnten.¹⁶⁰ Die bevorzugte Methode ist ESI-FT-MS aufgrund der hohen Auflösung und Genauigkeit der Massen. Bei großen Proteinen, wie es bei PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten der Fall ist, kann diese Messung nicht direkt erfolgen. Die Proteine müssen zuvor partiell enzymatisch verdaut, mittels HPLC getrennt und dann durch ESI-FT-MS analysiert werden. Allerdings gestaltet sich die Auswertung als sehr komplex und schwierig. Durch den proteolytischen Verdau und einige andere Nebeneffekte können zahlreiche Modifikationen an den Proteinen auftreten. Diese machen es in vielen Fällen schwierig, die relevanten Proteinfragmente zu selektieren, sodass in vielen Fällen Computersoftware für die Zuordnung der Massedaten zu den Proteinsequenzen notwendig ist. Falls in den zu vermessenden Proben Fremdprotein vorhanden ist, nimmt die Komplexität nochmals deutlich zu, da die Proteinfragmente des Zielproteins zusätzlich von den Fragmenten der Fremdproteine selektiert werden müssen. Kleine Proteine können jedoch direkt vermessen werden. Diese Methode konnte von Katrin Zimmermann bereits an PedN und dem Doppel-ACP von PedI3 erfolgreich angewendet werden.⁹¹ Eine Alternative zur Detektion von Proteinen bietet die Ionisation per MALDI, die gewöhnlicherweise mit der „time of flight“-Detektion kombiniert wird. Für kleine Proteine war die Detektion von Phosphopantetheinylierungen bereits möglich.^{161,162} Allerdings finden sich in der Literatur keine Daten zum Nachweis von phosphopantetheinylierten ACPs oder Polyketid-Intermediat beladenen ACPs mittels MALDI-TOF-MS Messungen von proteolytisch verdauten Proben. Der Grund liegt vermutlich in der Schwierigkeit, präzise Masse-Daten von größeren Proteinfragmenten mit dieser Methode zu erhalten.¹⁶⁰

Auch indirekt kann eine erfolgte Phosphopantetheinylierung über eine Übertragung radioaktiv markierter Substrate nachgewiesen werden, da dies nur auf ACPs in ihrer aktivierten *holo*-Form des ACP erfolgt. Der indirekte Nachweis über die Substratbeladung wird in Abschnitt 5.1.2 betrachtet.

Für das Modul PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukte ist aufgrund der Literaturdaten die Messung mittels ESI-FT-MS eine geeignete Methode zur Untersuchung der erfolgten Phosphopantetheinylierung.¹⁶⁰ Allerdings musste diese Methode aufgrund der Reinheit der erhaltenen Elutionsfraktionen ausgeschlossen werden, da die Elutionsfraktionen große Mengen an Chaperon-Protein enthalten. Eine weitere Aufreinigung des Moduls PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten konnte nicht erzielt werden (Abschnitt 5.1.8). Würde diese Probe, mit teils höheren Konzentrationen an Fremdprotein als Zielprotein, proteolytisch verdaut, mit HPLC

fraktioniert und mittels ESI-FT-MS vermessen werden, so entstünden Masse-Daten, dessen Komplexität zu keiner Zuordnung von Masse zu Zielproteinfragment führen kann. Daher wurde versucht, die Phosphopantetheinylierung über einen tryptischen, in-Gel Verdau von PedI3 (6.6.12.1.1) mit anschließender MALDI-TOF-TOF-MS Messung (6.6.12.2) nachzuweisen. Diese Methode hat den Vorteil, dass ein Auftreten andere Proteine, aufgrund des Ausschneidens von PedI3 aus einem Proteingel, ausgeschlossen werden kann. Vor der Messung war nicht klar, ob die erhaltenen Masse-Daten genau genug waren um eine Zuordnung der Massen zum Proteinfragment vorzunehmen, da MALDI-TOF-MS Messungen von Proteinen aufgrund geringerem Auflösungsvermögen gegenüber ESI-FT-MS Messungen haben. Außerdem war nicht bekannt, ob die Phosphopantetheinylierung chemisch Beständigkeit gegenüber der Aufarbeitungsprozedur hat. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass das aus dem proteolytischen Verdau erhaltene Fragment mit der Phosphopantetheinylierung nicht detektiert wird, da bei dieser Methode durch eine Ionenunterdrückung nicht alle tryptischen Peptide im Massenspektrum vorhanden sind. Zusätzlich kann das Enzym an der falschen Stelle schneiden und Schnittstellen auslassen und es entstehen durch Selbstverdau Verunreinigungen.¹⁶³

Zur Analyse der Phosphopantetheinylierung wurden die Module und dessen Linkerfusionsproteine unter der Co-Expression der PPTase Svp sowie den Chaperonen aus pKJE7 in *E. coli* BL21 DE3 exprimiert. Die folgenden Proteingele zeigen entsprechende Proteinbanden (Abb. 5-11).

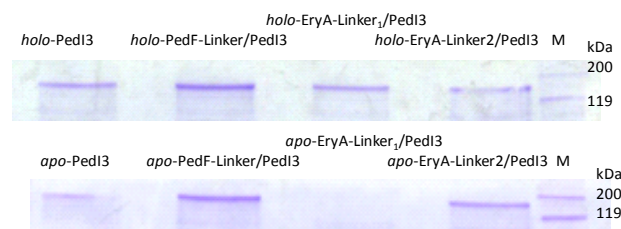


Abb. 5-11: Proteinbanden der verschiedenen PedI3-Proteine, die im Weiteren auf eine Phosphopantetheinylierung mittels tryptischem Verdau und folgender MALDI-TOF-TOF-MS untersucht wurden.

Diese Proteinbanden wurden entsprechend 6.6.12.1.1 tryptisch verdaut und mittels MALDI-TOF-TOF-MS vermessen (Abb. 5-12). Die Expression des Proteins *apo-EryA-Linker₁/PedI3* war in diesem Einzelfall nicht erfolgreich. Zum Nachweis der Phosphopantetheinylierung durch die Svp ist die Analytik der exprimierten Proteine jedoch ausreichend, da ein Vergleich der Messungen der erfolgreich exprimierten Proteine zwischen *holo*- und *apo*-Form erfolgen kann. Die Messung erfolgte bei 3 unterschiedlichen Laserintensitäten zur Ionisation, sodass sowohl kleine als auch große Proteinfragmente gemessen werden konnten (Massenspektren im Anhang unter 9.2.1). Die Zuordnung der Massen zu den einzelnen Proteinfragmenten konnte über die Software PAWS vorgenommen werden. Beispielfhaft werden hier die Ergebnisse für *holo-PedI3* und *apo-PedI3* gezeigt.

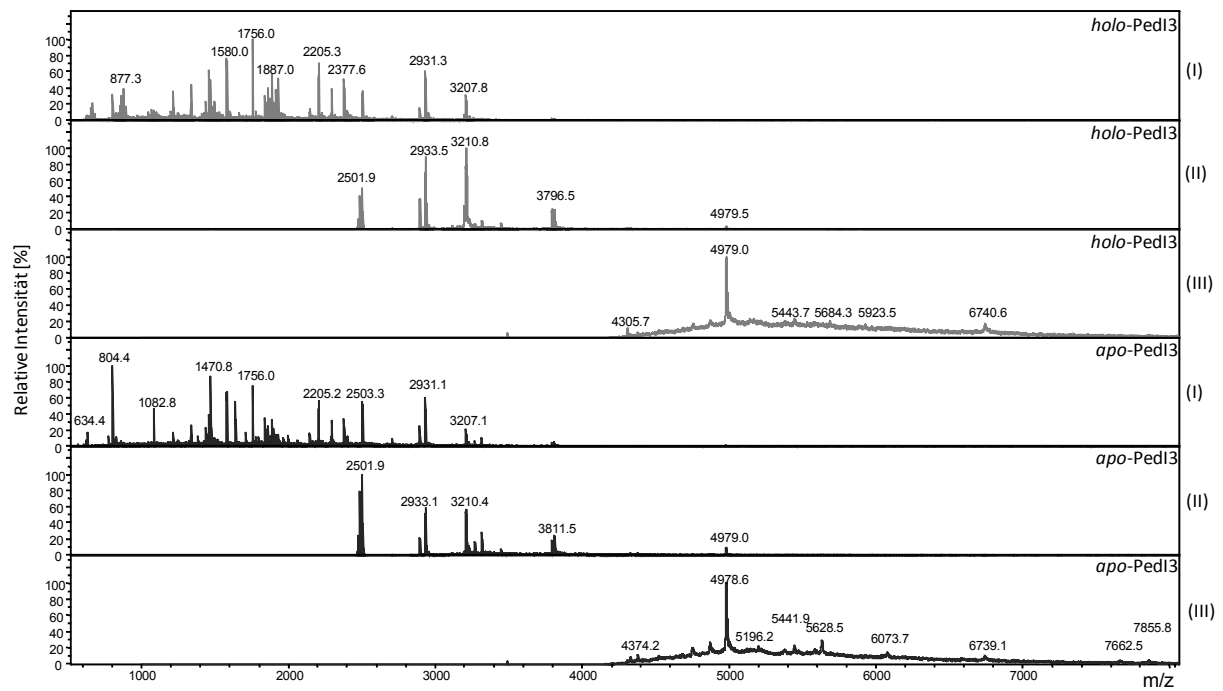


Abb. 5-12: Massenspektren der MALDI-TOF-TOF-MS Messungen von *holo-Ped13* und *apo-Ped13* bei verschiedenen Laserintensitäten (I - III). Matrix: HCCA.

Aus den Messungen konnten die Massen extrahiert werden und über das Programm PAWS zu der entsprechenden Proteinsequenz zugeordnet werden (Abb. 5-13). Das Ergebnis zeigte, dass über das gesamte Protein Massen der tryptisch erhaltenen Proteinfragmente detektiert werden können (Abb. 5-13). Allerdings fehlen auch einige Fragmente. Da Ped13 ein Doppel-ACP enthält, sind zwei konservierte Motive vorhanden, die phosphoantethinyliert werden können. Nach der Zuordnung der Fragmente konnte allerdings nur das erste Fragment detektiert werden. Zum zweiten konservierten Motiv konnte keine Masse zugeordnet werden.

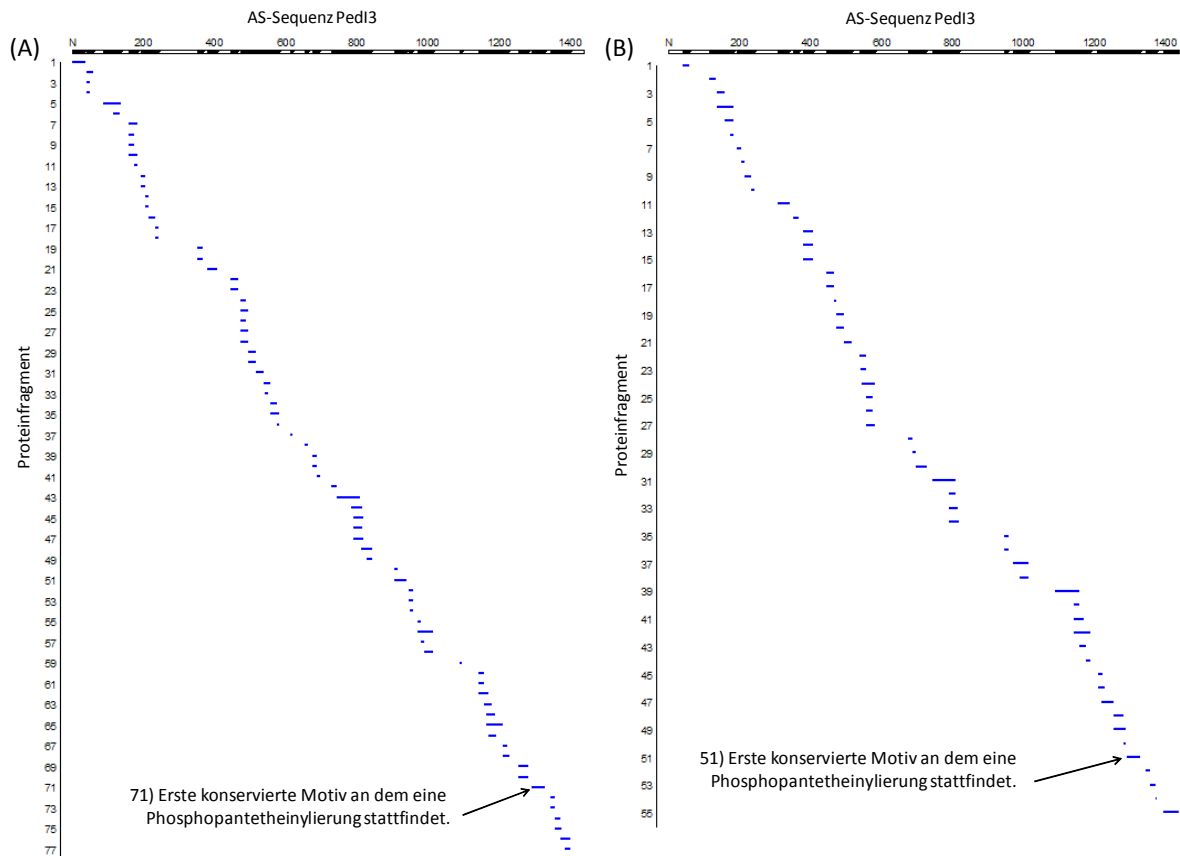


Abb. 5-13: Zuordnung der Massen zu den Proteinfragmenten von Ped13.

(A) Zugeordnete Proteinfragmentmassen der Messung des *holo*-Ped13. (B) Zugeordnete Proteinfragmentmassen der Messung des *apo*-Ped13.

Die beschriebene Vorgehensweise wurde für die jeweiligen *holo*- und *apo*-Module durchgeführt. Bei einem Vergleich der Zuordnung der *apo*- mit der *holo*-Form zeigte sich, dass bei keinem der gemessenen Fragmente der *holo*-Module ein Massenunterschied von 339 Da im Gegensatz zu den Fragmenten des *apo*-ACP zu verzeichnen war. Zusätzlich zu dem detektierten Proteinfragment, an dem eine Phosphopantetheinylierung stattfindet sollte, wurden die übrigen Massen des *holo*- bzw. *apo*-Moduls auf einen Massenunterschied von 339 Da verglichen. Es wäre möglich gewesen, dass das PAWS-Programm einige Massen nicht richtig zugeordnet hat und daher der Nachweis fehlgeschlagen ist. Auch dies führte zu keiner Detektion der posttranslationalen Modifikation. Dieses Ergebnis scheint ungewöhnlich, da durch Katrin Zimmermann bereits eine Phosphopantetheinylierung durch die Svp an dem Doppel-ACP von Ped13 nachgewiesen wurde.⁹¹ Daher wurde vermutet, dass die Phosphopantetheinylierung auch bei dem ganzen Modul stattfindet. Wie schon erwähnt erfolgte die Analytik der erfolgten Phosphopantetheinylierung durch ESI-FT-ICR-MS und nicht über die hier beschriebene Methode. Daher könnte der nicht erfolgreiche Nachweis der posttranslationalen Modifikation an der unterschiedlichen Aufarbeitung der Proben liegen.

Trotzdem sind die erhaltenen Massedaten nicht redundant. Schließlich liefern sie einen hervorragenden „fingerprint“ des exprimierten Moduls Ped13 und dessen Linkerfusionsprodukten.

Aus den Massedaten konnten 50 bis 70 % Übereinstimmung zwischen Messung und Proteinsequenz abgeleitet werden. Daher konnte mit dieser Methode nachgewiesen werden, dass die Sequenzen korrekt kloniert wurden und die Identität der Proteine korrekt ist.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der massenspektroskopische Nachweis der erfolgten Phosphopantetheinylierung nicht erfolgreich war. Jedoch verblieb für das Modul PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten noch der indirekte Nachweis zur Überprüfung der vorhandenen Phosphopantetheinylierung. Diese Experimente werden unter Abschnitt 5.1.2 erläutert.

Weiterhin sollte die Phosphopantetheinylierung an den einzelnen ACPs des Psymberin überprüft werden. Hierzu standen PsyA-ACP₃ sowie PsyD-ACP₁ aus 5.1.1.7 zur Verfügung. Die Analytik ist aufgrund der Größe der Proteine leichter, da einzelne ACPs direkt vermessen werden können und keinem partiellen Verdau unterzogen werden müssen.

Zur Analytik wurde die sauberste Elutionsfraktion der Proteine PsyA-ACP₃ sowie PsyD-ACP₁ über Vivaspin-Zentrifugalröhrchen aufkonzentriert. Dabei wurde das Volumen der Elutionsfraktion von ca. 1 mL auf etwa 100 µL verringert, sodass eine etwa 10 fache Konzentrierung der Probe erreicht wurde. Die MWCO (molecular weight cut off) der Membran des Vivaspin-Zentrifugalröhrchens betrug dabei 5000. Bestandteile mit einem Molekulargewicht von ≥ 5 kDa werden von der Membran zurückgehalten und aufkonzentriert wogegen Substanzen kleineren Molekulargewichts die Membran passieren. Die Analytik von PsyA-ACP₃ wurde mittels MALDI-TOF-TOF-MS durchgeführt (Abb. 5-14).

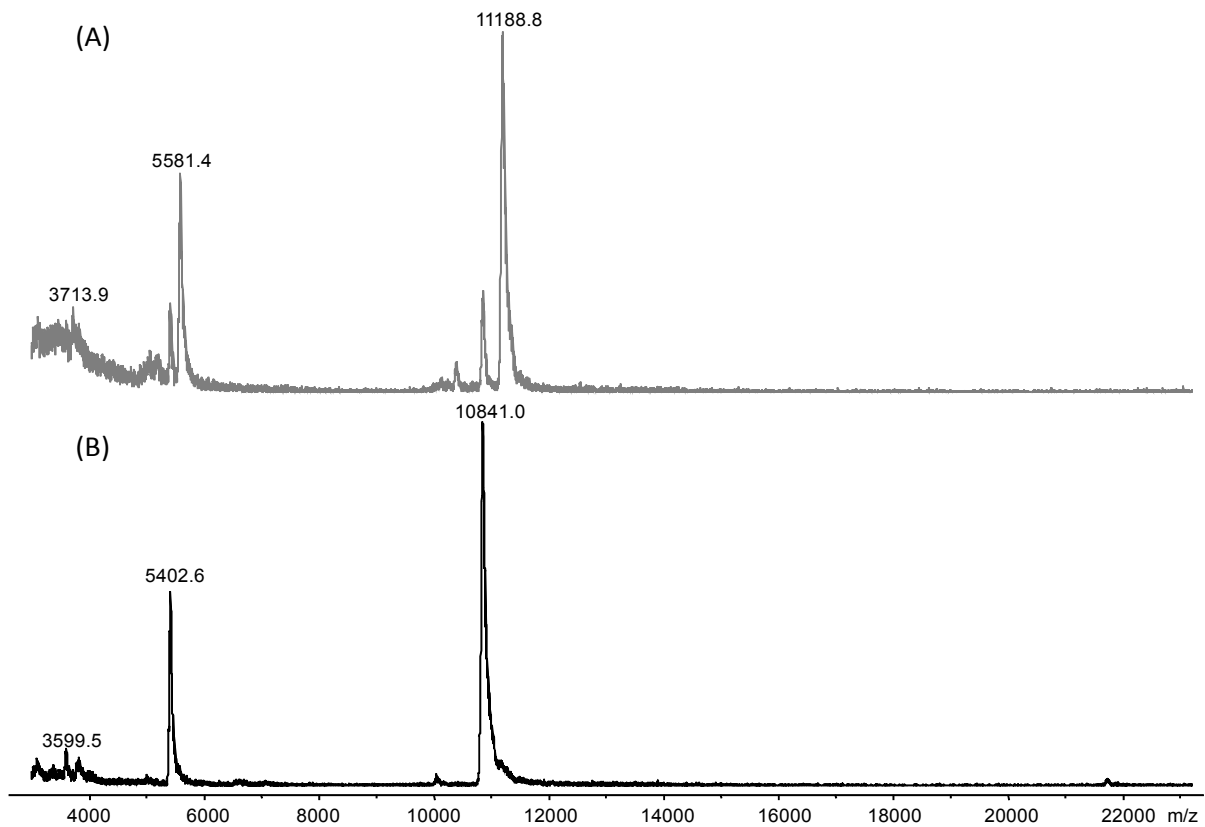


Abb. 5-14: MALDI-TOF-TOF-MS Spektren von PsyA-ACP₃.

(A) PsyA-ACP₃ exprimiert über pHIS8-*svp* (*E. coli* BL21 DE3 pHN77), (B) PsyA-ACP₃ exprimiert über pHIS8 (*E. coli* BL21 DE3 pHN60).

Die Massenspektren zeigen, dass PsyA-ACP₃ durch die Co-Expression der Svp von der inaktiven *apo*-Form in die aktive *holo*-Form umgewandelt wurde. Dies zeigt sich durch den Massenshift von 347,8 Da des PsyA-ACP₃, exprimiert über den Vektor pHIS8-*svp* (Abb. 5-14, A), gegenüber PsyA-ACP₃, exprimiert über den Vektor pHIS8 (Abb. 5-14, B). Der Vergleich mit dem theoretischen Massenshift von 339 Da zeigt eine Abweichung von ca. 8 Da und ist aufgrund des geringen Auflösungsvermögens der Messung mittels MALDI-TOF-TOF-MS in diesen Massenbereichen vorhanden. Da allerdings in Abb. 5-14, A neben der *apo*-Form ebenfalls die *holo*-Form vorhanden ist und bei der gleichen Masse auftritt wie in Abb. 5-14, B besteht kein Zweifel über die erfolgreiche Phosphopantetheinylierung.

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch eine LC-MS-Messung des PsyA-ACP₃, exprimiert über den Vektor pHIS8-*svp*. Es konnte ebenfalls das *holo*-ACP PsyA-ACP₃ und *apo*-ACP PsyA-ACP₃ in verschiedenen Ladungszuständen detektiert werden (Abb. 5-15). Die PsyA-ACP₃ relevanten Massen (Abb. 5-15, B) wurden über die Summe der Massen erhalten, die während des UV-Peaks (ca. 45 min bis 50 min) aus Abb. 5-15, A detektiert wurden.

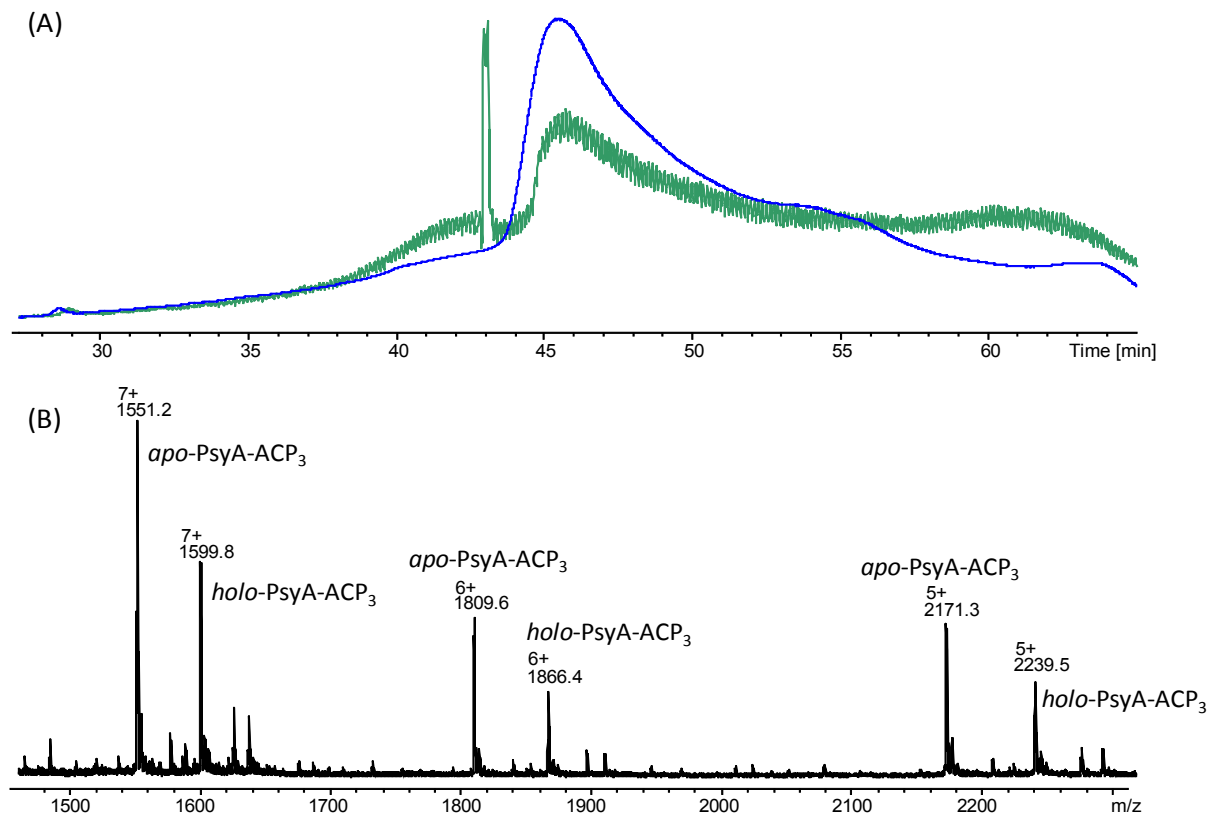


Abb. 5-15: LC-MS von PsyA-ACP₃ exprimiert über den Vektor pHIS8-*svp* (*E. coli* BL21 DE3 pHN77).

(A) Chromatogramm der LC. Blau: UV-Signal; Grün: Masse-Signal. (B) *holo*-PsyA-ACP₃ und *apo*-PsyA-ACP₃ in den Ladungszuständen +7, +6 und +5.

Die Massen des Spektrums zeigen die Detektion von PsyA-ACP₃ 7 fach, 6 fach und 5 fach geladen in der *apo*- und *holo*-Form. Nach einer Dekonvolution ergeben sich Massenshifts von 340,2 für das 7 fach geladene Isotop, 340,8 für das 6 fach geladene Isotop und 341,0 für das 5 fach geladene Isotop. Die Auflösung dieser LC-MS-Methode ist höher, und die exakteren Massen bestätigen die funktionelle Phosphopantetheinylierung von PsyA-ACP₃. Mit PsyD-ACP₁ wurden identische MALDI-TOF-TOF-MS Messungen und LC-MS Messungen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass aufgrund der wesentlich geringeren Expressionsraten (vgl. 5.1.1.7) keine Detektion erfolgen konnte. Auch die Ankonzentrierung mittels Vivaspin führte nicht zu der erfolgreichen Detektion der *apo*- bzw. *holo*-Form der ACPs. Der Nachweis der Phosphopantetheinylierung erfolgte daher, wie bei PedI3, indirekt über eine erfolgreiche Substratübertragung unter 5.1.2.2.

Weitere Messungen der *apo*- und *holo*-Formen von PsyA-ACP₃ sowie PsyD-ACP₁ finden momentan am Medical Center der Leiden Universität in Form von FT-ICR-MS Messungen statt. Diese Ergebnisse sollten hoch aufgelöste Massenspektren liefern.

Letztendlich konnte durch MALDI-TOF-TOF-MS und LC-MS die Phosphopantetheinylierung von PsyA-ACP₃ durch die co-exprimierte *Svp* nachgewiesen werden. Der massenspektroskopische

Nachweis an PedI3, dessen Linkerfusionsprodukten und PsyD-ACP₁ waren nicht erfolgreich, jedoch erfolgt der Nachweis der Phosphopantetheinylierung indirekte über die erfolgreiche Substratübertragung unter 5.1.2.2. Daher konnte gezeigt werden, dass die PPTase Svp die ACPs der Pederin- und Psymberin-PKS phosphopantetheinyliert. Dieser Nachweis ist wichtig für biosynthetische *in vitro*-Studien, da in Enzymassays die aktiven *holo*-ACPs eingesetzt werden müssen. Genauso wichtig ist dieses Ergebnis für die Expression des Psymberin- und Pederin-Gencluster in heterologen Stämmen, da nun bekannt ist welche PPTase eingesetzt werden könnte, wenn der heterologe Organismus diese posttranslationale Modifikation nicht durch eigene Enzyme bewerkstelligen kann.

5.1.2 Substratbeladung und Substratspezifität durch *trans*-AT von ACPs

Im Gencluster des Pederins **20** existieren zwei AT-Gene, *pedC* und *pedD*. Diese Enzyme agieren bei der Polyketidbiosynthese, indem sie die jeweiligen Substrate auswählen und die Übertragung auf die einzelnen ACPs katalysieren. Bei der Pederin **20**- und Psymberin **21**-Biosynthese führen separate AT-Domänen diese Reaktionen aus, wobei sie nicht wie in herkömmlichen *cis*-AT-PKS-Systemen in das jeweilige Modul integriert sind, sondern in *trans* agieren. Auf das erste ACP des ersten Moduls sollte entsprechend der Abfolge der Biosynthese des Pederins **20** und Psymberins **21** Acetyl-CoA **5** übertragen werden, wogegen auf alle übrigen ACPs Malonyl-CoA **6** übertragen wird. Der Transfer von Acetyl-CoA **5** auf das erste ACP von PedI bzw. PsyA könnte von der GNAT-Domäne übernommen werden.^{61,80} Während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit konnte die Beteiligung der GNAT-Domäne an der Initiierung der Curacin A-Biosynthese durch die Arbeitsgruppe Sherman nachgewiesen werden.⁹⁷ Bei einem Vergleich unterschiedlicher *trans*-AT-PKS-Cluster ergeben sich weitere interessante Fragestellungen. Für die Biosynthese des Leinamycin **31** konnte gezeigt werden, dass eine AT ausreicht, um die Substratbeladungsreaktion der einzelnen ACPs durchzuführen.^{1,164} Dieses könnte auch beim Psymberin **21** der Fall sein, da bisher nur eine AT gefunden wurde. In anderen Clustern existieren mehrere ATs. Im Pederin-Cluster handelt es sich um zwei, beim Bacillaen-Cluster aus *Bacillus subtilis* sogar um drei.⁴⁶ Daraus ergab sich die Frage, ob alle ATs der jeweiligen Cluster aktiv sind, welche spezifischen Aufgaben die einzelnen ATs übernehmen oder inaktive ATs im Laufe der Evolution als Relikt im Cluster verblieben sind. Um die biosynthetische Funktion und die Substratspezifität der ATs der Pederin **20**-Biosynthese nachzuweisen, wurden diese exprimiert und in Enzymassays eingesetzt.

Gleichzeitig können aus den Ergebnissen Informationen über das jeweilige ACP abgeleitet werden. Durch die Verwendung von *holo*- und *apo*-ACP kann über die Assays indirekt nachgewiesen werden, ob die Phosphopantetheinylierung der jeweiligen PPTase erfolgreich war. Diese Möglichkeit besteht, da nur auf die aktive *holo*-Form der ACPs Substrate übertragen werden können. Ein wesentlich

spezifischerer Nachweis ist die massenspektroskopische Messung der *apo*- und *holo*-Form. An PsyA-ACP₃ konnte die Phosphopantetheinylierung bereits massenanalytisch bestätigt werden (5.1.1.8), während dies bei Modul PedI3 und PsyD-ACP₁ noch nicht gezeigt werden konnte. Die hier dargestellte Methode sollte daher zum Einen als Bestätigung der vorhandenen Ergebnisse und zum Anderen als Nachweis für die Phosphopantetheinylierung von Modul PedI3 und PsyD-ACP₁ genutzt werden.

Neben dem biochemischen Nachweis der Funktionalität der ATs und ACPs haben diese Reaktionen zusätzlich eine übergeordnete Aussagekraft bezüglich des Nachweises, dass der gefundene Biosynthese-Gencluster auch tatsächlich für die Produktion von Pederin **20** bzw. Psymberin **21** dient. Bei dem Pederin-Cluster konnte bereits durch Katrin Zimmermann der Nachweis der Funktionalität des Clusters über die Reaktionen der *O*-Methyltransferasen und der AT bzw. ACP-Domänen erbracht werden.⁹¹ Für den Psymberin-Cluster stellen diese Experimente jedoch die ersten funktionellen Untersuchungen dar. Eine positive Beladung der ACPs durch die entsprechenden ATs des Clusters wäre der erste funktionelle Nachweis der Psymberin **21**-Biosynthese. Allerdings ist der Nachweis relativ unspezifisch, da in diesen Experimenten die AT PedD vom Pederin-Cluster verwendet wird. Er gibt allerdings Auskunft über die Funktionalität der eingesetzten ACPs.

5.1.2.1 Expression der Enzyme

Die Expression der verwendeten ACPs PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁, bzw. des ACP enthaltenden Moduls PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten wurde bereits unter 5.1.1.6 und 5.1.1.7 beschrieben. Zur Durchführung der Assays mussten zusätzlich die ATs PedC und PedD exprimiert werden. PedD wurde bereits im Rahmen der Doktorarbeit von Katrin Zimmermann kloniert und exprimiert.⁹¹ Die Funktionalität konnte ebenfalls in den Arbeiten gezeigt werden. Es konnte festgestellt werden, dass PedD die Substratbeladung des Doppel-ACP von PedI3 und von PedN katalysiert. Die Substratspezifität wurde mit Malonyl- **6** und Acetyl-CoA **5** getestet, wobei von PedD nur Malonyl-CoA **6** als Substrat akzeptiert wurde. PedC konnte in den Arbeiten von Katrin Zimmermann als Fusion mit dem Maltosebindeprotein in löslicher Form exprimiert werden. Katalytische Aktivität oder die Akzeptanz der Substrate Malonyl-CoA **6** oder Acetyl-CoA **5** konnte weder bei dem fusionierten Protein noch nach der Abspaltung des Maltosebindeproteins festgestellt werden.

Diese Ergebnisse wurden in den folgenden Experimenten aufgegriffen. Bezüglich der bereits erfolgreich untersuchten AT PedD sollte einerseits geklärt werden, ob die Substratübertragung ebenso auf das Modul PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukte realisiert werden kann. Dies würde als wesentlich spezifischerer Nachweis gelten. Andererseits sollte die ACP-Abhängigkeit der Reaktion charakterisiert werden. Hierzu konnten PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ verwendet werden, da diese ACPs

aus der Psymberin **21**-Biosynthese stammen und daher von einem anderen *trans*-AT-Cluster stammen. Bezüglich der noch nicht funktionell untersuchten AT PedC wurden entsprechende Expressionsvektoren kloniert. Dies hatte das Ziel, das Protein mit kurzem Tag zu erhalten. In den Arbeiten von Katrin Zimmermann konnte die Klonierung in den Vektor pHIS8 erfolgreich durchgeführt werden, jedoch war keine Expression zu verzeichnen. Auch unlösliches Protein im Pellet konnte nicht detektiert werden. Bei der erfolgreichen Expression als Fusion mit dem Maltosebindeprotein könnte eine nicht korrekte Faltung und damit verbundene Inaktivität Gründe für die nicht erfolgreiche funktionelle Untersuchung gewesen sein.

Die Expression von PedD wurde analog zu den Versuchen von Katrin Zimmermann mit *E. coli* BL21 DE3 pKZ178-1 durchgeführt.⁹¹

Für die Klonierung von *pedC* wurden drei Vektoren verwendet (Abb. 5-16). Nach den Experimenten von Katrin Zimmermann wurde nochmals der Vektor pHIS8 genutzt. Diesmal wurde das Insert jedoch in die Schnittstelle *NcoI* kloniert. Dadurch konnten die Ergebnisse von Katrin Zimmermann nochmals überprüft werden. Als neue Expressionsvektoren dienten pASK-IBA3 und pASK-IBA5. Durch die Variationen im Aufreinigungs-Tag (Strep-Tag II, N-terminal und C-terminal) und der Regulation über das Tet-Operon wurde versucht, lösliches Protein zu erhalten. Zur Klonierung wurden spezifische Primer konstruiert (Tab. 6-11) und die PCR-Produkte mittels T/A-Klonierung (6.5.14) in den Vektor pBlueskript SK(+) gebracht. Die resultierenden Plasmide tragen die Bezeichnung pHN37, pHN39 und pHN41. Das Insertionsfragment wurde mit *BsaI* aus pHN37 und pHN39 sowie *NcoI* aus pHN41 ausgeschnitten und über eine Ligation (6.5.11) in die Expressionsvektoren transferiert. Die entstandenen Expressionsplasmide tragen die Bezeichnung pHN38, pHN40 und pHN42. Dabei ist pHN38 das Ligationsprodukt aus *pedC* und pASK-IBA3, pHN40 aus *pedC* und pASK-IBA5 und pHN42 aus *pedC* und pHIS8.

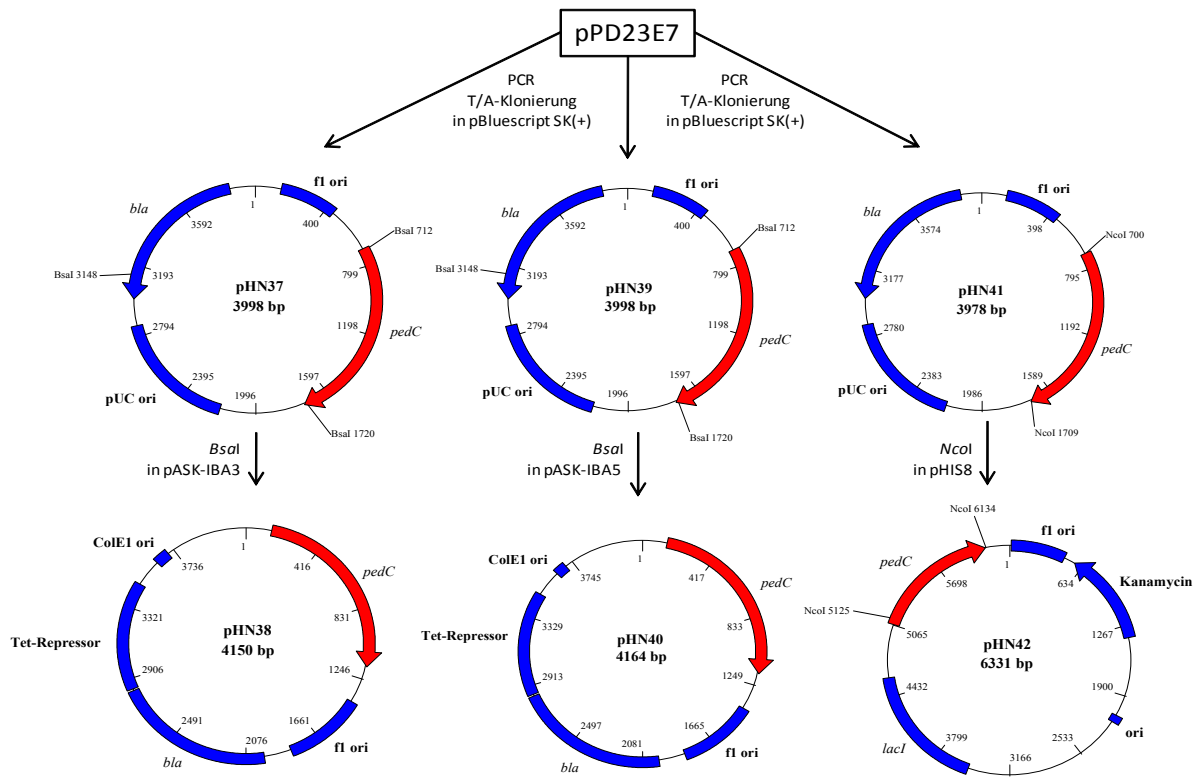


Abb. 5-16: Klonierung der PedC-Expressionsplasmide pHN38, pHN40 und pHN42. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPD23E7³⁸ mittels PCR amplifiziert.

Nach der erfolgten Klonierung wurden die Expressionsplasmide in *E. coli* BL21 DE3 auf eine vorhandene Expression getestet (Abb. 5-17).

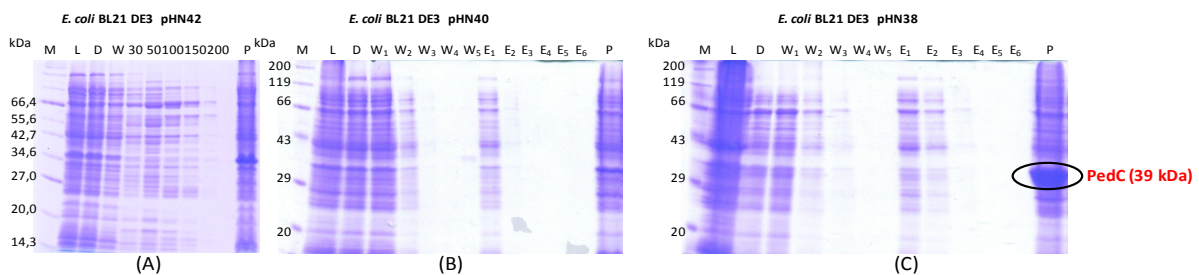


Abb. 5-17: Proteingel der Expressionen von PedC.

(A) *E. coli* BL21 DE3 pHN42, 16 °C, 16 h, Induktion: 0,5 mM IPTG (Endkonzentration), Aufreinigung: entsprechend Abschnitt 6.6.5. (B) und (C) *E. coli* BL21 DE3 pHN40 bzw. pHN38, 16 °C, 16 h, Induktion: 0,2 mg x mL⁻¹ Anhydrotetracyclin (Endkonzentration), Aufreinigung: entsprechend Abschnitt 6.6.6; SDS-PAGE (Trenngel): 12 %.

Legende: (A) M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, 30 = 30 mM Imidazol Elutionsfraktion, 50 = 50 mM Imidazol Elutionsfraktion, 100 = 100mM Elutionsfraktion, 150 = 150 mM Imidazol Elutionsfraktion, 200 = 200 mM Imidazol Elutionsfraktion, P = Pellet. (B) und (C) M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W₁ bis W₅ = Waschfraktionen 1 bis 5, E₁ bis E₆ = Elutionsfraktionen 1 bis 6, P = Pellet.

Auf den Gelen war deutlich zu erkennen, dass PedC bei keinem der getesteten Stämme als lösliches Protein in den Elutionsfraktionen erhalten wurde. Bei den N-terminal getagten Proteinen war kein unlösliches Protein im Pellet zu sehen. Jedoch konnte bei dem C-terminal getagten Protein (Abb.

5-17, C) eine deutliche Bande im Pellet detektiert werden. Daraus zeigte sich, dass wahrscheinlich ein N-terminaler Tag die Überexpression von PedC hindert. Dieses Ergebnis passt zu den bereits existierenden Resultaten von Katrin Zimmermann. Auch hier konnte über einen N-terminalen Octahistidyl-Tag und der Induktion über den T7-Promotor weder lösliche noch unlösliche Expression von PedC erreicht werden.⁹¹ Den Erhalt als unlösliches Protein im Pellet als C-terminal getagtes Strep-Tag II Fusionsprotein kann daher als Erfolg bewertet werden. Um PedC als lösliches Protein in den Elutionsfraktionen zu erhalten, wurde versucht über den Stamm *E. coli* Rosetta-gami 2 DE3 pLysS und die Expression unter Co-Expression von Chaperonen eine Verbesserung zu erzielen. Die Expression in *E. coli* Rosetta-gami 2 DE3 pLysS verlief dabei identisch zu den bisher erzielten Ergebnissen. PedC war unlöslich im Pellet vorhanden (Daten nicht dargestellt). Allerdings konnte PedC als lösliches Protein in den Elutionsfraktionen mit Hilfe der Co-Expression von Chaperonen aufgereinigt werden (Abb. 5-18).

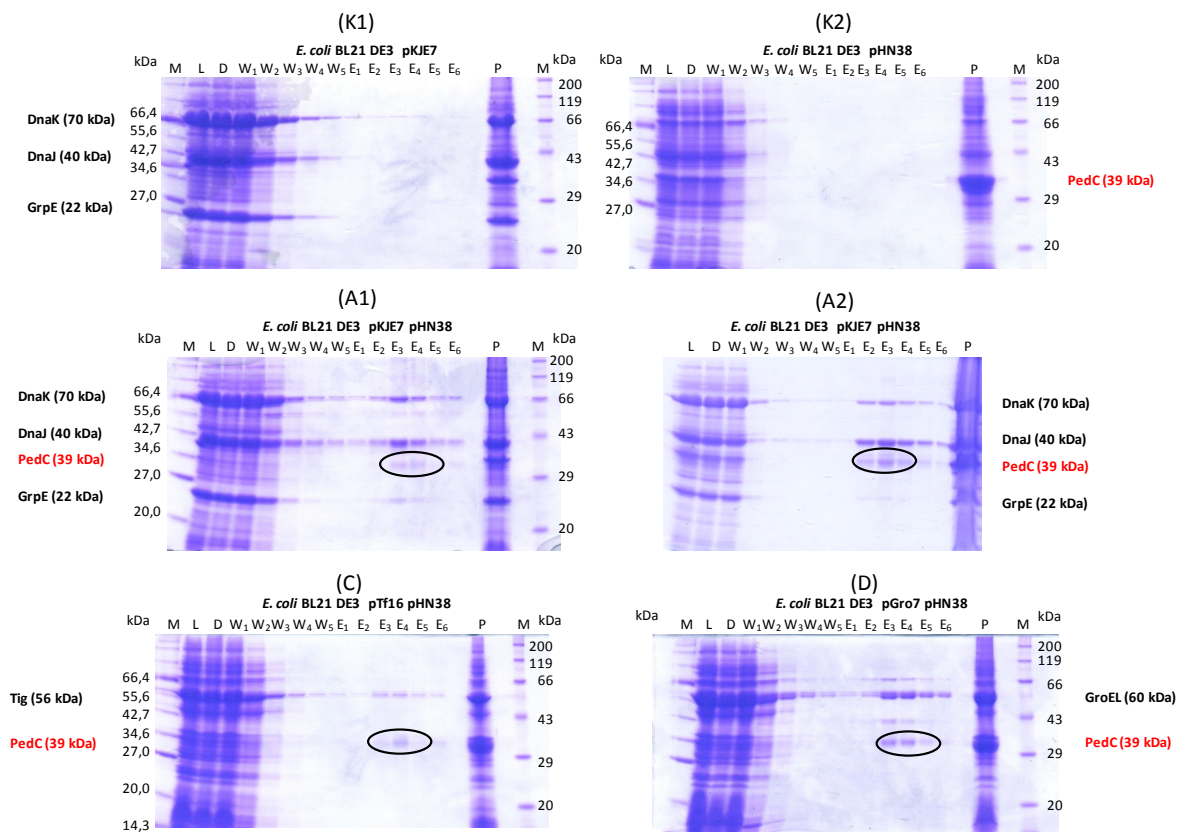


Abb. 5-18: Proteingel des exprimierten und aufgereinigten PedC.

(K1) Kontrollkultivierung *E. coli* BL21 DE3 pKJE7, (K2) Kontrollkultivierung *E. coli* BL21 DE3 pHN38, (A1 und A2) *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 pHN38, (C) *E. coli* BL21 DE3 pTf16 pHN38, (D) *E. coli* BL21 DE3 pGro7 pHN38. Kultivierungsbedingungen: 16 °C, 16 h, Induktion: 0,2 mg x mL⁻¹ Anhydrotetracyclin (Endkonzentration).

Aufreinigung: entsprechend Abschnitt 6.6.6. M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W₁ bis W₅ = Waschfraktionen 1 bis 5, E₁ bis E₆ = Elutionsfraktionen 1 bis 6, P = Pellet; SDS-PAGE (Trenngel): 12 %.

Die Gele zeigen eindeutig die AT PedC in den Elutionsfraktionen in löslicher Form. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Kultivierungen mit *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 und *E. coli* BL21 DE3 pHN38 (K1 und K2)

durchgeführt. Dadurch wurde ausgeschlossen, dass das Protein in den Elutionsfraktionen ein unspezifisch aufgereinigtes Protein sein kann. Daher konnte gezeigt werden, dass PedC durch eine Co-Expression von Chaperonen in löslicher Form aufgereinigt werden konnte. Dabei sind die Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE, exprimiert über das Plasmid pKJE7 (Abb. 5-18, A1 und A2), Tig, exprimiert über das Plasmid pTf16 (Abb. 5-18, C) sowie GroEL und GroES, exprimiert über das Plasmid pGro7 (Abb. 5-18, D) nützlich. Die Chaperone pG-KJE7 und pG-Tf2 wurden nicht getestet, da die Induktion von PedC bzw. Chaperone-Proteinen über Tetracyclin bzw. Anhydrotetracyclin erfolgt. Da die Induktion der Chaperon-Proteine direkt zu Beginn der Kultivierung erfolgte und die PedC-Expression bei einer OD_{600} von 0,5 induziert wurde, erschien diese Variante als nicht sinnvoll. Der Effekt der Verunreinigung durch Chaperon-Proteine, wie schon bei PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten beobachtet (Abschnitt 5.1.1.6), tritt auch hier wieder auf. Reinigungsversuche wurden hier nicht durchgeführt.

Durch die erfolgten Experimente konnten nun die AT PedC und PedD in Kombination mit den exprimierten ACPs aus 5.1.1.6 und 5.1.1.7 in Enzymassays eingesetzt werden.

5.1.2.2 Enzymassays mit ^{14}C -Malonyl-CoA und ^{14}C -Acetyl-CoA

Zur Analytik der Substratbeladung von ACPs durch ATs wurden Enzymassays mit radioaktiv markiertem Substrat durchgeführt. Es könnten ebenfalls Substratsbeladungsreaktionen durch einen Massenunterschied der Reaktionsprodukte in massenspektroskopischen Analysen erfolgen. Da allerdings in der Dissertation von Katrin Zimmermann bereits zahlreiche Versuche durchgeführt wurden, die nicht zur Detektion der erfolgten ACP-Substratbeladung geführt haben,⁹¹ wurde die Analytik mittels Enzymassay unter Verwendung radioaktiver Substrate vorgezogen. Die Reaktion wurde bereits in Abb. 3-4, A mit Acetyl-CoA und Malonyl-CoA als Substrat dargestellt.

Um zusätzlich zum bereits erfolgten Nachweis der spezifischen und von PedD katalysierten Malonylierung dem *holo*-ACP PedN und dem *holo*-Doppel-ACP von PedI3⁹¹ ein ganzes Modul auf die Malonylierung zu testen, wurde PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukte entsprechend Abschnitt 6.7.1 im Enzymassay eingesetzt (Abb. 5-19).

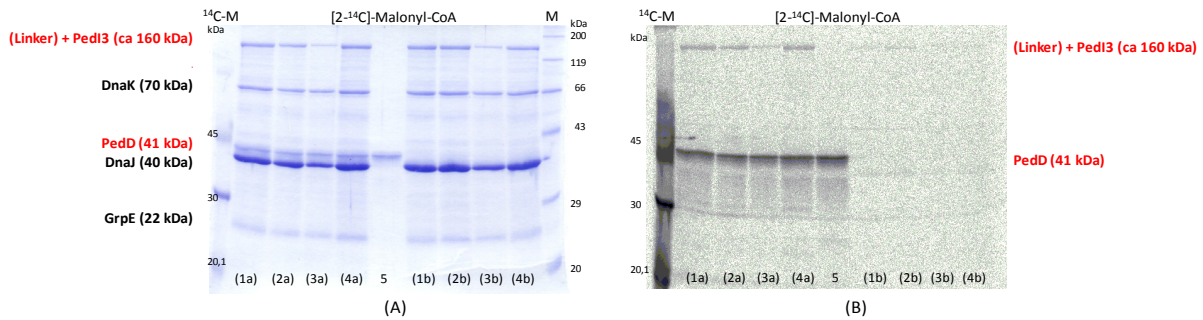


Abb. 5-19: Ergebnisse der ^{14}C -Malonyl-CoA 6 Substratbeladungsreaktionen durch PedD auf PedI3 und dessen Linkerfusionsproteine.

(A) SDS-PAGE, Coomassie gefärbt; (B) Autoradiogramm.

(1a) *holo*-PedI3 mit PedD, (2a) *holo*-PedF-Linker/PedI3 mit PedD, (3a) *holo*-EryA-Linker₁/PedI3 mit PedD, (4a) *holo*-EryA-Linker₂/PedI3 mit PedD, (5) PedD, (1b) *holo*-PedI3 ohne PedD, (2b) *holo*-PedF-Linker/PedI3 ohne PedD, (3b) *holo*-EryA-Linker₁/PedI3 ohne PedD, (4b) *holo*-EryA-Linker₂/PedI3 ohne PedD. M=Marker, ^{14}C -M = ^{14}C -markierter Proteinmarker Rainbow (CFA755).

Enzymassay entsprechend 6.7.1. Detektionszeit auf dem Film: 192 h. Expressionsbedingungen: PedI3 und Linkerfusionsprodukte analog zu 5.1.1.6., PedD analog zur Literatur⁹¹.

Der Substrattransfer durch ATs auf die ACPs erfolgt in einer Zwei-Schritt-Reaktion.¹⁶⁵ In einem ersten Schritt wird das Substrat kovalent an ein aktives Serin der AT gebunden. Es entsteht eine Malonyl-AT.^{53,164,165} Dieser Vorgang ist an dem getesteten PedD zu erkennen, da auf dem dargestellten Autoradiogramm auf der Höhe von PedD ein Signal zu verzeichnen ist (Abb. 5-19, 1a bis 4a). Dies ist auch der Fall, wenn im Reaktionsansatz kein ACP vorhanden ist (Abb. 5-19, 5). Von der aktivierten Malonyl-AT wird das Substrat in einer zweiten Reaktion auf das ACP übertragen. Diese Reaktion ist ebenfalls auf dem dargestellten Autoradiogramm zu sehen. PedI3 wird folglich durch die AT PedD beladen. Als Negativkontrolle wurde die Reaktion ohne der AT PedD durchgeführt (Abb. 5-19, 1b bis 4b). Die Übertragung erfolgt ohne die AT PedD nicht bzw. in einem wesentlich geringeren Ausmaß. Dass hier trotz der fehlenden AT ebenfalls minimale Signale zu verzeichnen sind, kann über eine Selbst-Acylierung des ACP begründet werden. Dabei handelt es sich um keine enzymatisch katalysierte Reaktion. Selbstbeladungsreaktionen konnten ebenfalls schon an der *holo*-ACP PksL aus dem *pksX*-Gencluster⁵³ und für ACPs aus FAS nachgewiesen werden¹⁶⁶. Die Studie über Selbst-Acylierung von FAS zeigte bei Anwesenheit und Abwesenheit von AT radioaktive Signale, wobei die Signale bei der Anwesenheit von AT wesentlich stärker waren. Zusätzlich war die Selbst-Acylierung im Vergleich mit der AT katalysierten Reaktion stark abhängig von den Substratkonzentrationen und der Inkubationstemperatur. Auch für die Linkerfusionsprodukte von PedI3 konnte die Übertragung des Elongationssubstrates, in gleichem Ausmaß wie bei PedI3, festgestellt werden. Diese Erkenntnis belegt das Ergebnis deutlicher und ist weiterhin für die Anwendung der Module in den Assays unter Abschnitt 5.1.4 wichtig, da PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukte hier zum biosynthetischen Nachweis bei der Einführung von β -Verzweigungen

verwendet werden sollen. Für den Einsatz der Enzyme in diesen Assays sind die Enzyme in aktiver Form essentiell.

Um den Nachweis der Übertragung von Malonyl-CoA **6** durch PedD auf die ACPs von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten noch spezifischer nachzuweisen, wurden zusätzlich vergleichende Assays mit *apo*- und *holo*-PedF-Linker/PedI3 durchgeführt (Abb. 5-20). Der Assay wurde wiederum nach 6.7.1 durchgeführt. Die Inkubationszeiten wurden hierbei zwischen 2,5 min und 15 min variiert. Da bei den Assays aus Abb. 5-20 der Nachweis der Substratübertragung durch PedD nach einer Inkubationszeit von Enzym und Substrat von 2 min erfolgte, sollten hier auch längere Inkubationszeiten getestet werden. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die erwartete negative Substratübertragung bei der *apo*-Form nur durch eine zu kurz gewählte Inkubationszeit vorhanden war.

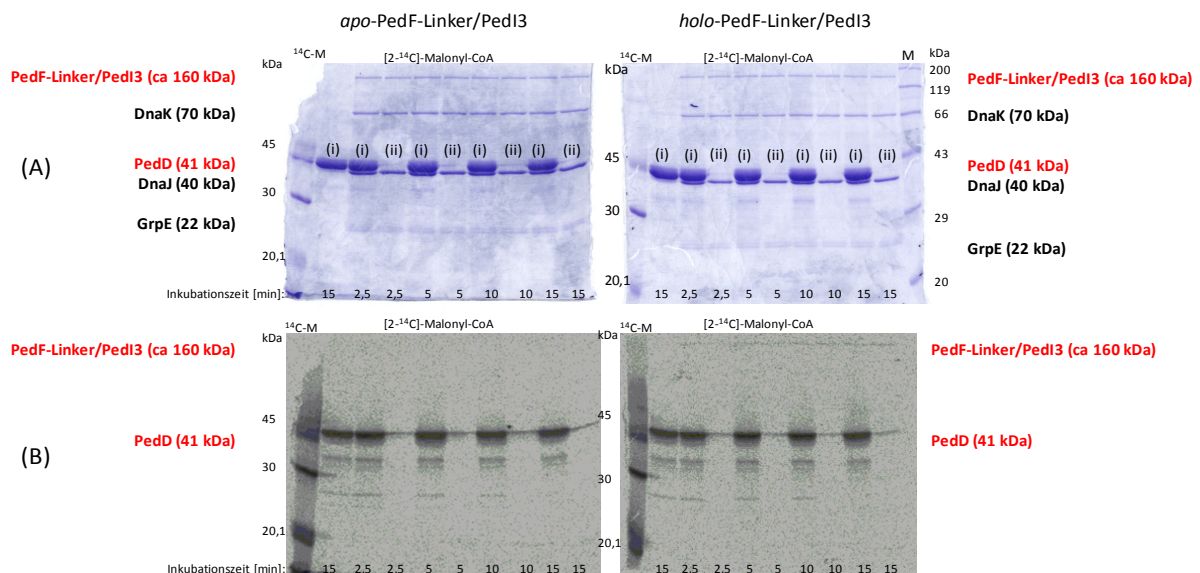


Abb. 5-20: Ergebnisse der ¹⁴C-Malonyl-CoA **6 Substratbeladungsreaktionen durch PedD auf PedF-Linker/PedI3 und dessen Linkerfusionsproteine.**

(A) SDS-PAGE, Coomassie gefärbt; (B) Autoradiogramm. Die Inkubationszeiten der Substratbeladungsreaktion sind unten auf dem jeweiligen Gel bzw. Autoradiogramm angegeben; (i) mit PedD (AT), (ii) ohne PedD (AT).

Enzymassay entsprechend 6.7.1. Detektionszeit auf dem Film: 24 h. Expressionsbedingungen: PedF-Linker/PedI3 analog zu 5.1.1.6., PedD analog zur Literatur⁹¹. M=Marker, 14C-M = 14C-markierter Proteinmarker Rainbow (CFA755).

Aus Abb. 5-20 ist ersichtlich, dass die Malonyl-CoA **6** Übertragung durch PedD auf PedF-Linker/PedI3 nur bei der aktivierten *holo*-Form und nicht bei der inaktiven *apo*-Form erfolgte. Die Signale des Malonyl-PedF-Linker/PedI3 ist auf den Autoradiogrammen nicht so deutlich wie bei Abb. 5-19, jedoch reichen sie für den Nachweis der fehlenden Substratübertragung auf die inaktive *apo*-Form durch einen Vergleich mit der *holo*-Form aus. Gleichzeitig ist wiederum die bereits beschriebene Selbst-Acylierung der ACPs bei fehlendem PedD zu sehen. Dabei ist die Selbst-Acylierung nach einer Inkubationszeit von 2,5 min wesentlich geringer als bei der AT katalysierten Übertragung von

Malonyl. Dagegen ist nach einer Inkubationszeit von 5 min und länger kein Unterschied in den Signalstärken zu erkennen.

Gleichzeitig dient dieser Versuch als indirekter Nachweis der Phosphopantetheinylierung von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten über die co-exprimierte Svp. Die massenspektrometrische Analytik unter Abschnitt 5.1.1.8 war nicht erfolgreich. Daher ist die nachgewiesene Acylierungsreaktion der putativen *holo*-Form in Kombination der nicht vorhandenen Acylierungsreaktion der putativen *apo*-Form ein Nachweis für die PPTase-Reaktion der co-exprimierten Svp.

Wie schon erwähnt, konnte die AT PedC des Pederin-Clusters bisher als Maltosebindefusionsprotein exprimiert werden. Eine Substratakzeptanz bzw. Übertragung konnte weder für Malonyl-CoA **6** noch für Acetyl-CoA **5** nachgewiesen werden.⁹¹ Da die Expression mit C-terminalem Strep-Tag II und zusätzlicher Co-Expression erfolgreich war (Abschnitt 5.1.2.1), konnte PedC nun mit einem kurzen Tag erneut auf eine Substratakzeptanz getestet werden (Abb. 5-21). In den Assays wurde kein ACP zugegeben, da die Detektion von Acetyl-PedC und Malonyl-PedC - wie auch schon an PedD gezeigt - erfolgen kann. Der Assay wurde entsprechend Abschnitt 6.7.1 durchgeführt. Die Inkubationszeit wurde auf 15 min erhöht, da auch schwache Wechselwirkungen detektiert werden sollten. Da PedC in sehr geringen Konzentrationen in den Elutionsfraktionen vorlag, wurden anstatt 5 µL PedC-Elutionsfraktion, 14µL zugegeben. Als Positivkontrolle diente PedD. Dies wurde analog zu PedC behandelt. Auf den Gelen (Abb. 5-21) tritt PedD als Doppelbande auf. Dieser Effekt war nach kurzzeitiger Lagerung bei 4 °C zu verzeichnen, hatte allerdings keinen Effekt auf die Akzeptanz der Substrate und war vermutlich aufgrund von Proteolyse vorhanden. Ungewöhnlich scheint eine schwache Akzeptanz von PedD gegenüber Acetyl-CoA **5**. Dies konnte in den Experimenten von Katrin Zimmermann nicht gezeigt werden.⁹¹ Da in diesen Experimenten sehr hohe Konzentrationen von PedD und sehr lange Inkubationszeiten (15 min) verwendet wurden, scheint es sich bei diesem Signal um eine unspezifische Reaktion zu handeln.

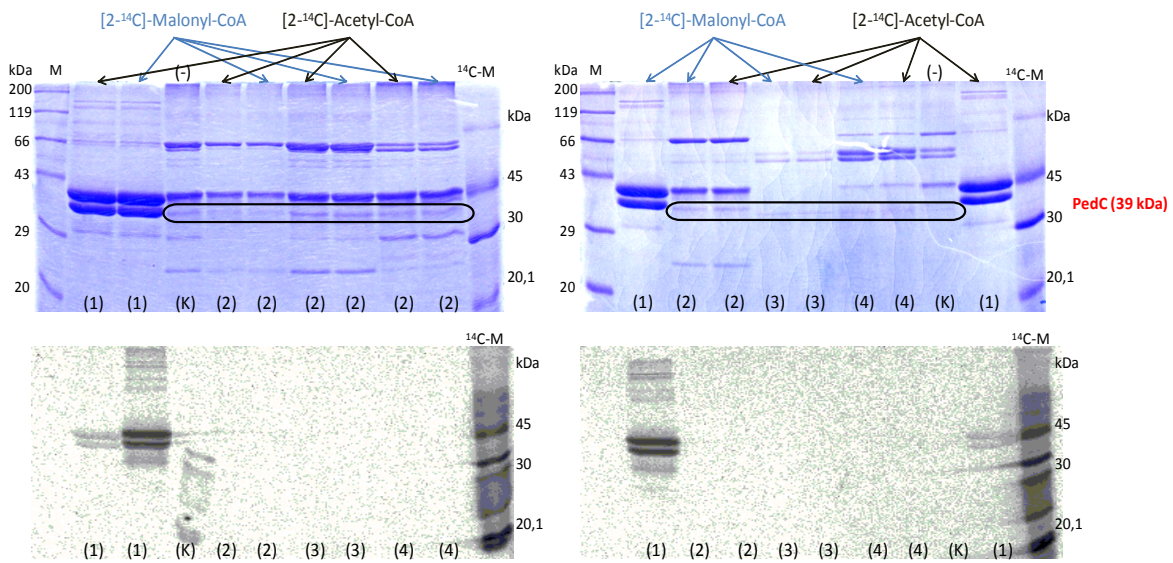


Abb. 5-21: SDS-PAGE (Coomassie gefärbt) und Autoradiogramm zum Test der Substratazeptanz von PedC gegenüber Malonyl-CoA 6 bzw. Acetyl-CoA 5.

Als Positivkontrolle wurde PedD (1) analog zu PedC verwendet. Bei der Kontrolle (K) wurde kein radioaktives Substrat ^{14}C -Malonyl-CoA 6 bzw. ^{14}C -Acetyl-CoA 5 zugegeben. (2) PedC exprimiert unter der Co-Expression der Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE, (3) PedC exprimiert unter Co-Expression des Chaperon Tig, (4) PedC exprimiert unter Co-Expression der Chaperone GroES und GroEL.

Enzymassay entsprechend 6.7.1. Detektionszeit auf dem Film: 24 h. Expressionsbedingungen: PedC analog zu 5.1.2.1, PedD analog zur Literatur⁹¹. M=Marker, 14C-M = ^{14}C -markierter Proteinmarker Rainbow (CFA755).

Die Gele in Abb. 5-21 zeigen, dass PedC weder Substratazeptanz gegenüber Acetyl-CoA 5 noch gegenüber Malonyl-CoA 6 aufweist. Zwar sind die qualitativen Proteinkonzentrationen über die Bandenintensitäten relativ schwach, da die Methode aber sehr sensitiv ist, sollten bei einer Substratazeptanz Signale zu erkennen sein. Bei einem Vergleich mit der Intensität des Signals von PedD (Abb. 5-19) wird deutlich, dass bei einer Substratazeptanz von PedC in den Autoradiogrammen (Abb. 5-21) ein Signal vorhanden sein sollte. Daher scheint PedC nicht für die Übertragung von Malonyl-CoA 6 und Acetyl-CoA 5 zuständig zu sein. Zumindest trifft diese Aussage auf die Akzeptanz von Malonyl-CoA 6 bzw. Acetyl-CoA 5 in den durchgeführten Experimenten zu. Unter Umständen könnte PedC auch Reaktionen katalysieren, die noch nicht bekannt sind oder PedC könnte erst die Katalysefähigkeit erlangen, wenn weitere externe Faktoren gegeben sind. Vorstellbar wären hierfür beispielsweise Protein-Protein-Interaktionen oder andere Co-Faktoren. Solche externen Faktoren konnten bisher allerdings nicht bei der Funktionsweise von AT-Domänen nachgewiesen werden. Letztendlich spricht jedoch gegen eine Inaktivität von PedC die weite Verbreitung von PedC-homologen in anderen *trans*-AT PKS-Clustern. Außerdem eliminieren sich inaktive Sequenzen im Laufe der Evolution aus Genclustern. Zusätzlich wird unter Abschnitt 5.2 gezeigt, dass die Transkription von PedC über die native Regulation funktioniert. Dies wäre ein weiterer Grund dafür, dass PedC Funktionen bei der Biosynthese des Pederin 20 übernimmt. Bei dem *trans*-AT-Cluster, der für die Biosynthese von Bryostatin zuständig ist, sind ebenfalls zwei ATs

vorhanden. Hier katalysieren beide ATs (BryP AT₁ und BryP AT₂) den Transfer von Malonyl-CoA **6** und Methylmalonyl-CoA **11**.⁹⁶ In diesem Fall scheinen sich die beiden vorhandenen ATs zu unterstützen. Beim Pederin **20** scheint dies nicht der Fall zu sein, da PedC keine Funktion zeigt. Um weitere Studien über die Funktion von PedC durchzuführen, scheint eine heterologe Expression des Pederin-Clusters sinnvoll zu sein. Dadurch könnte eine *pedC* Knock-Out-Mutante generiert werden. Diese könnte weiteren Aufschluss darüber geben, ob PedC essentiell für die Biosynthese des Pederins **20** ist oder als inaktives, unfunktionelles Gen im Cluster vorhanden ist. AT-Knock-Out-Studien wurden bereits an *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42 durchgeführt.¹⁶⁷ Dieser Stamm produziert die Polyketide Difficidin, Macrolactin und Bacillaen **30**, dessen Biosynthesegene in *trans*-AT Genclustern codiert sind. Der Difficidin- und Macrolactin-Cluster codiert jeweils eine AT wogegen der Bacillaen-Cluster drei ATs codiert. Die Analyse der AT-Knock-Out Mutanten zeigte, dass die ATs des Difficidin- und Macrolactin-Cluster nicht essentiell für die Biosynthese der Metabolite sind und vermutlich durch die ATs des Bacillaen-Cluster komplementiert werden.¹⁶⁷ Dagegen müssen für die Biosynthese des Bacillaen **30** alle drei ATs aus dem Biosynthese-Gencluster vorhanden sein.¹⁶⁷ BaeD, eine der Bacillaen ATs, ist phylogenetisch verwandt mit PedC⁹⁶ und deshalb ein Hinweis darauf, dass PedC-Homologe eine Funktion bei der Polyketid-Biosynthese besitzen.

Da die Funktionalität der Malonyl-CoA **6** Substratübertragung durch PedD auf PedN und dem Doppel-ACP von PedI⁹¹ sowie am Modul PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten (Abb. 5-19) gezeigt werden konnte, war zusätzlich von Interesse, ob auch die ACPs aus der Psymberin **21**-Biosynthese durch PedD beladen werden können. Dieses würde auch den ersten Hinweis auf die Funktionalität des Psymberin-Clusters liefern. Dazu wurden PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ exprimiert (5.1.1.7) und zusammen mit PedD (Expression entsprechend Literatur)⁹¹ in Enzymassays eingesetzt (Abb. 5-22 und Abb. 5-23).

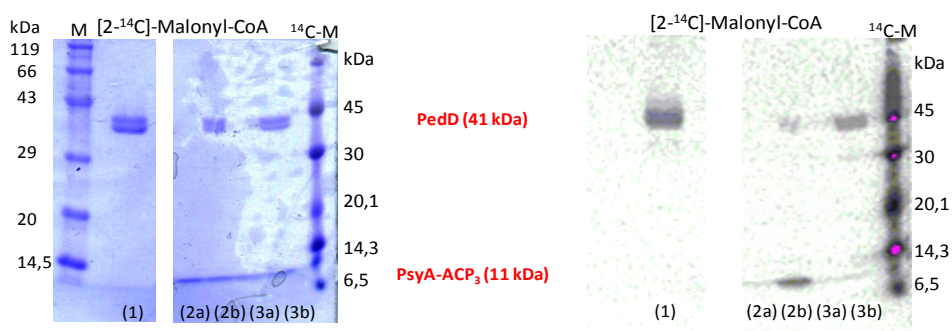


Abb. 5-22: Ergebnisse der ¹⁴C-Malonyl-CoA **6** Substratbeladungsreaktionen durch PedD auf PsyA-ACP₃.

SDS-PAGE und Autoradiogramm der ¹⁴C-Malonyl-CoA **6** Substratbeladung durch PedD auf PsyA-ACP₃. (1) PedD, (2a) *holo*-PsyA-ACP₃ ohne PedD, (2b) *holo*-PsyA-ACP₃ mit PedD, (3a) *apo*-PsyA-ACP₃ ohne PedD, (3b) *apo*-PsyA-ACP₃ mit PedD. M = Marker, ¹⁴C-M = ¹⁴C-markierter Proteinmarker Rainbow (CFA755).

Enzymassay entsprechend 6.7.1. Detektionszeit auf dem Film: 24 h. Expressionsbedingungen: PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ analog zu 5.1.1.7, PedD analog zur Literatur⁹¹.

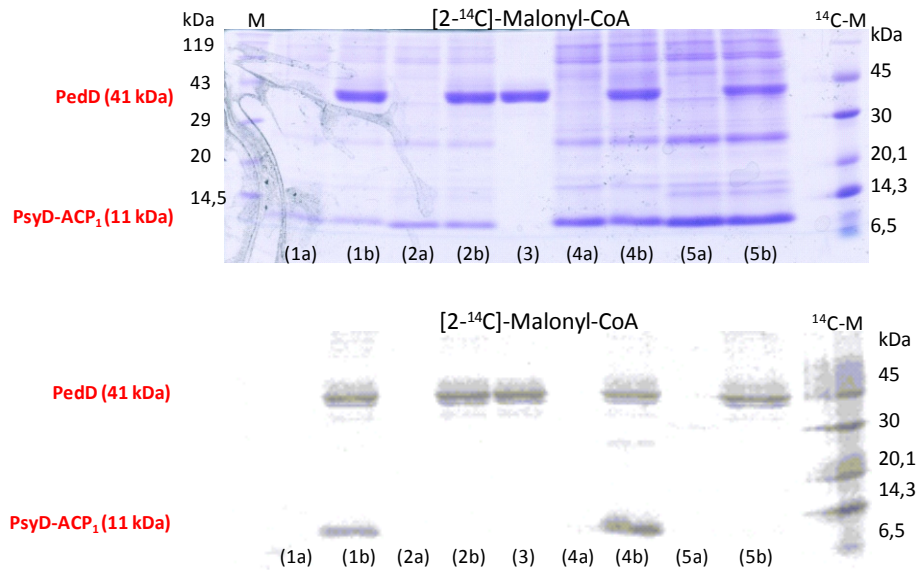


Abb. 5-23: Ergebnisse der ^{14}C -Malonyl-CoA 6 Substratbeladungsreaktionen durch PedD auf PsyD-ACP₁.

SDS-PAGE und Autoradiogramm der ^{14}C -Malonyl-CoA 6 Substratbeladungsreaktionen durch PedD auf PsyD-ACP₁. (1a) *holo*-PsyD-ACP₁ ohne PedD, (1b) *holo*-PsyD-ACP₁ mit PedD, (2a) *apo*-PsyD-ACP₁ ohne PedD, (2b) *apo*-PsyD-ACP₁ mit PedD, (3) PedD, (4a) *holo*-PsyD-ACP₁ ohne PedD, (4b) *holo*-PsyD-ACP₁ mit PedD, (5a) *apo*-PsyD-ACP₁ ohne PedD, (5b) *apo*-PsyD-ACP₁ mit PedD. Bei (4a) bis (5b) wurde PsyD-ACP₁ über Vivaspin Zentrifugalröhrchen (MWCO = 5000) ca. 10 fach ankonzentriert. M = Marker, ^{14}C -M = ^{14}C -markierter Proteinmarker Rainbow (CFA755).

Enzymassay entsprechend 6.7.1. Detektionszeit auf dem Film: 24 h. Expressionsbedingungen: PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ analog zu 5.1.1.7, PedD analog zur Literatur.⁹¹

Aus den Signalen der Autoradiogramme ergibt sich aus Abb. 5-22 für die Malonylierung von PsyA-ACP₃ durch PedD ein eindeutiges Ergebnis. Auf die *holo*-Form wurde unter den gegebenen Bedingungen das Substrat durch PedD übertragen (Abb. 5-22, (2b)), ohne PedD erfolgte die Reaktion nicht oder zumindest in wesentlich geringerem Ausmaß (Abb. 5-22, (2a)). Bei der *apo*-Form war mit und ohne PedD-Zugabe kein Signal zu erkennen und diese daher auch nicht malonyliert (Abb. 5-22, (3a) und (3b)). Für die Versuche mit PsyD-ACP₁ (Abb. 5-23) wurde aufgrund der sehr geringen Ausbeuten von PsyD-ACP₁ aus den Expressionen und Aufreinigungen (vgl. 5.1.1.7) die Proben zusätzlich ca. 10 fach mittels Vivaspin Zentrifugalröhrchen aufkonzentriert. Die Signale des Autoradiogramms können analog zu den Ergebnissen von PsyA-ACP₃ betrachtet werden. Die *holo*-Form wird nach der Inkubation mit PedD malonyliert (Abb. 5-23 (1b) und (4b)). Diese Reaktion erfolgt nicht ohne der Zugabe von PedD (Abb. 5-23 (1a) und (4a)) bzw. in wesentlich geringerem Ausmaß. Die *apo*-Form wird nicht malonyliert (Abb. 5-23 (2a),(2b) und (5a),(5b)).

In weiteren Experimenten wurde auch die Substratübertragung von Acetyl-CoA 5 auf PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ getestet (Abb. 5-24). Um eine Signalkontrolle zu haben, wurde PedD mit [2- ^{14}C]-Malonyl-CoA 6 inkubiert. Geeigneter für diese Reaktionen wäre die Inkubation mit der AT des Psymberin-Cluster (PsyH) gewesen, da PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ nativ durch diese AT malonyliert werden und PedD aufgrund der erfolgten Experimente keine Substratspezifität für Acetyl-CoA 5

besitzt. Dennoch hätte zum Beispiel eine Selbst-Acylierungsreaktion der eingesetzten ACPs Einsichten in die Funktionsweise geben können.

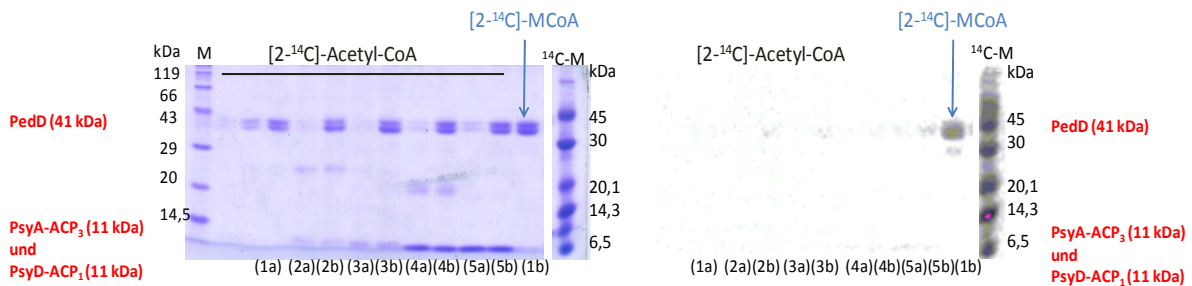


Abb. 5-24: Ergebnisse der ^{14}C -Acetyl-CoA 5 Substratbeladungsreaktionen durch PedD auf PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁.

(1a) PedD inkubiert mit ^{14}C -Acetyl-CoA 5, (1b) PedD inkubiert mit ^{14}C -Malonyl-CoA 6 (2a) *holo*-PsyD-ACP₁ ohne PedD, (2b) *holo*-PsyD-ACP₁ mit PedD, (3a) *apo*-PsyD-ACP₁ ohne PedD, (3b) *apo*-PsyD-ACP₁ mit PedD, (4a) *holo*-PsyA-ACP₃ ohne PedD, (4b) *holo*-PsyA-ACP₃ mit PedD, (5a) *apo*-PsyA-ACP₃ ohne PedD, (5b) *apo*-PsyA-ACP₃ mit PedD.

Enzymassay entsprechend 6.7.1. Detektionszeit auf dem Film: 24 h. Expressionsbedingungen: PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ analog zu 5.1.1.7, PedD analog zur Literatur⁹¹.

Aus Abb. 5-24 wurde deutlich, dass Acetyl-CoA 5 nicht von PedD auf PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ übertragen wird. Dies zeigt sich durch einen Vergleich der Signalstärken von dem malonylierten PedD (Abb. 5-24, (1b)) mit den nicht oder minimal vorhandenen Signalen der mit Acetyl-CoA 5 inkubierten Proben (Abb. 5-24, (2b) bis (5b)). Auch die ohne PedD inkubierten ACPs PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ zeigen keine oder nur sehr schwache Signale (Abb. 5-24 (2a) bis (5a)), sodass keine oder sehr geringe Selbst-Acylierungsreaktionen vorhanden sind.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PedD für die Substratübertragung von Malonyl-CoA 6 auf das einzelstehende ACP PedN,⁹¹ das Doppel-ACP von PedI³⁹¹ und das ganze Modul PedI3 zuständig ist. Daher scheint PedD für die Übertragung der Malonyl-Elongationseinheiten auf die verschiedenen modularen ACPs zuständig zu sein. Da PedD Malonyl-CoA 6 überträgt, nicht jedoch den Transfer von Acetyl-CoA 5 katalysiert, kann hier von einer Substratspezifität gesprochen werden, wogegen keine ACP-Spezifität vorliegt, da ACPs unterschiedlicher Module malonyliert werden. In der Literatur sind auch Ansätze zu finden, die eine hohe Substratspezifität der AT nachweisen, die für das Elongationssubstrat zuständig ist wogegen die für die Startereinheit zuständige AT geringe Substratspezifitäten aufweist.^{168,169} Diese Betrachtungen passen ebenfalls zu den Substratspezifitäten der Elongationssubstrat-AT der Bacillaen **30**-Biosynthese^{46,53}, der Erythromycin A **2**-Biosynthese¹⁶⁸ und der Leinamycin **31**-Biosynthese¹⁶⁴, wobei im Leinamycin Biosynthese-Gencluster nur eine AT existiert. Auch die Substratspezifitäten der beiden ATs des Bryostatin-Clusters konnten bestimmt werden.⁹⁶ Dabei konnte die Substratspezifität auf Malonyl-CoA 6 und Methylmalonyl-CoA 11 festgelegt werden. Die generierten Daten von PedD passen daher zu den bereits bekannten Substratspezifitäten von ATs, die für das Elongationssubstrat zuständig sind.

Die Übertragung der Malonyl-Einheit auf die Proteine aus EryA-Linker_{1,2} und PedF-Linker fusioniert mit dem Modul PedI3 war wichtig für den Nachweis der Funktionalität dieser nicht nativen Proteine, da sie unter 5.1.4 in weiteren Enzymassays eingesetzt werden sollen und zum Nachweis der Einführung von β -Verzweigungen in Polyketide dienen.

Die Funktion der zweiten AT PedC des Pederin-Clusters bleibt trotz der erfolgreichen Expression mit kurzem Strep Tag II unklar. *PedC* scheint entweder als evolutives Relikt im Cluster verblieben zu sein oder eine bisher unbekannt Funktion zu besitzen. Eine Übertragung der Acetyl-Startereinheit durch die GNAT-Domäne auf das erste Modul von PedI scheint daher eine plausible Erklärung zu sein. Besonders, da diese Funktion der GNAT-Domäne inzwischen am Curacin A-Gencluster gezeigt werden konnte.⁹⁷ In der Studie konnte gezeigt werden, dass die GNAT-Domäne in der Lage ist Malonyl-CoA **6** zu decarboxylieren und das dadurch entstandene Acetyl-CoA **5** auf *holo*-ACPs zu übertragen. Durch die Kristallstruktur der GNAT-Domäne konnte bewiesen werden, dass der Phosphopantetheinarm dabei eine wichtige Rolle spielt. In der Proteinsequenz der GNAT-Domäne der Curacin-Biosynthese sind Homologien mit der GNAT-Domäne der Pederin **20**-Biosynthese zu erkennen. Daher liegt eine ähnliche Funktionsweise der Domänen bei der Initiation der Biosynthese sehr nahe. Aus zeitlichen Gründen wurde keine Untersuchung der GNAT-Domäne vorgenommen.

Die Ergebnisse des Radioaktivassays bestätigen auch die Phosphopantetheinylierung durch die co-exprimierte Svp, die schon unter Abschnitt 5.1.1 betrachtet wurde. Aus der vorhandenen Substratübertragung auf die *holo*-ACPs von PedI3, PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ sowie die nicht vorhandene Substratübertragung auf die *apo*-ACPs lässt sich schließen, dass die Phosphopantetheinylierung der getesteten freistehenden und modularen ACPs durch Svp erfolgreich durchgeführt wurde.

5.1.3 Kinetische Untersuchungen von PedD

Da die Substratspezifität und Funktion von PedD unter Abschnitt 5.1.2.2 charakterisiert werden konnte, sollte sich eine genauere biochemische Untersuchung der Reaktionskinetik der Substratbeladung anschließen. Zur Erstellung der Enzymkinetik kann beispielsweise der schon durchgeführte Radioaktiv-Assay verwendet werden, wobei die enzymatische Reaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt sowie bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen werden muss.¹⁷⁰ Aufgrund der erforderlichen Anzahl von Messungen und dem zeitlichen Aufwand wurde diese Möglichkeit zur Erstellung einer Enzymkinetik ausgeschlossen. Da bei der Substratübertragung CoA **12** frei wird, kann stattdessen der zeitliche Reaktionsverlauf auch über die Bestimmung des frei werdenden CoA **12** erfolgen. Dabei wird die CoA **12**-Freisetzung an eine zweite, enzymatische Reaktion gekoppelt, in der α -Ketoglutarat durch eine α -Ketoglutaratdehydrogenase (KDH) zu Succinyl-CoA umgesetzt wird (Abb. 5-25). Dabei wird NAD⁺ zu NADH reduziert, welches

fotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm detektiert werden kann. Mit diesem fotometrischen Assay konnte bereits das freiwerdende CoA **12** bei Reaktionen der MCAT von *Escherichia coli*, der β -Ketoacyl ACP Synthase von *Streptococcus pneumoniae* und der MCAT von *Helicobacter pylori* bestimmt werden.¹⁷¹⁻¹⁷⁴

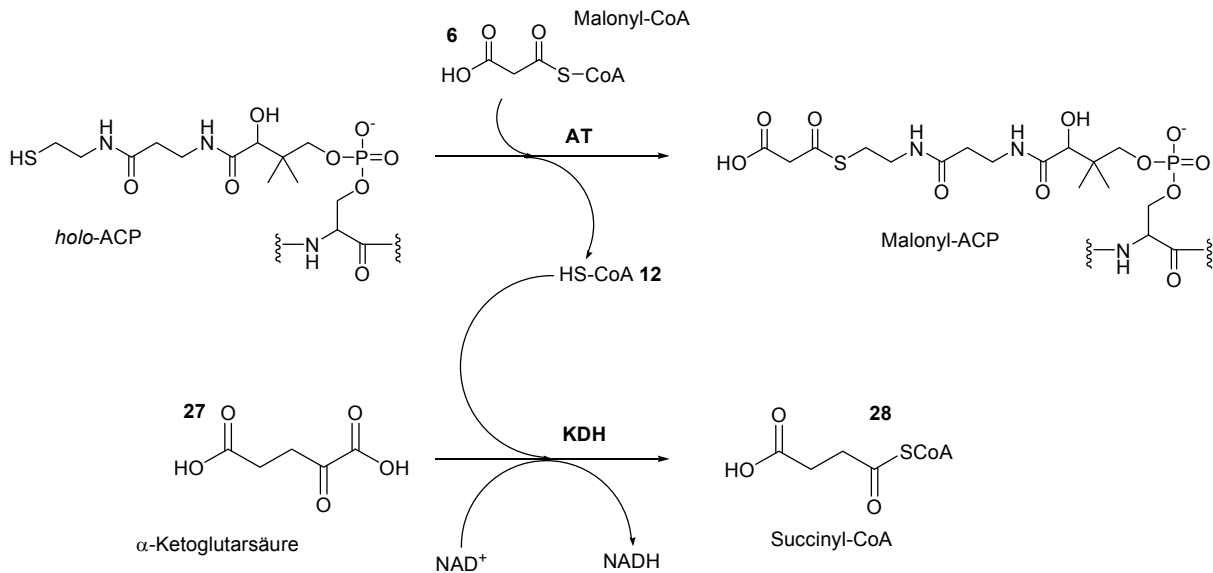


Abb. 5-25: Enzymatische Reaktionen im gekoppelten Assay zur Bestimmung der AT-ACP-Kinetik.

In der Dissertation von Katrin Zimmermann fanden schon erste Experimente zur Erstellung der Kinetik für PedD statt.⁹¹ Als ACP wurde PedN verwendet. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Unterschiede zwischen den eingesetzten Substratkonzentrationen kaum vorhanden sind sowie eine sehr schlechte Reproduzierbarkeit der Messwerte vorhanden war. Daher wurde zuerst die Funktionalität des Assays überprüft, um daraufhin Messungen mit den zu charakterisierenden Enzymen zu machen. Die Überprüfung des Assays erfolgte, indem die gekoppelte Reaktion der α -Ketoglutaratdehydrogenase unter Verwendung von CoA **12** als Substrat und unter verschiedenen CoA **12**-Konzentrationen getestet wurde (Abb. 5-26). Die im Reaktionsansatz (6.7.2) fehlenden Bestandteile der AT und ACP wurde durch gleiches Volumen Wasser ersetzt.

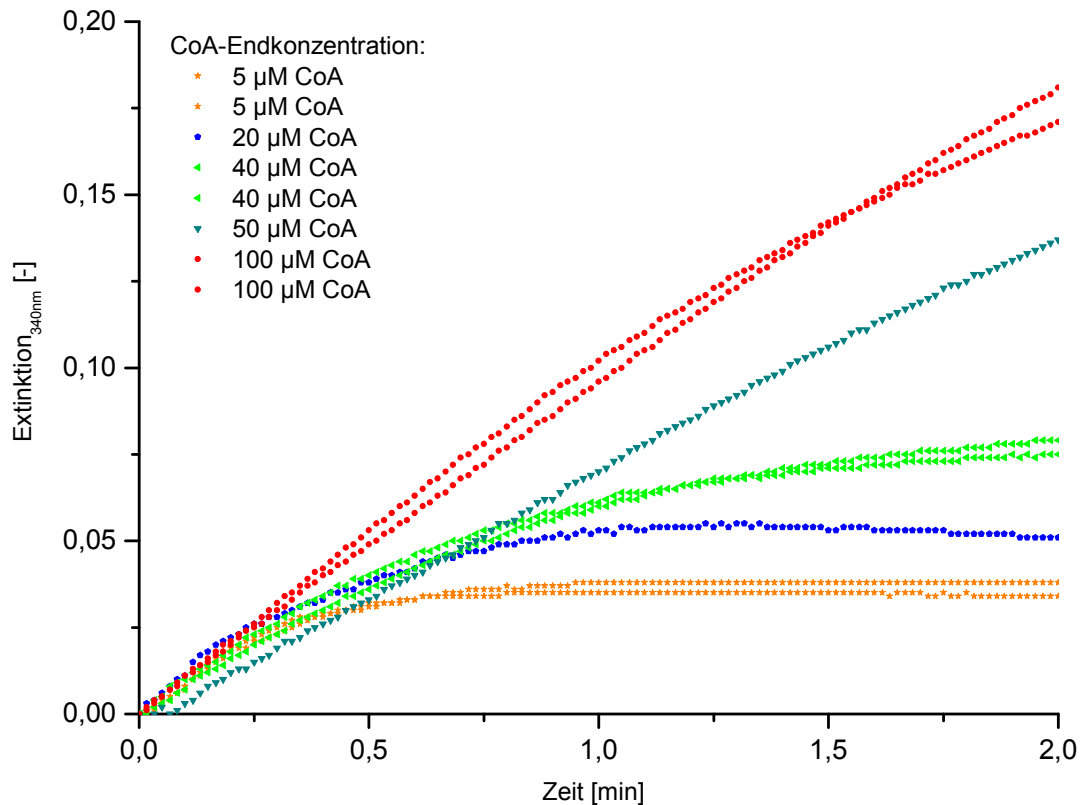


Abb. 5-26: Darstellung der Extinktion_{340nm} gegen Zeit zum Test der α -Ketoglutaratdehydrogenase-Reaktion des gekoppelten Assay.

Die Kurven wurden vor der Auftragung im Diagramm auf 0 normiert.

Durch die im Diagramm aufgetragenen Messwerte wird deutlich, dass die enzymatische Reaktion der α -Ketoglutaratdehydrogenase zur Detektion von CoA **12** geeignet ist. Der Reaktionsverlauf (Abb. 5-26) zeigt, dass bei geringeren CoA **12**-Konzentrationen auch die Kurvenverläufe flacher werden und die Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt. Eine genauere Auswertung der kinetischen Daten der α -Ketoglutaratdehydrogenase erfolgte nicht, da die KDH nur auf die Funktion der enzymatischen Reaktion getestet werden sollte. Allerdings konnten bei einigen Messungen relativ hohe Abweichungen beobachtet werden. Einige der Messungen wichen enorm von den Daten in Abb. 5-26 ab (Daten nicht dargestellt). Der Grund für die großen Abweichungen konnte nicht identifiziert werden, da auch bei höchster Präzision im Reaktionsansatz und unter Beibehaltung der äußeren Temperaturbedingungen immer wieder Diskrepanzen in den Kurvenverläufen entstanden.

Nach der Verifizierung des gekoppelten Assays wurden die Enzyme des Pederin-Clusters im Assay getestet. Da entsprechend der Literatur¹⁷¹ relativ hohe Konzentration ACP im Assay vorliegen sollten, kam nur das ACP PedN für den Einsatz im Assay in Frage. Die Expression und Aufreinigung erfolgte über *E. coli* BL21 DE3 pKZ161-1 (*apo*-PedN) und pKZ124-17 (*holo*-PedN) in Anlehnung an die Literatur.⁹¹ Außerdem konnte PsyA-ACP₃ verwendet werden, da dieses ebenfalls in sehr hohen Konzentrationen exprimiert und aufgereinigt werden konnte (5.1.1.7). Die Expression der AT PedD

erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Katrin Zimmermann.⁹¹ Die ersten Messungen erfolgten mit PedN und PedD entsprechend den unter 6.7.2 beschriebenen Bedingungen bei Raumtemperatur (Abb. 5-27, A und B). Aus den Messungen zeigte sich, dass eine substratabhängige Reaktionsgeschwindigkeit vorhanden war. Die Negativkontrollen (ohne Substrat, ohne PedN und ohne PedD und PedN (Abb. 5-27, A)) wiesen einen kaum messbaren Reaktionsverlauf auf. Allerdings zeigte sich aus Messungen ohne AT PedD (nicht als Negativkontrolle dargestellt in Abb. 5-27, A), dass die Selbst-Acylierungsreaktion von PedN ähnlich schnell verläuft wie die AT katalysierte Reaktion (Abb. 5-27, C). Einige Messungen zeigten eine Beschleunigung der Acylierungsreaktion von PedN durch PedD, andere Messungen hatten einen identischen Kurvenverlauf ohne und mit der AT PedD. Der Assay war demnach funktional und es konnte eine deutliche Acylierungsreaktion von PedN detektiert werden. Der Unterschied zwischen Selbst-Acylierung und AT-katalysierter Substratbeladung war jedoch nicht sehr deutlich zu erkennen.

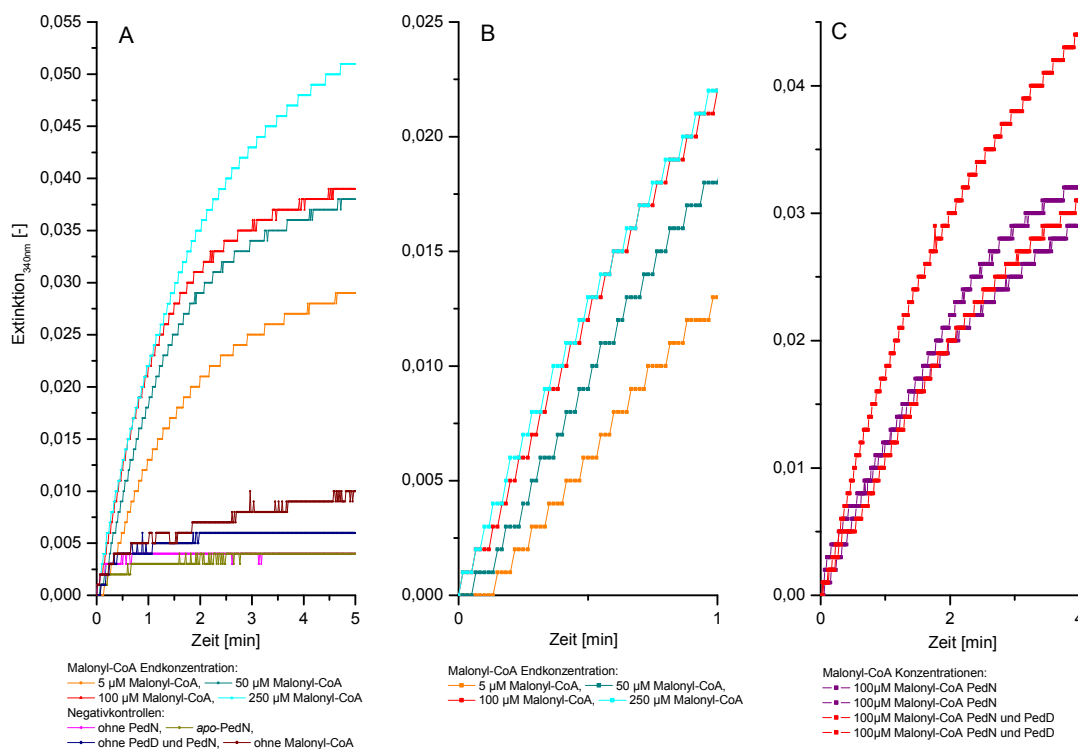


Abb. 5-27: Rohmessdaten des AT-ACP Assays bei Raumtemperatur.

- (A) Negativkontrollen sowie Messdaten bei unterschiedlichen Malonyl-CoA 6 Konzentrationen. Negativkontrolle ohne PedD nicht dargestellt (vgl. Abb. 5-27, C)
- (B) Linearer Bereich der Kurven aus (A) ohne die Negativkontrollen.
- (C) Aufgetragenen Messdaten bei einer Substratkonzentration von 100 μM Malonyl-CoA 6. In rot ist die PedD katalysierte Reaktion dargestellt, in lila die Selbstacylierungsreaktion von PedN.

Aufgrund der teilweise nicht vorhandenen Unterschiede zwischen der AT-katalysierten und der Selbstacylierungsreaktion von PedN (Abb. 5-27, C) wurde versucht, über die Optimierung des Assays Messwerte zu erzielen, die einen Unterschied zwischen PedD-katalysierter und PedN Selbstacylierungsreaktion zeigen. Dabei wurden unterschiedliche NADH-, KDH-, ACP- und AT-Konzentrationen getestet. Diese Änderungen führten zu keinem reproduzierbaren Unterschied zwischen der Selbstacylierungsreaktion und der PedD-katalysierten Reaktion (Daten nicht dargestellt). Zusätzlich wurden weitere Versuche mit Temperaturen von 4 °C und 10 °C durchgeführt. Auch bei den Radioaktivassays unter 5.1.2.2 zeigte sich häufig eine Selbstacylierung der ACPs, wenn die Probe zu lange oder bei Temperaturen zwischen 20 °C und 30 °C inkubiert wurde. Daher könnte der Unterschied zwischen Selbstacylierungsreaktion der ACPs und der AT-katalysierten Reaktion bei niedrigen Temperaturen deutlicher sichtbar werden. Beispielhaft zeigen die folgenden Messwerte den Unterschied der Messungen bei 4 °C und 10 °C (Abb. 5-28). Die Daten basieren auf einer 3-fach Bestimmung der jeweiligen Messreihe. Die Kurven wurden zuvor auf 0 normiert.

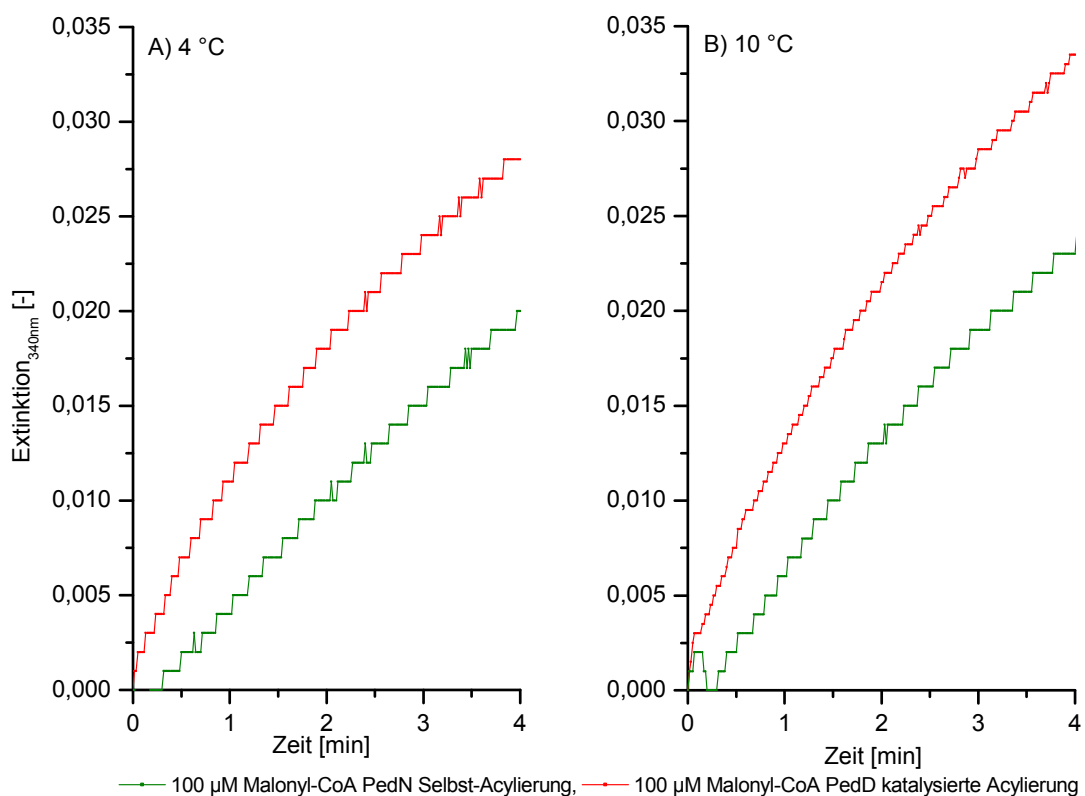


Abb. 5-28: Rohmessdaten des AT-ACP Assay bei Temperaturen von A) 10 °C und B) 4 °C und einer Substratkonzentration von 100 μM Malonyl-CoA 6.

Aus einem Vergleich der Selbstacylierung von PedN und der PedD katalysierten Substratübertragung aus Abb. 5-28 wird deutlich, dass bei 4 °C und 10 °C ein deutlicherer Unterschied zu erkennen ist, als dies bei Raumtemperatur der Fall war. Daher wurde zur Erstellung der Enzymkinetik die Messung bei 10 °C durchgeführt. Der Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Selbstacylierung und

PedD-katalysierter Substratübertragung scheint bei 4 °C noch deutlicher zu sein. Allerdings erniedrigt sich erwartungsgemäß auch die Steigung pro Zeiteinheit. Da die Gesamtsteigung bei der beobachteten Reaktion insgesamt schon sehr niedrig liegt und für die Erstellung einer Enzymkinetik deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Substratkonzentrationen ersichtlich sein müssen, wurde die 10 °C-Reaktion bevorzugt. Es ist somit ein Kompromiss zwischen möglichst großem Unterschied der Selbstacylierungsreaktion von PedD und der AT-katalysierten Reaktion sowie einer guten Messbarkeit der Geschwindigkeitsunterschiede bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen.

Im Folgenden werden die erhaltenen kinetischen Daten von PedD dargestellt. Bei der Bestimmung der Michaelis-Menten Kinetik bei Raumtemperatur (Abb. 5-29) ist zu beachten, dass die Selbstacylierungsreaktion von PedN nahezu identisch ist mit der PedD katalysierten Reaktion. Daher wird nur die PedD-medierte Reaktion dargestellt.

Die Darstellung der kinetischen Daten bei 10 °C (Abb. 5-30) weist einen deutlichen Unterschied zwischen der Selbstacylierungsreaktion von PedN (Abb. 5-30, A2) gegenüber der PedD-katalysierten Reaktion auf (Abb. 5-30, A1). Zusätzlich wurde die PedD-katalysierte Substratübertragungsreaktion von PedD auf PsyA-ACP₃ und die Selbstacylierungsreaktion von PsyA-ACP₃ kinetisch untersucht (Abb. 5-30, B1 und B2). Dieser Vergleich ist sehr interessant, da hier zwei unterschiedliche ACPs unterschiedlicher Biosynthese-Gencluster betrachtet werden. PedN ist ein nichtmodulares, einzelstehendes ACP wohingegen PsyA-ACP₃ ein modulares ACP darstellt. Möglicherweise ergeben sich Unterschiede bezüglich der Selbstacylierungsreaktion oder der PedD katalysierten Reaktion bei modularen oder nicht-modularen ACPs. Unterschiede können allerdings ebenfalls aufgrund der Herkunft des verwendeten ACP auftreten. Im Falle von PsyA-ACP₃ wird eine nicht native Substratübertragung durchgeführt, da PsyA-ACP₃ aus dem Psymberein-Gencluster stammt. PedD ist für die Substratübertragung im Pederin-Cluster zuständig. Daher könnten Unterschiede bezüglich der ACP-spezifischen Substratbeladungsaffinitäten auch aufgrund der Clusterzugehörigkeiten vorhanden sein.

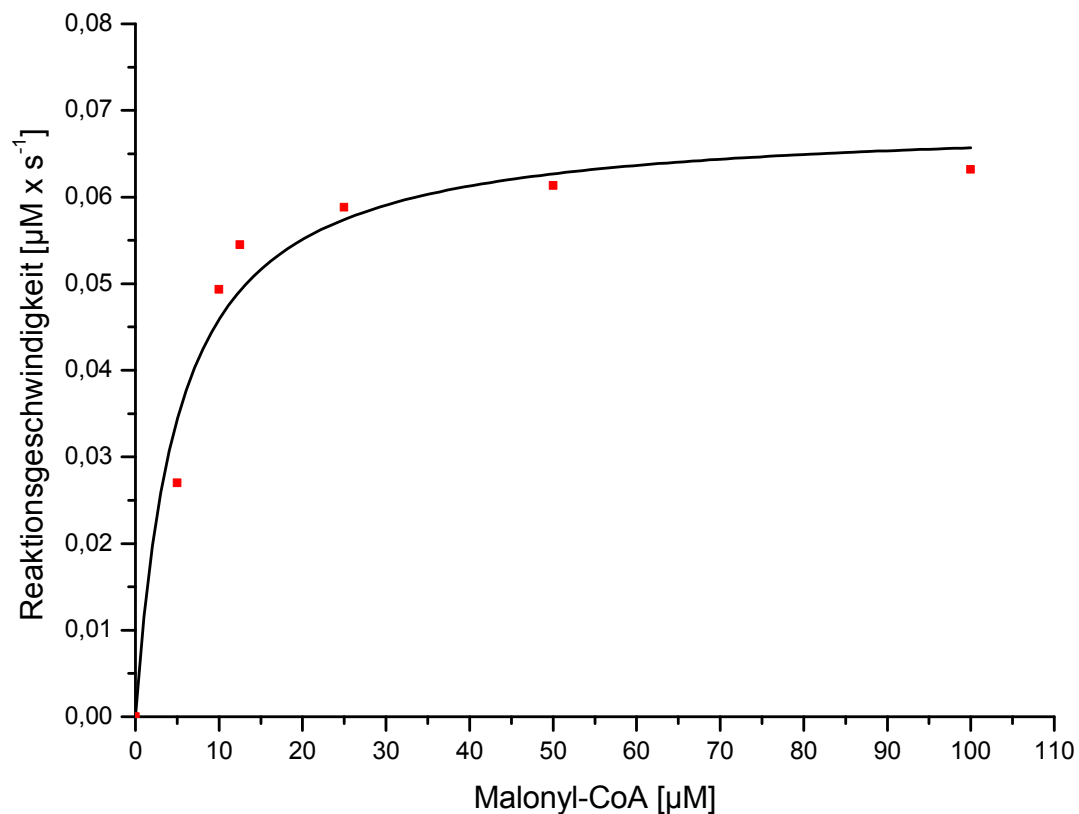


Abb. 5-29: Michaelis-Menten Kinetik der AT-ACP Substratübertragungsreaktion bei RT.

Konzentrationen im Assay: PedD = 0,15 µM; PedN = 2,56 µM; KDH = 10,185 mU. Kinetischen Daten: $V_{max} = 0,06901 \mu\text{M} \times \text{s}^{-1}$; $K_M = 5,04563 \mu\text{M}$; $k_{cat} = 0,46 \text{ s}^{-1}$; katalytische Effizienz ($k_{cat} \times K_M^{-1}$) = $0,091 \text{ s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$.

Die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Zeit zeigt den Verlauf einer Michaelis-Menten Kinetik (Abb. 5-29). Die kinetischen Werte K_M von ca. 5 µM, k_{cat} von $0,46 \text{ s}^{-1}$ und $k_{cat} \times K_M^{-1}$ von $0,091$ konnten bestimmt werden. Zu einem Vergleich mit Literaturdaten eignet sich besonders die AT des Bryostatin-Clusters BryP AT₁, die phylogenetisch sehr starke Ähnlichkeiten mit PedD aufweist.⁹⁶ Der Vergleich zeigt sehr ähnliche Werte (vgl. Tab. 5-2). K_M für PedD liegt 1,4 fach niedriger als bei BryP AT₁. Die Werte für k_{cat} mit $0,46 \text{ s}^{-1}$ für PedD und $0,7 \text{ s}^{-1}$ für BryP AT₁ sowie $k_{cat} \times K_M^{-1}$ mit $0,09 \mu\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ für PedD und $0,1 \mu\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ für BryP AT₁ liegen ebenfalls in einem vergleichbaren Bereich. An dieser Stelle muss hinzugefügt werden, dass die Bestimmung der kinetischen Daten bei BryP AT₁ auf Eis und methodisch auf Basis eines Radioaktiv-Assays durchgeführt wurde.⁹⁶ Zusätzlich war eine Betrachtung der Selbstacylierung des verwendeten BryB M7 ACP nicht notwendig, da diese keine Selbstacylierungsreaktion vollziehen kann.⁹⁶ Bei den hier betrachteten ACPs PedN und PsyA-ACP₃ musste die Selbstacylierungsreaktion vergleichend beobachtet werden (Abb. 5-30), da diese eine Selbstacylierung durchführen. Da dieser Vergleich unter Raumtemperatur nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, mussten diese wie erwähnt bei 10 °C durchgeführt werden. Die daraus resultierenden kinetischen Werte der PedD katalysierten Malonyl-CoA 6 Übertragung sind bei einem Vergleich mit der BryP AT₁ katalysierten Reaktion nicht mehr nahezu identisch, jedoch in den gleichen Größenordnungen (vgl. Tab. 5-2). Auch der methodische Ansatz über den verwendeten

gekoppelten Assay könnte unter Umständen hier eine Ursache für die Abweichungen sein, da hier ein weiteres Enzym, die KDH, fungiert. KDH aus Vertebraten hat ein Temperaturoptimum von 30 °C bis 37 °C.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Die Reaktion scheint aufgrund der messbaren Kurven dennoch zu funktionieren. Allerdings könnten aufgrund des Temperaturoptimums der KDH die Reaktionsverläufe bei 10 °C nicht mehr optimal detektiert werden. Die Unterschiede zwischen Selbstacylierungsreaktion von PedN und PsyA-ACP₃ gegenüber der PedD-katalysierten Malonylierung der ACPs lassen sich bei dieser Temperatur jedoch gut darstellen.

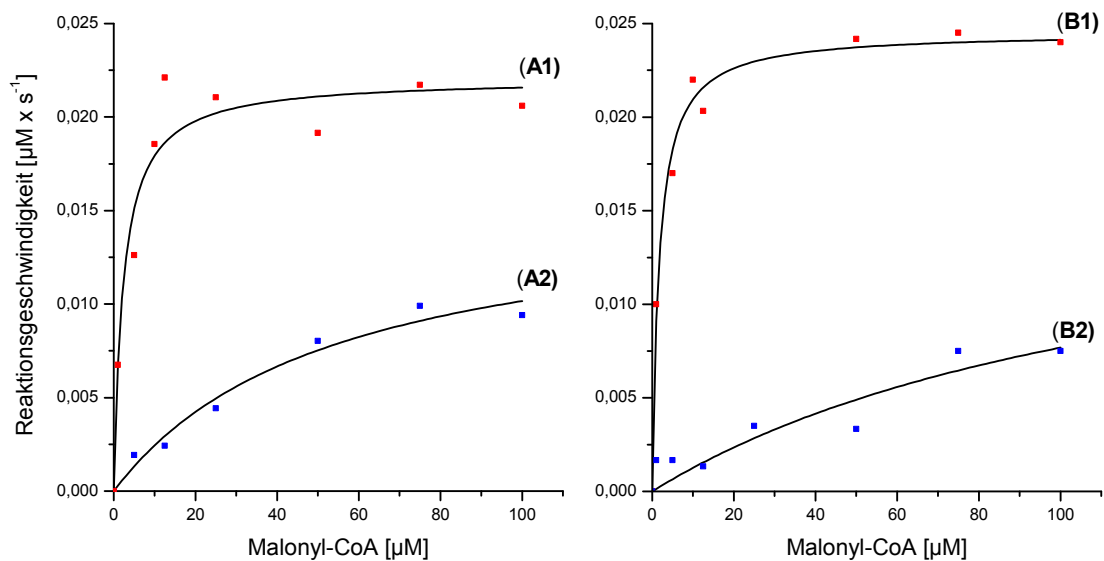


Abb. 5-30: Michaelis-Menten Kinetik der AT-ACP Substratübertragungsreaktion bei 10 °C sowie die zugehörigen Selbstacylierungsreaktionen.

(A1) Michaelis-Menten Kinetik der PedD-mediierten Acylierungsreaktion von PedN. Kinetische Daten: $V_{\max} = 0,02207 \mu\text{M} \times \text{s}^{-1}$; $K_M = 2,30688 \mu\text{M}$; $k_{\text{cat}} = 0,045 \text{ s}^{-1}$; katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$) = $0,019 \text{ s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. Konzentrationen im Assay: PedD = $0,495 \mu\text{M}$; PedN = $2,933 \mu\text{M}$; KDH = $13,58 \text{ mU}$.

(A2) Michaelis-Menten Kinetik der Selbstacylierungsreaktion von PedN. Kinetische Daten: $V_{\max} = 0,01564 \mu\text{M} \times \text{s}^{-1}$; $K_M = 53,88707 \mu\text{M}$; $k_{\text{cat}} = 0,005 \text{ s}^{-1}$; katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$) = $0,00009 \text{ s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. Konzentrationen im Assay: PedN = $2,933 \mu\text{M}$; KDH = $13,58 \text{ mU}$.

(B1) Michaelis-Menten Kinetik der PedD-mediierten Acylierungsreaktion von PsyA-ACP₃. Kinetische Daten: $V_{\max} = 0,02454 \mu\text{M} \times \text{s}^{-1}$; $K_M = 1,71134 \mu\text{M}$; $k_{\text{cat}} = 0,044 \text{ s}^{-1}$; katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$) = $0,0257 \text{ s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. Konzentrationen im Assay: PedD = $0,557 \mu\text{M}$; PsyA-ACP₃ = $2,9845 \mu\text{M}$; KDH = $13,58 \text{ mU}$.

(B2) Michaelis-Menten Kinetik der Selbstacylierungsreaktion von PsyA-ACP₃. Kinetische Daten: $V_{\max} = 0,01775 \mu\text{M} \times \text{s}^{-1}$; $K_M = 130,98692 \mu\text{M}$; $k_{\text{cat}} = 0,0059 \text{ s}^{-1}$; katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$) = $0,000045 \text{ s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. Konzentrationen im Assay: PsyA-ACP₃ = $2,9845 \mu\text{M}$; KDH = $13,58 \text{ mU}$.

Aus den Kurven der Abb. 5-30 lassen sich die kinetischen Daten zur Charakterisierung der enzymatischen Reaktion von PedD sowie der Selbstacylierung von PedN und PsyA-ACP₃ bei 10 °C bestimmen. Dabei ergeben sich für die Selbstacylierung von PedN die Werte für K_M von $54 \mu\text{M}$, für k_{cat} von $0,005 \text{ s}^{-1}$ sowie für $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1} = 0,00009 \text{ s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. Für die Selbstacylierung von PsyA-ACP₃ ergibt sich für K_M ein Wert von $131 \mu\text{M}$, für k_{cat} ergibt sich ein Wert von $0,0059 \text{ s}^{-1}$ sowie für $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ ein Wert von $0,000045 \text{ s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. Dementsprechend ergeben sich für die PedD katalysierte

Acylierungsreaktion für PedN die Werte, $K_M = 2,3 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 0,045 \text{ s}^{-1}$ sowie $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1} = 0,019 \text{ s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$ und für PsyA-ACP₃, $K_M = 1,71134 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 0,044 \text{ s}^{-1}$ sowie $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1} = 0,0257 \text{ s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$.

Daraus lassen sich deutliche Unterschiede zwischen der Selbstacylierungsreaktion und der PedD-katalysierten Reaktion erkennen. Während der PedD katalysierten Reaktion ist anzunehmen, dass auch hier eine Selbstacylierungsreaktion des jeweiligen ACP vorhanden ist. Dieses ist in den Parametern der Kinetik nicht berücksichtigt. Jedoch fällt an den Werten k_{cat} und $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ auf, dass man die Werte der Selbstacylierung durchaus von den Werten der PedD katalysierten Reaktion abziehen könnte, ohne dass sich die kinetischen Werte der PedD-katalysierten Reaktion maßgeblich ändern würden. Interessant ist ein Vergleich der Selbstacylierungsreaktion von PsyA-ACP₃ und der Selbstacylierungsreaktion von PedN. Die Selbstacylierungsreaktion von PsyA-ACP₃ erfolgt, aufgrund der Daten aus Abb. 5-30 und die erhaltenen Parameter der Kinetik, langsamer als die von PedN. Solche Unterschiede konnten auch schon bei BryB M7 ACP gezeigt werden, da sie keine Fähigkeit besitzt, eine Selbstacylierung durchzuführen.⁹⁶ Dagegen verhalten sich die PedD-katalysierten Reaktionen nahezu identisch.

Tab. 5-2: Auflistung der erhaltenen kinetischen Daten für PedD sowie Literaturdaten anderer AT zum Vergleich.

Acyltransferase	ACP	K_M [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	$k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ [$\mu\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$]	Quelle
PedD	PedN (RT)	5	0,46	0,091	
	PedN (10 °C)	2,3	0,045	0,019	
	PsyA-ACP ₃ (10 °C)	1,7	0,044	0,025	
BryP AT ₁	BryB M7 ACP	7	0,7	0,1	Lopanik <i>et al.</i> ⁹⁶
FenF	MycA-ACP ₁	110	15	140	Aron <i>et al.</i> ¹⁷⁸
	MycA-ACP ₂	45	17	370	
<i>S. coelicolor</i> MCAT	FAS ACP	60	450	7,50	Szafranska <i>et al.</i> ¹⁷⁹
	<i>E. coli</i> ACP	327	420	1,28	
<i>E. coli</i> MCAT	<i>E. coli</i> ACP	250	1580	6,32	Szafranska <i>et al.</i> ¹⁷⁹

Wie schon erwähnt, sind die kinetischen Daten von PedD zu denen der phylogenetisch nah verwandeten BryP AT₁ sehr gut vergleichbar. Allerdings zeigt sich, wie schon in der Literatur für BryP AT₁ diskutiert,⁹⁶ ein immenser Unterschied zu anderen ATs (vgl. Tab. 5-2) und legt damit nahe, dass PedD eine geringe katalytische Aktivität (Turn over number) besitzt wengleich eine hohe Substratspezifität für Malonyl-CoA **6** vorliegt.

Weitere Analysen an PedD finden momentan in Proteinkristallisationsexperimenten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Groll an der TU München statt. Die Aufklärung der sekundär und tertiär Struktur von PedD könnte detaillierte Informationen über die Funktionsweise und aktive Zentren von PedD aufzeigen.

5.1.4 β -Verzweigungen

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war der enzymatische Weg zur Bildung von β -Verzweigungen in *trans*-AT Polyketide nicht erforscht. Abb. 5-31 zeigt Polyketide, bei denen während der Biosynthese β -Verzweigungen eingeführt werden. Bei diesen β -Verzweigungen kann es sich um verschiedene C2-Einheiten, Methylgruppen oder, wie im Falle des Pederins **20** und Psymberins **21**, eine Exomethylengruppe handeln.

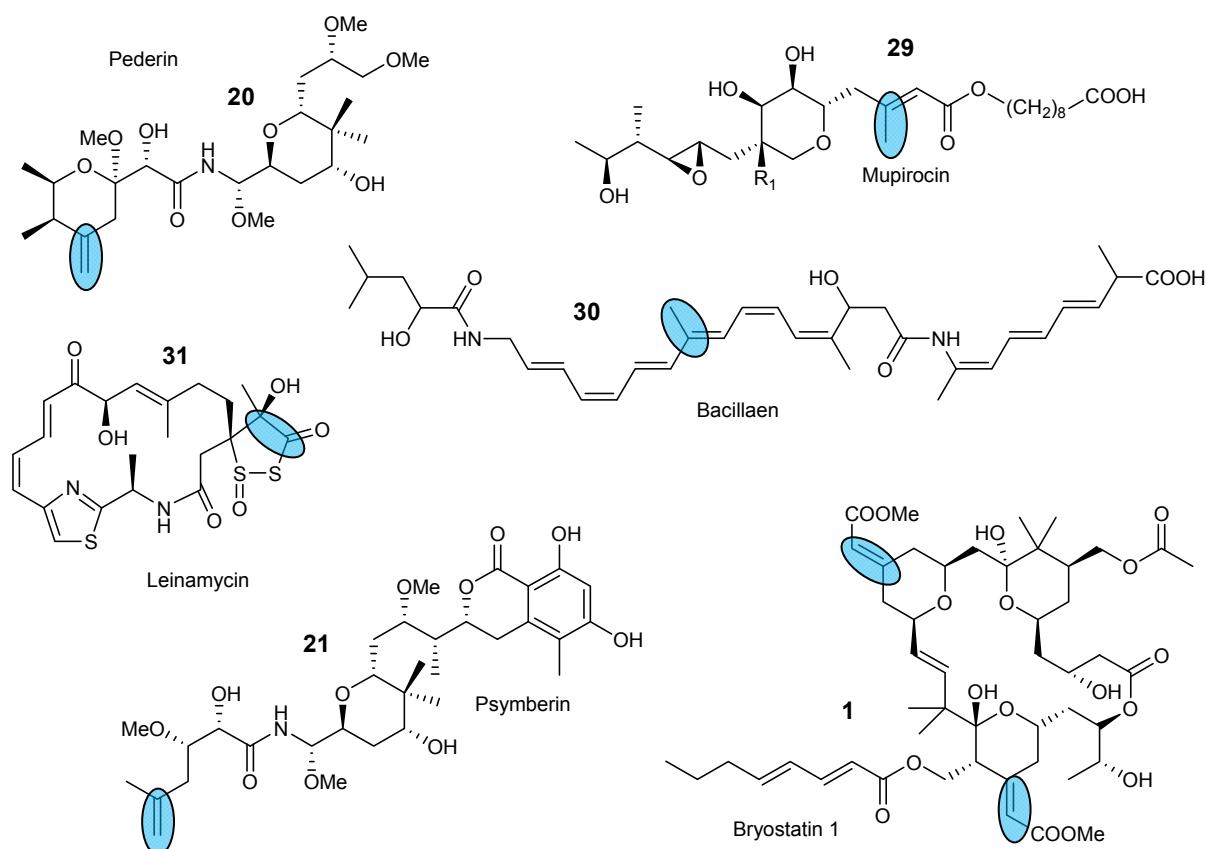


Abb. 5-31: Polyketide, die sich durch β -Verzweigungen in der Struktur auszeichnen. Blau eingekreist sind die β -Verzweigungen.

Chemisch wurde für den Mechanismus zur Einführung einer β -Verzweigung eine GROB-Fragmentierung von β -Hydroxycarbonsäure-Derivaten postuliert,^{51,180} für die verschiedene Enzyme zuständig sein sollten. Dazu gehören die CR, eine monofunktionelle KS, ein ACP sowie ein 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase-ähnliches Enzym (HMGS), die in Biosynthese-Genclustern vorkommen, dessen Metabolite eine β -Verzweigung aufweisen.^{51,80,180} Die Pederin- und Psymberin-PKS stellen eine Ausnahme dar, da sie zusätzlich zu einer externen CR zwei integrierte CR-Domänen im zweiten bzw. dritten Modul besitzen. Die übrigen genannten Enzyme liegen monofunktional codiert und nicht in die PKS-Module integriert vor. Die Katalyse der β -Verzweigung erfolgt vermutlich, indem Malonyl-CoA 6 durch die AT PedD oder PedC auf das ACP PedN übertragen wird und im Folgenden durch die KS PedM decarboxyliert wird (Abb. 5-32). Eine

Kondensationsreaktion kann diese KS nicht mehr durchführen, da im konservierten und katalytisch wichtigen Aminosäuremotiv CSSS anstelle des Cysteins ein Serin vorhanden ist.¹⁸¹ Durch die HMGS PedP wird die Acetylgruppe auf den β -Ketothioester des Polyketidintermediats übertragen. Danach katalysieren die CRs eine Dehydratisierung und Decarboxylierung zur Exomethylengruppe. Der postulierte enzymatische Mechanismus konnte im Laufe der hier durchgeführten Untersuchungen durch zwei Arbeitsgruppen an homologen Proteinen des *pksX*-Genclusters, welches für die Biosynthese des Bacillaen **30** zuständig ist,^{46,53} und für den Gencluster des Curacin A⁵² bestätigt werden.

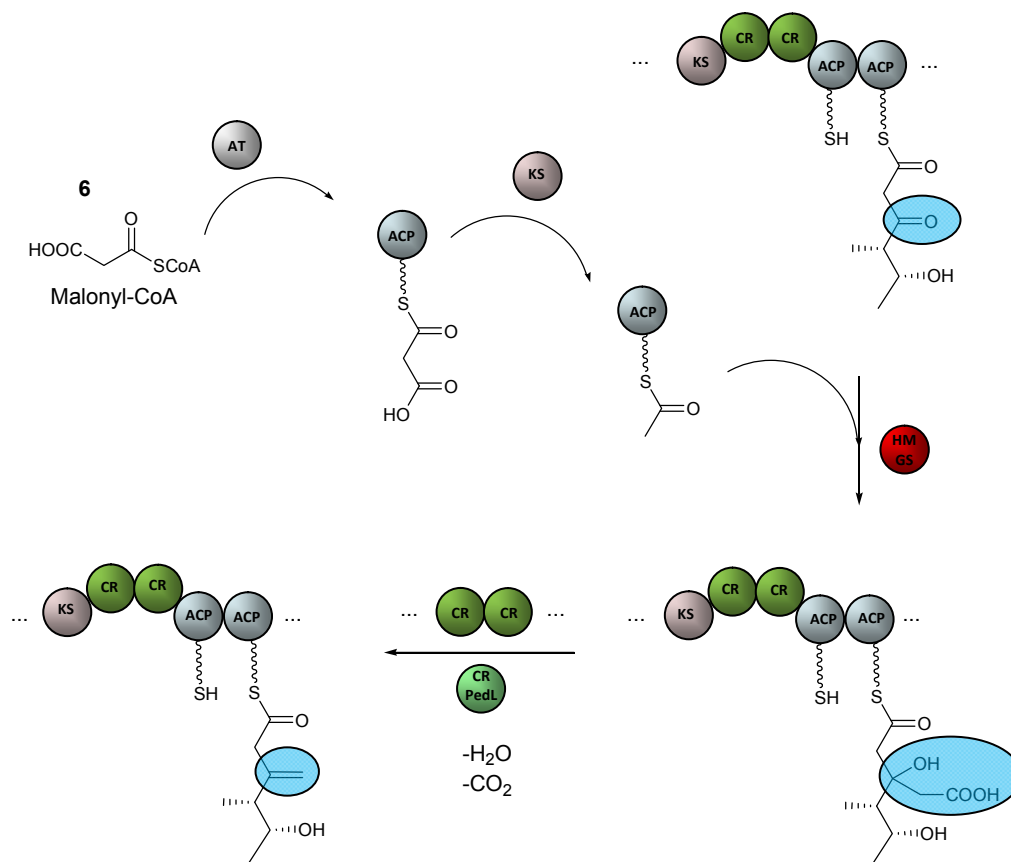


Abb. 5-32: Schematische Darstellung der putativen Biosynthese der Pederin-Exomethylengruppe.

Um diesen Mechanismus für die Biosynthese des Pederin **20** biochemisch zu untersuchen, sollten die beteiligten Enzyme des Pederin-Clusters exprimiert werden und *in vitro*-Assays eingesetzt werden. Da die Exomethylengruppe am dritten Modul von PedI eingeführt wird, ist es zentraler Bestandteil der Untersuchung. Die Expression und Untersuchung von ganzen Modulen konnte durch Untersuchungen am Erythromycin A **2** Biosynthese-Gencluster,^{152,157,182-184} an Modulen der Pikromycin-PKS^{153,185,186} und ebenfalls für Modul PedI3 im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden (vgl. 5.1.1.6 und 5.1.2.2). PedI3 sollte für dessen Funktionalität einen N-terminalen molekularen Linker enthalten. Dies konnte an Studien über Module der Pikromycin-PKS gezeigt werden.^{156,157} Dazu sollten in den Expressionsplasmide der *pedF*-Linker sowie der molekulare Linker von *eryA* N-terminal

an das Modul PedI3 fusioniert werden. Zusätzlich mussten die akzessorisch fungierenden Enzyme exprimiert werden. Dazu gehören die CR PedL, das ACP PedN, die ATs PedC und PedD sowie die HMGS PedP. Die Analytik der erfolgten enzymatischen Reaktionen sollte auf Basis von massenspektroskopischen Analysen des Intermediat beladenen PedI3 erfolgen (Abb. 5-33). Vor der Messung sollte PedI3 proteolytisch verdaut werden, da PedI3 aufgrund der Größe von ca. 160 kDa nicht direkt mittels FT-ICR-MS vermessen werden kann. Die methodische Vorgehensweise konnte an einigen anderen PKS-Systemen bereits untersucht werden.^{160,187}

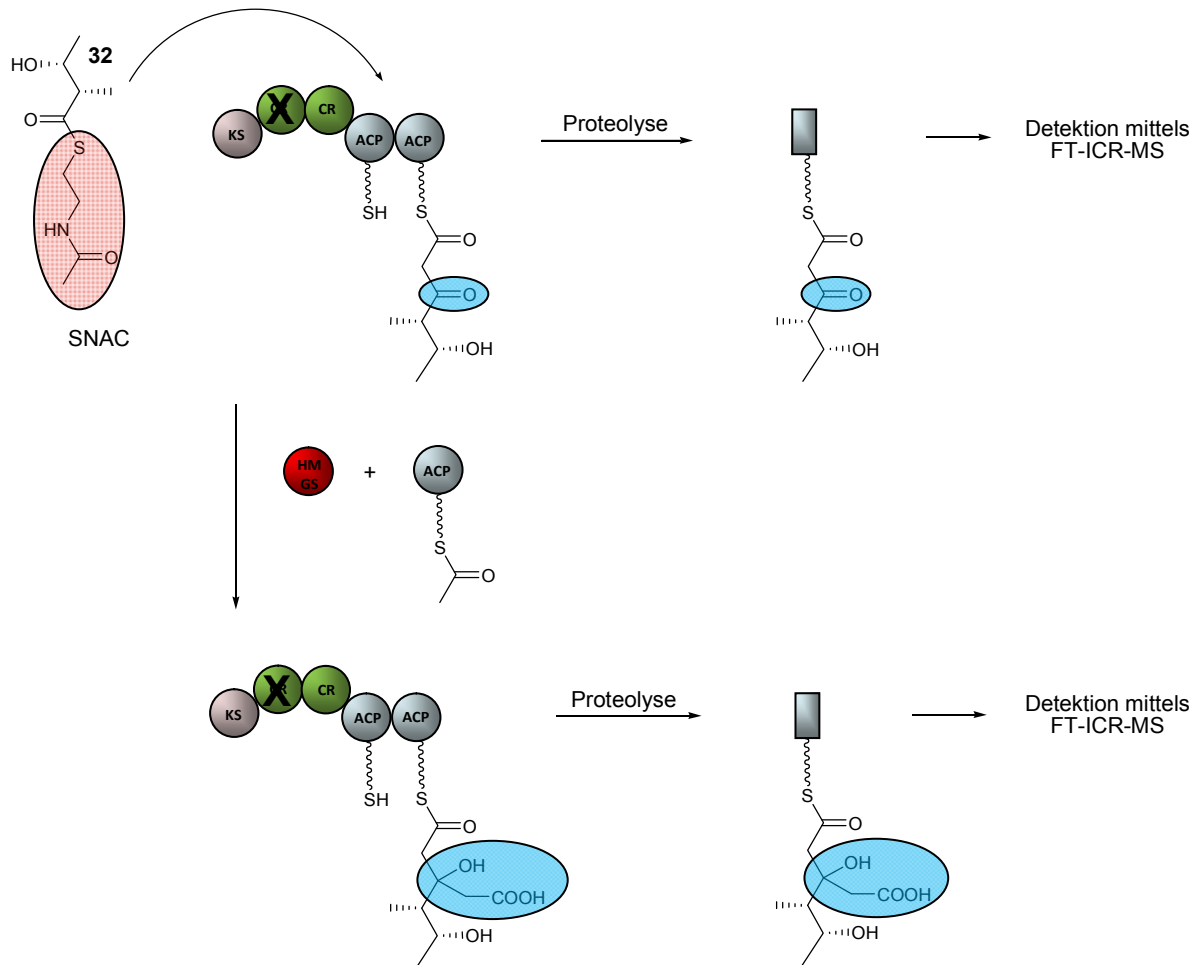


Abb. 5-33: Schematische Darstellung der Methode, die zur Untersuchung der Exomethylengruppen Biosynthese angewendet werden sollte.

Ausser der Einführung der Exomethylengruppe ergaben sich aufgrund der Domänenabfolge im Pederin-Gencluster weitere interessante Fragestellungen. Das dritte Modul von PedI enthält zwei aufeinanderfolgende CR-Domänen sowie zwei aufeinanderfolgende ACPs. In einigen anderen Clustern, dessen Biosyntheseprodukte auch β -Verzweigungen enthalten, existiert nur eine externe CR. Daher war es fraglich, welche Funktion bei der Pederin **20**-Biosynthese drei CRs besitzen, da für die Katalyse der β -Verzweigung eine nicht-modulare CR ausreichen sollte. Bei den zwei aufeinanderfolgenden ACPs ist interessant, welche der ACPs die Intermediate trägt. Bei dem Leinamycin-Cluster konnten bereits Knock-Out Experimente zeigen, dass bei der Doppel-ACP von

LnmJ beide ACPs funktionell sind, jedoch das zweite ACP stärker beladen wird als das erste.¹⁸⁸ Zur Untersuchung der Funktion der verschiedenen CRs und ACPs sollten die jeweiligen CRs und ACPs durch Punktmutationen in den jeweiligen Sequenzen von *pedI3*, die im katalytischen Zentrum der jeweiligen Enzyme lokalisiert sind, ausgeschaltet werden, um über die massenspektrometrischen Daten eine Aussage über die Struktur der proteingebundenen Intermediate zu erhalten, die Rückschlüsse über die Funktion der Proteine zulassen.

5.1.4.1 Klonierung von *pedI3*, *pedL*, *pedN*, *pedM* und *pedP*

Da die Plasmide zur Expression von Modul *pedI3* und dessen Linkerfusionsprodukte bereits in den Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation der PPTase Verwendung fand, ist die Klonierung in diesem Zusammenhang beschrieben (5.1.1.1). Die Plasmide tragen die Bezeichnung pHN10, pHN16, pHN17 und pHN20. Auf den Plasmiden ist zusätzlich die PPTase *svp* kodiert. PedI3 liegt durch die Co-Expression der *svp* in der aktiven *holo*-Form vor. Die Klonierung von *pedC* wurde ebenfalls schon unter 5.1.2.1 beschrieben. Die resultierenden Expressionsplasmide tragen die Bezeichnung pHN38, pHN40 und pHN42. Die Expressionsplasmide der Gene *pedM*, *pedN*, *pedD* und *pedP* wurden von Katrin Zimmermann kloniert und tragen die Bezeichnung pKZ193-1, pKZ124-7, pKZ178-1 und pKZ194-1.⁹¹ Für die Untersuchung der Einführung von β -Verzweigungen fehlte noch ein Expressionsplasmid für die CR *pedL*. Zur Expression wurden die Vektoren pHIS8 und der Vektor pET52b(+) ausgewählt (Abb. 5-34). PedL trägt nach erfolgter Expression im Vektor pHIS8 eine N-terminalen His₈-Tag oder durch die Expression im Vektor pET52b(+) einen N-terminalen Strep-Tag II und C-terminalen His₁₀-Tag. Zur Klonierung wurden spezifische Primer designt (6.5.1.2) und *pedL* mittels PCR (6.5.1) amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels T/A-Klonierung (6.5.14) in den Vektor pBluescript SK(+) ligiert. Die erhaltenen Zwischenprodukte tragen die Bezeichnung pHN29 und pHN30. Die Übertragung vom T/A-Vektor auf den Expressionsvektor erfolgte für den Vektor pET52b(+) über *Sall* sowie für den Vektor pHIS8 mittels *Bam*HI und *Eag*I. Daraus ergeben sich das pET52b(+) basierende Expressionsplasmid pHN31 und das pHIS8 basierende Expressionsplasmid pHN32. Somit standen für alle Proteine Expressionsplasmide, die an der Biosynthese der Exomethylengruppe im Pederin **20** beteiligt sein sollten, zur Verfügung.

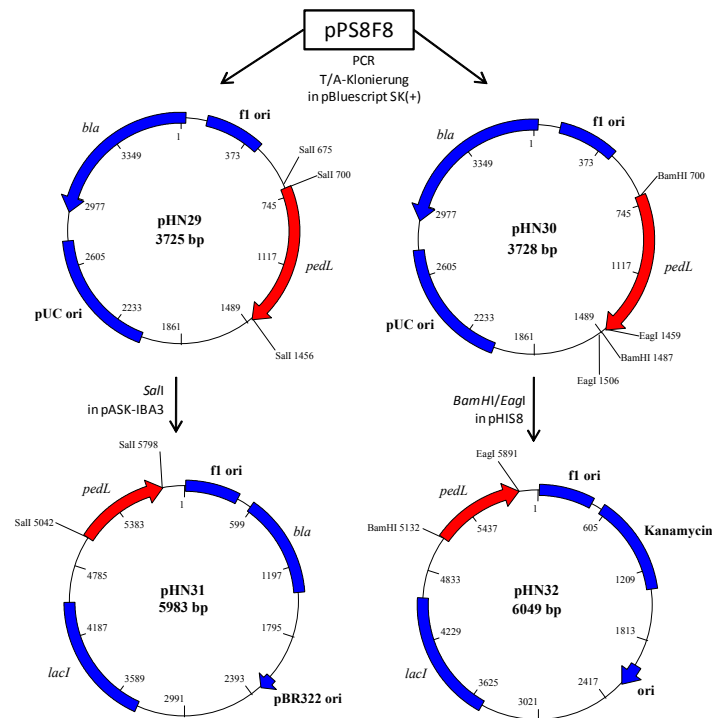


Abb. 5-34: Klonierung der PedL-Expressionsplasmide pHN31 und pHN32. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPS8F8⁸⁰ mittels PCR amplifiziert.

5.1.4.2 Expression von PedI3 und den akzessorischen Proteinen PedL, PedN, PedM und PedP

Nach der erfolgreichen Klonierung der Plasmide konnte die Proteinexpression durchgeführt werden. Die Expression des Moduls PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukte musste nicht mehr auf eine vorhandene Expression getestet werden, da lösliches und aktives Protein bereits unter 5.1.1 und 5.1.2 nachgewiesen werden konnte. Auch die Proteine PedN und PedD lagen bereits aus den Arbeiten von Katrin Zimmermann in löslicher, aktiver Form vor.⁹¹ PedC konnte in den Arbeiten von Katrin Zimmermann⁹¹ in löslicher Form als Fusion mit dem Maltosebindeprotein exprimiert werden und auch in dieser Arbeit als C-terminales Strep-Tag II Fusionsprotein unter Co-Expression von Chaperonen (5.1.2.1) erhalten werden. Jedoch zeigte sich in allen durchgeführten Versuchen keinerlei Aktivität bezüglich einer Malonyl-CoA 6 bzw. Acetyl-CoA 5 Übertragung auf verschiedene ACPs. Daher sollte PedC nicht auf eine Funktion bei der Einführung der Exomethylengruppe im Pederin 20 getestet werden. PedD, die zweite AT, scheint aufgrund der Ergebnisse von Katrin Zimmermann⁹¹ und der hier erhaltenen Ergebnisse (vgl. 5.1.2) die involvierte AT bei der Einführung der Exomethylengruppen zu sein. Sie belädt sowohl die ACPs von PedI3 als auch das ACP PedN.

Bisher nicht exprimierte Proteine waren die Enzyme PedM und PedP. Hier waren zwar Expressionsexperimente durchgeführt worden, jedoch führten diese nicht zu löslichem Protein.⁹¹ Dies konnte aber erfolgreich unter der Co-Expression der Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE in *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 erreicht werden (Abb. 5-35). Expressionsplasmide für die Untersuchung der

Proteinexpression von PedL (pHN31 und 32) wurden in *E. coli* BL21 DE3 transformiert. Die Expression führte allerdings nicht zu löslichem Protein (Daten nicht dargestellt). Wie schon bei PedM und PedP konnte auch PedL durch die Co-Expression von DnaK, DnaJ und GrpE in löslicher Form erhalten werden. Aus der Expression wurde sowohl für das N-terminal His-getagte PedL aus pHN32 wie auch für das N-terminal Strep-getagte und C-terminal His-getagte PedL aus pHN31 lösliches Protein erhalten (Abb. 5-35).

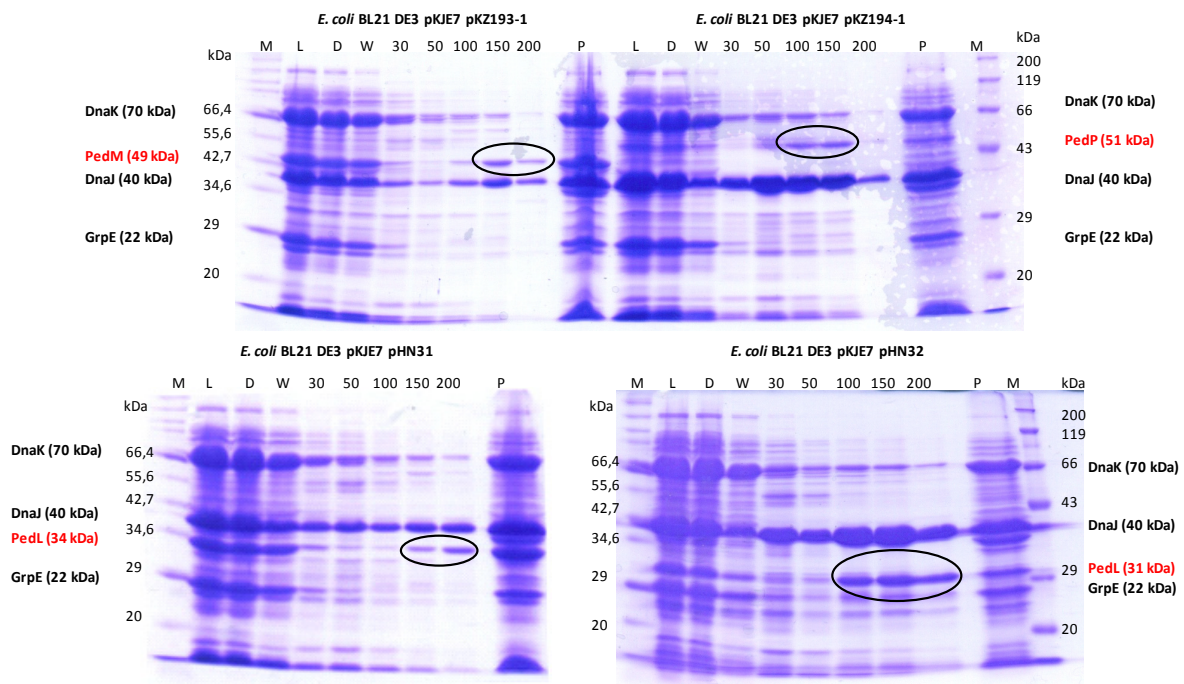


Abb. 5-35: Ergebnisse der Proteinexpressionen von PedM, PedP und PedL.

PedM: *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 pKZ193-1; 200 mL LB (Kn^{50} , Cm^{34}), $0,5 \text{ mg x mL}^{-1}$ Arabinose, $0,5 \text{ mM IPTG}$, 16°C , 16 h

PedP: *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 pKZ194-1; 200 mL LB (Kn^{50} , Cm^{34}), $0,5 \text{ mg x mL}^{-1}$ Arabinose, $0,5 \text{ mM IPTG}$, 16°C , 16 h

PedL: *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 pHN31; 200 mL LB (Kn^{50} , Cm^{34}), $0,5 \text{ mg x mL}^{-1}$ Arabinose, $0,5 \text{ mM IPTG}$, 16°C , 16 h

PedL: *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 pHN32; 200 mL LB (Kn^{50} , Cm^{34}), $0,5 \text{ mg x mL}^{-1}$ Arabinose, $0,5 \text{ mM IPTG}$, 16°C , 16 h

M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, 30 = 30 mM Imidazol Elutionsfraktion, 50 = 50 mM Imidazol Elutionsfraktion, 100 = 100mM Elutionsfraktion, 150 = 150 mM Imidazol Elutionsfraktion, 200 = 200 mM Imidazol Elutionsfraktion, P = Pellet; SDS-PAGE (Trenngel): 12 %.

Nach diesen Experimenten standen alle Proteine für den Enzymassay zur Verfügung. Wichtig für einen erfolgreichen Assay waren zusätzlich die Nachweise der vorhandenen Phosphopantetheinylierung durch die co-exprimierte Svp. Der Nachweis konnte sowohl für PedN⁹¹ als auch PedI3 (5.1.2.2) erbracht werden. Für PedI3 war der massenspektroskopische Nachweis nicht erfolgreich (5.1.1.8), jedoch konnte indirekt über eine erfolgreiche Substratübertragung dieser Nachweis erbracht werden. Das Ergebnis bestätigt noch nicht die Phosphopantetheinylierung an beiden ACPs von PedI3. Unter dem Gesichtspunkt, dass an dem exprimierten Doppel-ACP von PedI3 durch die co-exprimierte Svp jedoch beide ACPs phosphopantetheinyliert wurden⁹¹ sollte diese Reaktion auch an dem kompletten Modul PedI3 erfolgen. Weiterhin war im Vorfeld wichtig, die Aktivität der AT PedD und somit die erfolgreiche Substratübertragung auf PedI3 und PedN zu

überprüfen. Dies wurde ebenfalls unter 5.1.2.2 bzw. für PedN durch Katrin Zimmermann anhand von Radioaktivitätsassays durchgeführt.⁹¹

Die weiteren Enzyme (CR, monofunktionelle KS und HMGS) sollten funktionell in den Assays untersucht werden. Aus den Proteinexpressionen wurde klar, dass einige Aufreinigungen durch Chaperone verunreinigt waren, jedoch sollte dies kein Grund für eine fehlende Funktionalität der Proteine sein. An PedI3 konnte schon die Funktionalität des Moduls trotz der vorhandenen Chaperone gezeigt werden (5.1.2.2). Das postulierte Pederin-Intermediat **32** (Abb. 5-33) war ebenfalls durch eine Synthese von Jana Moldenhauer vorhanden.¹⁸⁹ Es wurde an ein *N*-Acetylcysteamin (SNAC) gekoppelt, wodurch eine ACP-Bindung imitiert wird und eine folgende Übertragung auf PedI3 ermöglicht wird. Diese Methode konnte bereits erfolgreich zur Untersuchung von Polyketidbiosyntheseschritten angewendet werden.^{168,190} Jedoch muss eine Analytik der enzymatischen Reaktionsprodukte möglich sein. Bei der Betrachtung der vorherigen Ergebnisse scheinen hier große Probleme zu liegen. Die Expressionen von PedI3 (5.1.1.6), PedM, PedP und PedL weisen große Konzentrationen an Chaperon-Verunreinigungen auf, die auch durch verschiedene Aufreinigungsmethoden nicht entfernt werden konnten (5.1.8). Die analytische Methode beruht darauf, dass die Probe nach dem Assay proteolytisch verdaut wird und die entstehenden Proteinfragmente massenanalytisch (ESI-FT-ICR-MS) untersucht werden. Aus den Massedaten sollte im Folgenden das Proteinfragment selektiert werden, welches mit dem Intermediat beladen ist. In einer Veröffentlichung von Dorrestein *et al.* wurde beschrieben, dass zur Detektion von Intermediat-beladenen PKS-Proteinfragmenten eine Probe benötigt wird, die eine Reinheit von >80 bis 90 % haben muss.¹⁶⁰ Dieses kann aufgrund der bisher erzielten Expressionsergebnisse und Aufreinigungsmethoden (5.1.8) nicht erzielt werden, da in den meisten Fällen eine Chaperon Co-Expression durchgeführt werden musste, um lösliches Protein zu erhalten. Die Möglichkeit der Detektion über einen tryptischen In-Gel Verdau mit folgender MALDI-TOF Messung ist ebenfalls nicht geeignet, da diese Methode schon bei der Detektion der Phosphopantetheinylierung (5.1.1.8) an PedI3 nicht erfolgreich war. Dies wäre eine Möglichkeit gewesen, nicht mit Chaperon-Protein verunreinigtes Protein zu erhalten. Daher erfordert die Expression und Aufreinigung der Proteine sowie die analytische Methode eine intensive und zeitaufwändige Optimierung, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde. Zusätzlich wurde während der Experimente der enzymatische Mechanismus der Einführung von β -Verzweigungen in *trans*-AT Polyketide am *pksX*-Cluster und an der Curacin A Biosynthese bereits aufgeklärt.^{52,53}

Diese Experimente bleiben dennoch interessant, da bisher nicht geklärt ist, welche Funktion die Doppel-CR Domäne im Modul PedI3 besitzt und welche Funktion das Doppel-ACP von PedI3 ausübt. Zur Aufklärung dieser Doppelmodule wäre es jedoch notwendig gewesen, dass die beschriebenen

Aufreinigungsprobleme beseitigt worden wären und zusätzlich hätten Punktmutationen in die jeweiligen Domänen von Ped13 eingeführt werden müssen. Aufgrund dieser zeitaufwändigen Optimierungs- und Klonierungsaufgabe wurde diese Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr begonnen.

5.1.5 α -Hydroxylierungen

Einige Polyketide der Pederinfamilie werden durch α -Hydroxylierungen funktionalisiert (Abb. 5-36). Auf Basis der üblichen enzymatischen Mechanismen von Polyketidsynthasen ist die Einführung dieser Hydroxygruppen nicht möglich. Daher sollten in den Genclustern Enzyme vorhanden sein, die die Fähigkeit besitzen, die Hydroxylierung durchzuführen. PSI-BLAST(Position-specific Iterated-Basic Local Alignment Search)-Analysen sagen für PsyC des Psymberein-Clusters und den homologen Proteinen des Pederin-Clusters (PedK) bzw. für Onnamid A **22** (OnnE und OnnF) eine entfernte Verwandtschaft zu Phytanoyl-CoA Dioxygenasen voraus. Diese gehören zu den Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängigen α -Hydroxylasen. Charakteristisch für diese Enzyme ist das Fe(II) bindende Aminosäuremotiv His¹-X-Asp/Glu-X_n-His².⁹⁸ In einem Alignment (Anhang, 9.4, Abb. 9-16) mit den Phytanoyl-CoA Dioxygenasen, die entsprechend den PSI-Blast Analysen die größte Ähnlichkeit mit PsyC, OnnE, OnnF und PedK zeigen, kann dieses Aminosäuremotiv nachgewiesen werden. Eine weitere charakteristische AS (Arg/Lys) ist 11 bis 12 AS downstream von His² lokalisiert. Diese übernimmt eine Stabilisierung des α -Ketoglutarat an C-5.⁹⁸ Die erhaltenen Homologien legen nahe, dass PsyC und dessen Homologe für die Einführung der α -Hydroxylierung verantwortlich sind. Ein weiterer Hinweis ist, dass Onnamid A **22** während der Biosynthese an drei statt zwei Stellen α -hydroxyliert werden sollte. Der Biosynthese-Gencluster enthält mit *onnE* und *onnF* zwei Gene, die Homologien zu Phytanoyl-CoA Dioxygenasegenen zeigen.

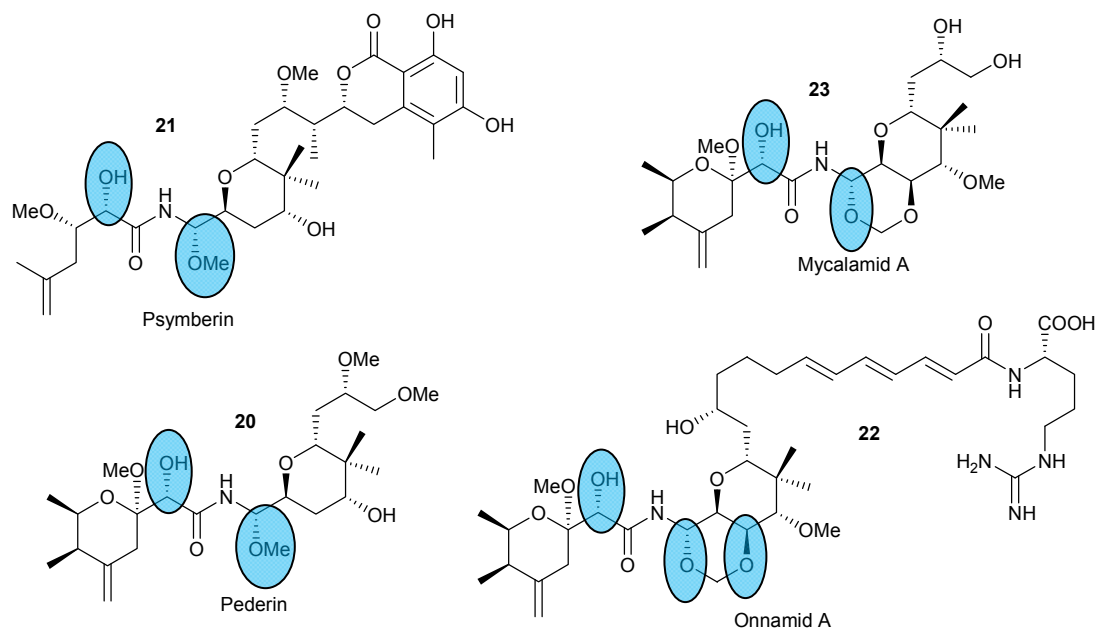


Abb. 5-36: α -hydroxylierte Polyketide der Pederinfamilie. Die α -Hydroxylierungen werden wahrscheinlich durch Fe(II)/ α -Ketoglutarat abhängige Hydroxylasen und FAD-abhängige Oxidoreductasen eingeführt.

Die folgende Tabelle fasst die aus dem Alignment (Anhang, 9.4, Abb. 9-16) erhaltenen Daten zusammen. Bei einem Vergleich mit der Literatur ergeben sich starke Ähnlichkeiten zu bereits charakterisierten Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängigen α -Hydroxylasen bezüglich der Metall-Liganden und der α -Ketoglutarat C-5 Stabilisierung.

Tab. 5-3: Darstellung der aus dem Alignment (Anhang, Abb. 9-16) extrahierten hypothetischen Metall-Liganden und α -Ketoglutarat stabilisierende Aminosäuren für PsyC, PedK, OnnE und OnnF sowie den über PSI-Blast gefundenen homologen Phytanoyl-CoA Dioxygenasen.

Enzym	Ligand 1	Ligand 2	Spacing	Ligand 3	Spacing	α -KG C-5 Stabilisierung
PsyC	His (142)	Asp (144)	128	His (272)	12	Arg (284)
PedK	His (118)	Asp (120)	127	His (247)	12	Arg (259)
OnnE	His (141)	Asp (143)	129	His (272)	12	Arg(284)
OnnF	His (141)	Asp (143)	127	His (270)	12	Arg (282)
Phytanoyl-CoA Dioxygenase <i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2	His (121)	Asp (123)	84	His (207)	12	Arg (219)
Phytanoyl-CoA Dioxygenase <i>gamma</i> <i>Proteobacterium</i> NOR5-3	His (107)	Asp (109)	69	His (178)	11	Arg (189)
Phytanoyl-CoA Dioxygenase <i>Sulfuворum</i> sp. NBC37-1	His (135)	Asp (137)	83	His (220)	11	Lys (231)

Um die α -hydroxylierende Funktion der Enzyme auch biochemisch nachzuweisen, wurde PsyC ausgewählt, um es heterolog zu exprimieren, aufzureinigen und in *in vitro*-Bioassays einzusetzen. Als Substrate sollten die postulierten Intermediate, an der die α -Hydroxylierung eingeführt werden sollte, als SNAC-Derivate und CoA-Derivate synthetisiert werden.¹⁹¹ An anderen Enzymen der Polyketidbiosynthese konnte bereits gezeigt werden, dass SNAC-Derivate als Analoga zu den nativen

Substraten akzeptiert werden.^{168,190} Zusätzlich sollte das ACP PsyA-ACP₃ exprimiert werden, da die α -Hydroxylierung am Intermediat dieses ACP erfolgen sollte. Falls keine Umsetzung mit den SNAC- und CoA-Substraten erfolgt, besteht die Möglichkeit, die SNAC- bzw. CoA-Derivate auf das ACP mit Hilfe der Sfp zu übertragen. Dadurch kann der native Zustand besser imitiert werden und PsyC das Substrate erkennen und umsetzen. Die Analytik der Assays kann über massenspektroskopische Nachweise erfolgen. Die SNAC- und CoA-Derivate können über LC-MS Messungen nachgewiesen werden und im Falle von ACP-gebundenen Intermediaten sollten FT-ICR-MS Messungen eine Analyse der enzymatischen Assays ermöglichen.

Zusätzlich zu den *in vitro* Assays und der damit verbundenen biosynthetischen Charakterisierung sollte der Co-Faktor identifiziert werden. Fotometrische Messungen und ICP-OES Messungen wurden hierzu angewendet.

Ein weiterer Kandidat für die Einführung einer α -Hydroxylierung in Psymberin **21** ist die FAD-abhängige Oxidoreduktase PsyK. Gleiches gilt für die homologen Proteine der Pederin-Biosynthese (PedJ) und der Onnamid A **22**-Biosynthese (OnnC). Sie haben große Ähnlichkeit zu einer Oxygenasedomäne aus der Myxothiazol-Biosynthese, die eine Hydroxylierung an einem Glycinrest durchführt.⁹⁹ Eine analoge α -Hydroxylierung ist auch bei der Psymberin **21**-Biosynthese durch PsyK denkbar. Daher wurde PsyK ebenfalls für die biochemische Charakterisierung kloniert und exprimiert.

5.1.5.1 Klonierung von PsyC und PsyK

Zur heterologen Expression von PsyC und PsyK wurden die Expressionsvektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5 sowie der Vektor pHIS8 verwendet (Abb. 5-37 und Abb. 5-38). *psyC* wurde zusätzlich in den Vektor pET52b(+) und pET-Sumo kloniert (Abb. 5-37). Wie schon erwähnt, sind somit Flexibilitäten bezüglich des Aufreinigungs-Tags sowie bei der Regulation der Expression gegeben. Die Gene wurden mittels PCR (6.5.1) und spezifischen Primern (Tab. 6-11) amplifiziert und durch eine T/A-Klonierung (6.5.14) in den Vektor pBluescript SK(+) zwischenkloniert. Dabei entstanden für *psyC* die Plasmide pHN49, pHN51, pHN71 und pHN73. Für den Zielvektor pET-Sumo wurde kein Zwischenproduktplasmid kloniert, da das PCR-Produkt direkt in den Expressionsvektor T/A-kloniert wurde. Dieser wurde mit pHN79 bezeichnet. Für PsyK entstanden die Zwischenproduktplasmide pHN53, pHN55 und pHN57. Die Übertragung vom Vektor pBluscript SK(+) auf den Expressionsvektor erfolgte durch Restriktion (6.5.6) mit anschließender Reinigung und einer Ligation in den Expressionsvektor (6.5.11). Die fertiggestellten Expressionsplasmide tragen für PsyC die Bezeichnung pHN50 (in pHIS8), pHN52 (in pET52b(+)), pHN72 (in pASK-IBA3), pHN74 (in pASK-IBA5) und pHN79 (in pET-Sumo) sowie für PsyK pHN54 (in pASK-IBA3), pHN56 (in pASK-IBA5) und pHN58 (in pHIS8). Die

zum Transfer der Gene vom Lagerungsvektor auf den Expressionsvektor genutzten Restriktionsenzyme sind in Tab. 6-23 aufgeführt.

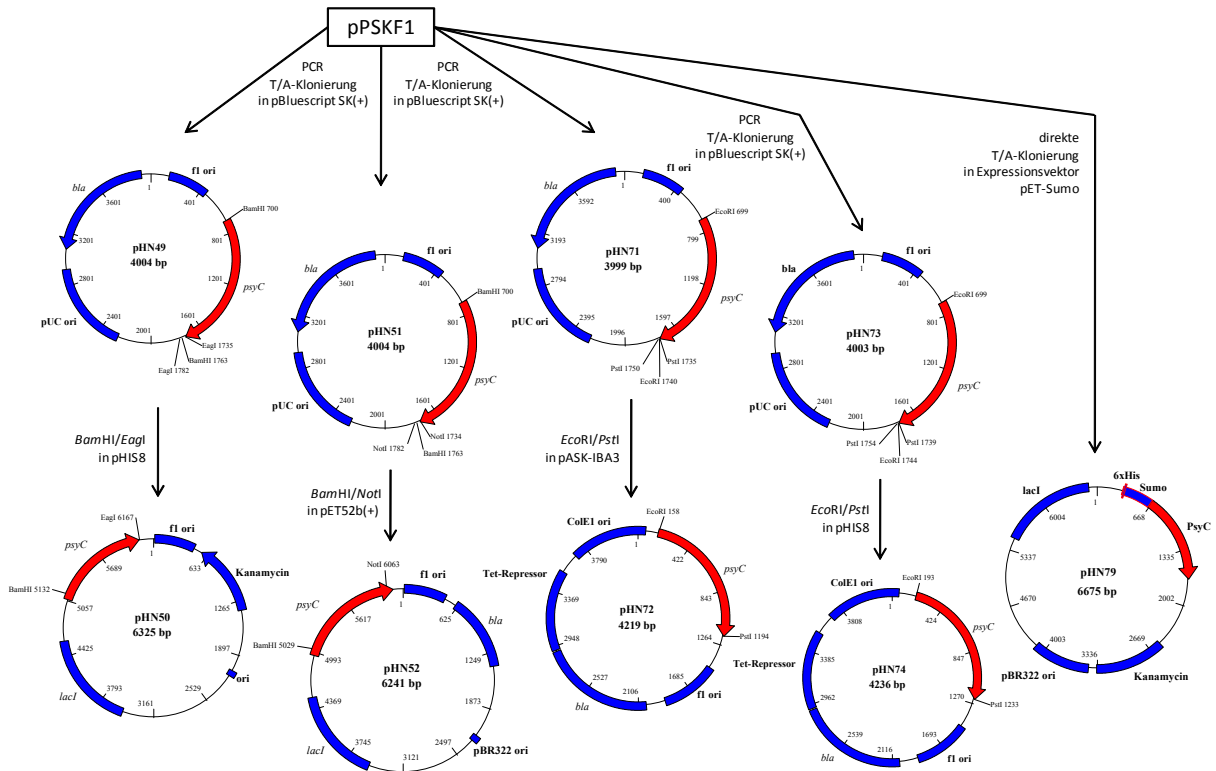


Abb. 5-37: Klonierung der PsyC-Expressionsplasmide pHN50, pHN52, pHN72, pHN74 und pHN79. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPSKF1⁶¹ mittels PCR amplifiziert.

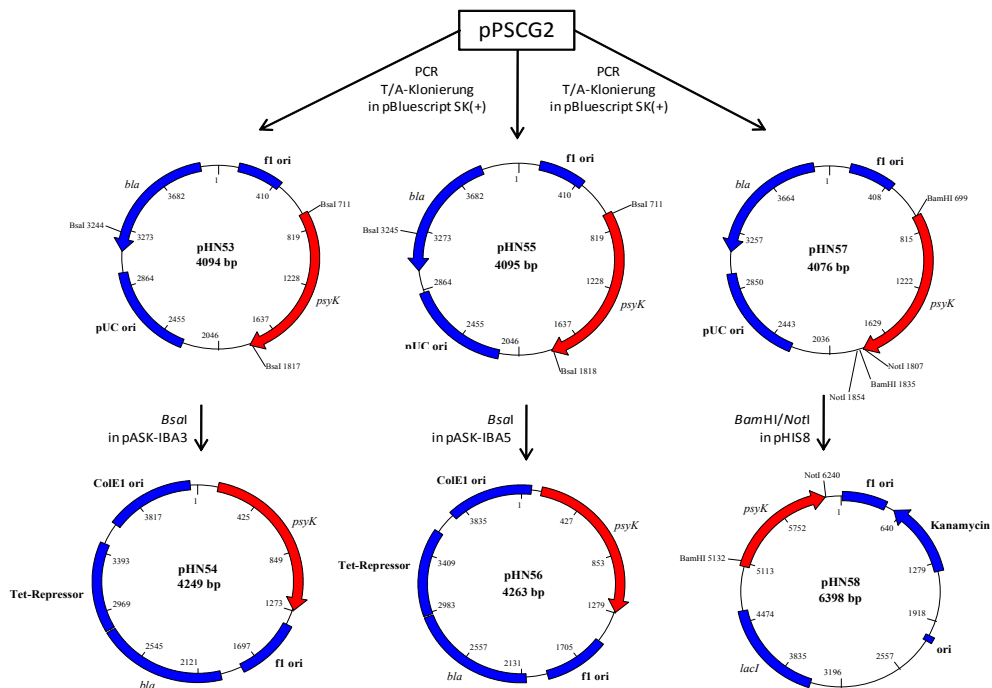


Abb. 5-38: Klonierung der PsyK-Expressionsplasmide pHN54, pHN56 und pHN58. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPSCG2⁶¹ mittels PCR amplifiziert.

Das ACP *psyA*-ACP₃ und die PPTase *sfp* standen bereits über das Plasmid pHN60 (Klonierung unter 5.1.1.3) sowie das Plasmid pET-*sfp* (vgl. Abb. 5-43) zur Verfügung.

5.1.5.2 Expression von PsyC und PsyK

Zur Expression von PsyC wurden die Plasmide Bezeichnung pHN50, pHN52, pHN72 und pHN74 (in pASK-IBA5) in *E. coli* BL21 DE3 transformiert. Jedoch führten alle Expressionen zu unlöslichem Protein im Zellpellet (Daten nicht dargestellt). Auch aufgrund unterschiedlicher Temperaturen und verschiedenen Induktionsstärken konnte keine Verbesserung erzielt werden. Daraufhin wurde das Plasmid pHN50, welches die qualitativ höchsten Konzentrationen an PsyC im Pellet zeigte, unter Co-Expression der verschiedenen Chaperone exprimiert (Abb. 5-39). Außerdem wurde eine Fusion von PsyC mit dem Sumo-Löslichkeits-Tag über pHN79 exprimiert (Abb. 5-39).

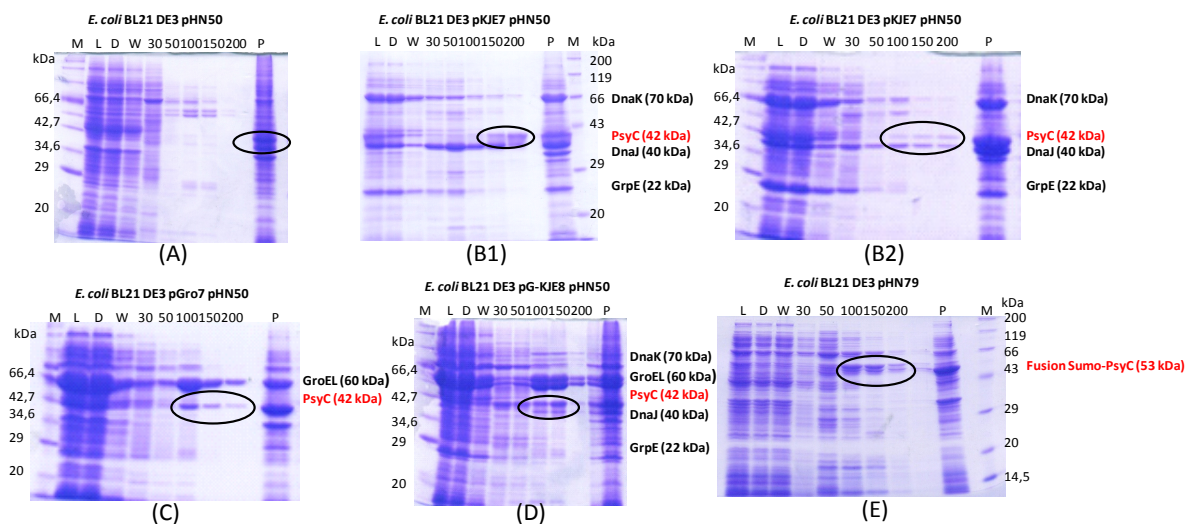


Abb. 5-39: Proteingel der verschiedenen Expressionen von PsyC unter Co-Expression verschiedener Chaperone sowie der Expression fusioniert mit dem Sumo-Löslichkeits-Tag.

(A) *E. coli* BL21 DE3 pHN50; 200 mL LB (Kn⁵⁰); 0,5 mM IPTG; 16 °C; 16 h.

(B1) *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 pHN50; 200 mL LB (Kn⁵⁰, Cm³⁴); 0,5 mg x mL⁻¹ Arabinose; 0,5 mM IPTG; 16 °C; 16 h.

(B2) *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 pHN50; 200 mL LB (Kn⁵⁰, Cm³⁴); 0,5mg x mL⁻¹ Arabinose; 0,5 mM IPTG; 16 °C; 10 h.

(C) *E. coli* BL21 DE3 pGro7 pHN50; 200 mL LB (Kn⁵⁰, Cm³⁴); 0,5 mg x mL⁻¹ Arabinose; 0,5 mM IPTG; 16 °C, 16 h.

(D) *E. coli* BL21 DE3 pG-KJE8 pHN50; 200 mL LB (Kn⁵⁰, Cm³⁴); 0,5 mg x mL⁻¹ Arabinose; 0,5 mM IPTG; 16 °C, 16 h.

(E) *E. coli* BL21 DE3 pHN79; 200 mL LB (Kn⁵⁰); 0,5 mM IPTG; 16 °C; 16 h.

(A-E) Affinitätschromatographische Aufreinigung entsprechend 6.6.5.

M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, 30 = 30 mM Imidazol Elutionsfraktion, 50 = 50 mM Imidazol Elutionsfraktion, 100 = 100mM Elutionsfraktion, 150 = 150 mM Imidazol Elutionsfraktion, 200 = 200 mM Imidazol Elutionsfraktion, P = Pellet.

Die Kultivierungen zeigten, dass ohne Co-Expression der Chaperone kein lösliches Protein isoliert werden konnte (Abb. 5-39, (A)), wogegen unter Co-Expression der Chaperone lösliches Protein vorhanden war (Abb. 5-39, (B1 bis E)). Die höchsten Konzentrationen wurden dabei unter der Co-Expression der Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE über das Plasmid pKJE7 (Abb. 5-39, (B1 und B2))

sowie unter der Co-Expression der Chaperone GroEL und GroES über das Plasmid pGro7 (Abb. 5-39, (C)) erhalten werden. Insgesamt liegen die Konzentrationen dennoch relativ niedrig und liegen pro Elutionsfraktion zwischen 0,01 und 0,07 mg x mL⁻¹ (bestimmt über 6.6.10.2). Für die weiteren Analysen zeigte sich jedoch, dass die Elutionsfraktionen von PsyC wiederum stark durch Chaperone verunreinigt war. Eine weitere Aufreinigung war schwierig bis gar nicht möglich (vgl. 5.1.8). Für die Enzymassays sollte dies kein Problem darstellen, da Ped13 bereits Aktivität zeigte, obwohl auch hier Chaperon-Kontaminationen vorlagen (vgl. 5.1.2). Jedoch sollte für die Detektion des Co-Faktors möglichst reines Protein vorhanden sein. Hierfür wurde versucht PsyC ohne Co-Expression von Chaperonen über eine löslichkeitsfördernden Tag zu exprimieren. Dazu wurde *psyC* in den Vektor pET-Sumo kloniert (pHN79) und in *E. coli* BL21 DE3 exprimiert. Nach der Expression sollte PsyC fusioniert mit dem Smt3-Protein (11 kDa) aus *Saccharomyces cerevisiae*, einem Homologen zum Säugetier Protein SUMO-1,¹⁹² vorliegen. Der Löslichkeit mediierende Tag kann durch spezifische Cystein-Proteasen abgespalten werden,^{193,194} wonach PsyC als natives Protein vorliegt. Tatsächlich zeigten die Elutionsfraktionen exprimiertes, mit dem SUMO-Tag fusioniertes PsyC (Abb. 5-39, (E)). Auch die Verunreinigungen fallen wesentlich geringer aus als unter der Co-Expression der Chaperone. Lediglich die Konzentrationen von PsyC liegen in den gleichen Konzentrationsbereichen wie unter der Co-Expression von Chaperonen und konnte daher nicht gesteigert werden.

Zur Expression von PsyK wurden die Plasmide pHN54, pHN56 und pHN58 in *E. coli* BL21 DE3 transformiert und auf vorhandene Expression getestet (Abb. 5-40).

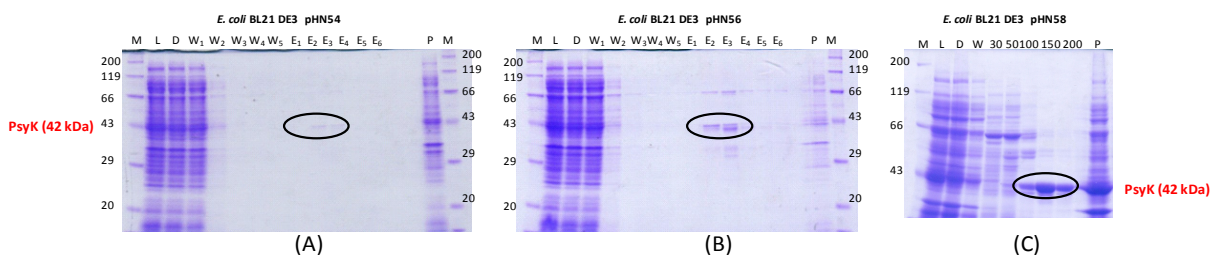


Abb. 5-40: SDS-PAGE der Proteinexpressionen von PsyK.

(A) *E. coli* BL21 DE3 pHN54; 200 mL LB (Amp¹⁰⁰); 0,2 mg x mL⁻¹ Anhydrotetracyclin; 16 °C; 14 h. Aufreinigung 6.6.6.

(B) *E. coli* BL21 DE3 pHN56; 200 mL LB (Amp¹⁰⁰); 0,2 mg x mL⁻¹ Anhydrotetracyclin; 16 °C; 14 h. Aufreinigung 6.6.6.

(C) *E. coli* BL21 DE3 pHN58; 200 mL LB (Kn⁵⁰); 0,5 mM IPTG; 16 °C; 14 h. Aufreinigung 6.6.5.

(A) und (B) M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W₁ bis W₅ = Waschfraktionen 1 bis 5, E₁ bis E₆ = Elutionsfraktionen 1 bis 6, P = Pellet. (C) M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, 30 = 30 mM Imidazol Elutionsfraktion, 50 = 50 mM Imidazol Elutionsfraktion, 100 = 100mM Elutionsfraktion, 150 = 150 mM Imidazol Elutionsfraktion, 200 = 200 mM Imidazol Elutionsfraktion, P = Pellet; SDS-PAGE (Trenngel): 12 %.

Die Ergebnisse der Expressionen zeigten jeweils lösliches Protein in den Elutionsfraktionen. PsyK konnte sowohl als N-terminal und C-terminal getagtes Strep-Tag II Fusionsprotein (Abb. 5-40, (A) und (B)) exprimiert werden als auch als N-Terminal getagtes Octahistidyl-Fusionsprotein (Abb. 5-40, (C)). Die Unterschiede in den erhaltenen Proteinkonzentrationen ergeben sich aus den verwendeten

Promotoren. Die Expression der Strep-Tag II Fusionsproteine wird über das Tet-Operon reguliert und das Octahistidyl-Fusionsprotein über den T7-Promotor.

5.1.5.3 α -Hydroxylierungsassays

Aus den Expressionen aus 5.1.5.2 und 5.1.1.3 standen die Enzyme PsyC und PsyK sowie PsyA-ACP₃ (5.1.1.7) für die Enzymassays zur Verfügung. Die benötigten Substrate, die in Form von SNAC-Derivaten und CoA-Derivaten in der Diplomarbeit¹⁹¹ von Julia Katschmarek hergestellt werden sollten, sind in der folgenden Abbildung zusammengestellt (Abb. 5-41). Als Grundlage für die Strukturen diente dabei das Psymberin-Intermediat des dritten Moduls von PsyA, da die α -Hydroxylierung wahrscheinlich während der Polyketid-Biosynthese an diesem Intermediat vollzogen wird (nicht veröffentlicht, vgl. Abb. 3-15). In Abb. 5-41 stellt das SNAC-Derivat **35** und der CoA-Ester **36** das putative Intermediat von Modul drei von PsyA dar. Das SNAC-Derivat **33** und CoA-Derivat **34** sind vereinfachte Testsubstrate, die ebenfalls auf eine Umsetzung getestet werden sollten.

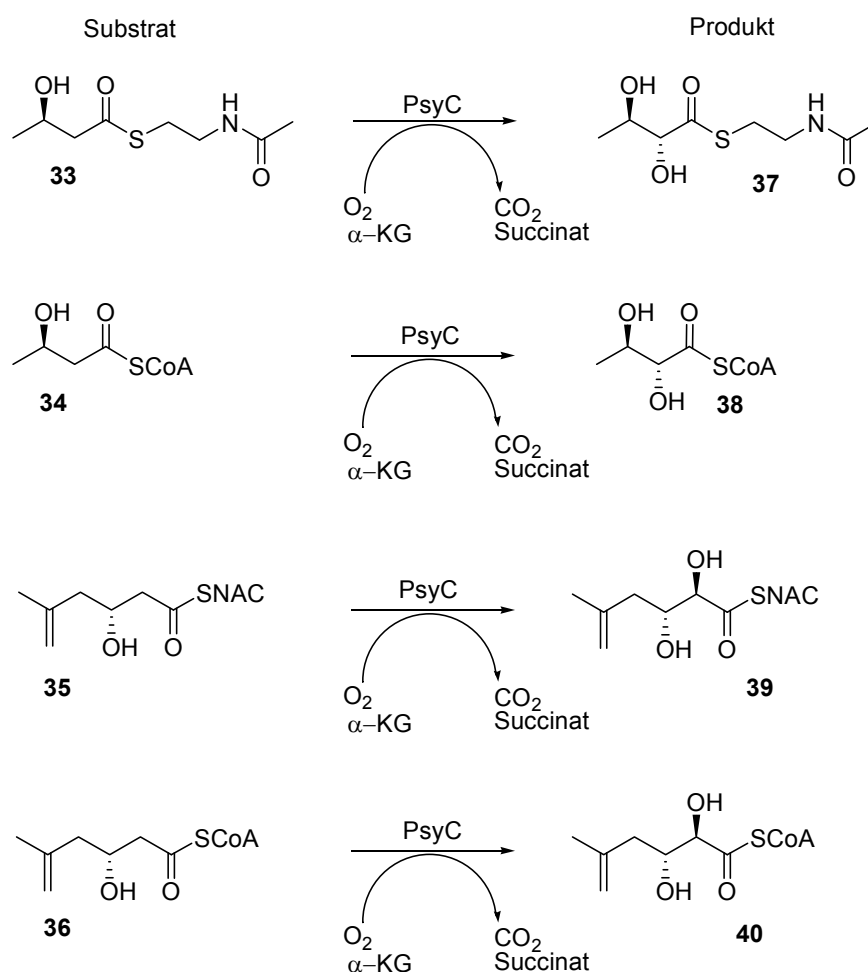


Abb. 5-41: Substrate für den α -Hydroxylierungsassay sowie die postulierten enzymatischen Reaktionen von PsyC.

Das erfolgreich synthetisierte SNAC-Derivat **33**¹⁹¹ konnte im Folgenden für Enzym Assays verwendet werden. Die Substrate **34**, **35** und **36** konnten nicht verwendet werden, da die Synthese in der Bearbeitungszeit der vorliegenden Arbeit nicht bis zur letzten Synthesestufe erfolgreich waren. Der Assay wurde in Anlehnung an die Literatur¹⁹⁵ durchgeführt (6.7.3.1) und beruht auf Enzymreaktionen, die bereits an Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängigen α -Hydroxylasen durchgeführt wurden. Da für PsyC diese Funktion postuliert wurde, waren die Assaybedingungen vielversprechend. Nach dem Assay wurden die Proben mittels LC-MS analysiert. Hierzu wurde der α -Hydroxylierungsassay mit dem SNAC-Derivat **33** und gereinigtem PsyC durchgeführt, die Substanzen extrahiert und vermessen (Abb. 5-42, (3 a-d)). Dabei wurden in die Chromatogramme, über das Programm Data Analysis 4.0, Massenspuren gelegt, sodass die Massen von Interesse gegenüber den insgesamt erhaltenen Massen in Abhängigkeit von der Retentionszeit extrahiert wurden. Zusätzlich wurden zwei Negativkontrollen parallel und unter identischen Bedingungen durchgeführt. Einerseits wurde der Assay ohne PsyC durchgeführt (Abb. 5-42, (2 a-d)) und andererseits ohne Substrat (Abb. 5-42, (1 a-d)).

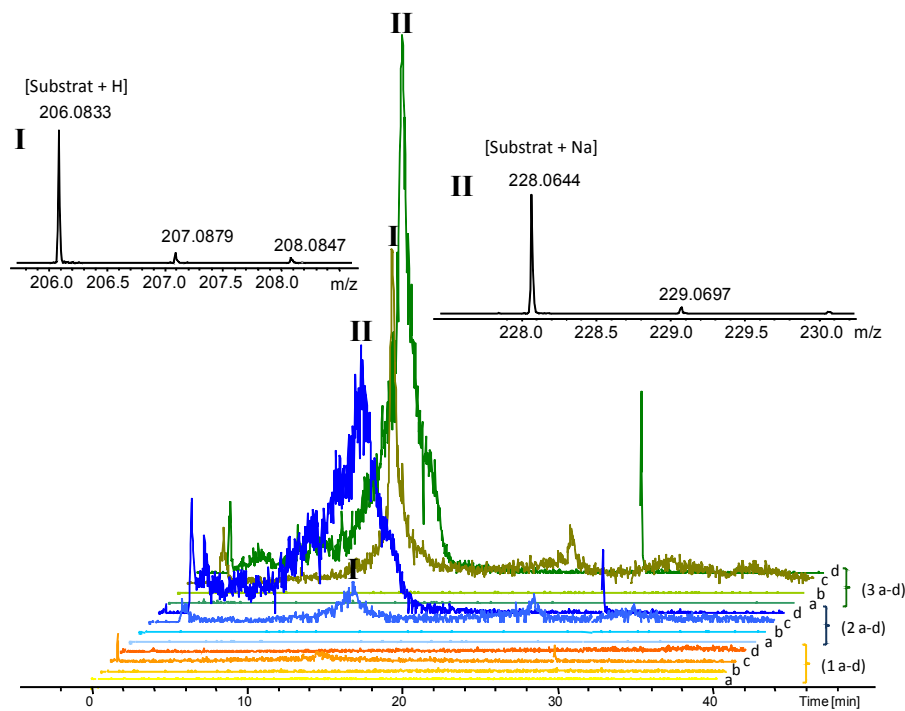


Abb. 5-42: LC-ESI-microQ-TOF-MS der PsyC Enzymassays mit aufgereinigtem Protein.

(1 a-d) LC-ESI-microQ-TOF-MS des Assays ohne Substrat (Negativkontrolle 1). (2 a-d) LC-ESI-microQ-TOF-MS des Assays ohne PsyC (Negativkontrolle 2). (3 a-d) LC-ESI-microQ-TOF-MS des Assays.

(a) Massenspur Produkt **37** ($m/z + H = 222,080 (\pm 0,005)$). (b) Massenspur Produkt **37** ($m/z + Na = 244,061 (\pm 0,005)$). (c) Massenspur Substrat **33** ($m/z + H = 206,085 (\pm 0,005)$). (d) Massenspur Substrat **33** ($m/z + Na = 228,067 (\pm 0,005)$).

(I) Zugehörige Massenspektren zu den Maxima der Peaks.

(II) Zugehörige Massenspektren zu den Maxima der Peaks.

Für die Assays wurde aufgereinigtes PsyC verwendet (Aufreinigung entsprechend 6.6.5). Exprimiert wurde PsyC unter Co-Expression der Chaperone GroES und GroEL in *E.coli* BL21 DE3 pGro7 pHN50 (200 mL LB (Kn⁵⁰ Cm²⁰); 0,5 mg x mL⁻¹ Arabinose; 0,5 mM IPTG; 16 °C; 15 h. Assay entsprechend 6.7.3.1.

Die Massenspektren zeigen nur eine Detektion des Substrates **33**, Produkt **37** konnte nicht detektiert werden. Gleiche Ergebnisse lieferten Assays mit PsyC, das über die Co-Expression der Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE erhalten wurde (Daten nicht dargestellt). Auch der Einsatz des erhaltenen PsyC fusioniert mit dem Sumo-Tag, das ohne Co-Expression von Chaperonen erhalten wurde, lieferte keine Umsetzung des verwendeten Substrats (Daten nicht dargestellt). Die fehlende Umsetzung konnte womöglich auf das verwendete Test-Substrat **33** zurückgeführt werden, da es aufgrund einer Verkürzung um eine C-2 Einheit und die fehlende Exomethylengruppe nicht identisch mit dem postulierten Intermediat der Psymberin **21**-Biosynthese ist. Falls PsyC eine hohe Substratspezifität besitzen sollte, ist es sicherlich möglich, dass die Umsetzung des hier verwendeten Substrates **33** nicht funktioniert. Eingesetzt und synthetisiert wurde es wegen der Ähnlichkeit zum postulierten Substrat und wegen der leichteren Synthese. Daher sollten diese Experimente zwingend unter Verwendung des postulierten Substrates wiederholt werden. Weiterhin könnte die Substrat-Erkennung nur als ACP-gebundenes Substrat von PsyC erfolgen. Daher sollten zusätzlich ACP-gebundene Substrate getestet werden. Zusätzlich ist unbekannt, welche strukturellen Anforderungen an das Substrat gestellt werden. In Abschnitt 5.1.6 wird über die Einführung einer β -Methoxygruppe durch PsyD *O*-MT berichtet. Daher wäre ebenfalls vorstellbar, dass ein akzeptiertes Substrat der α -Hydroxylierung durch PsyC die Methoxy-Gruppe bereits enthalten muss. Ein Beispiel für eine Fe(II)/ α -Ketoglutarat abhängige α -Hydroxylase, die eine Positions-spezifische Methylgruppe benötigt, ist die humane Phytanoyl-CoA Hydroxylase.¹⁹⁶ Außerdem kann nicht mit absoluter Sicherheit gesagt werden, an welchem Intermediat die α -Hydroxylierung eingeführt wird. Möglicherweise wird PsyC erst nach Abschluss der Biosynthese katalytisch aktiv und führt die α -Hydroxylierung als Post-PKS-Enzym ein. Jedoch stellt sich die hier anfängliche postulierte Variante der biosynthetischen Schritte als plausibelste heraus.

Sicherlich bestehen auch zahlreiche andere Fehlerquellen, die Protein-spezifische oder Assay-spezifische Gründe haben können. Die Bedingungen (pH-Wert, Temperatur) des Assay könnten nicht den optimalen Bedingungen für PsyC entsprochen haben oder die jeweiligen Fusions-Tags (His-Tag, Sumo-Tag) von PsyC inhibieren die Katalyseaktivität von PsyC. Durch die Abspaltung der jeweiligen Fusions-Tags, das über spezifische Proteasen möglich ist, kann dieses Problem behoben werden. Einige Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängige α -Hydroxylasen besitzen zusätzlich, zu den im Assay verwendeten Co-Faktoren, weitere Zusätze. Die humane Phytanoyl-CoA Hydroxylase benötigt GTP und Mg^{2+} als weitere Co-Faktoren,¹⁹⁶ daher sollten auch Assays unter Zugabe von GTP und Mg^{2+} durchgeführt werden. Eine weitere Fehlerquelle könnte sein, dass PsyC während der Aufreinigung die Katalysefähigkeit verliert. Daher wurden weitere Assays durchgeführt, in denen das Lysat nach dem Zellaufschluss der PsyC-Expression im Assay eingesetzt wurde (6.7.3.2). Außerdem wurde versucht, die Umsetzung des Substrates **33** nach einer Ganzzelltransformation zu beobachten

(6.7.3.3). Die Ergebnisse der Assays waren identisch mit den α -Hydroxylierungsassays mit gereinigtem PsyC. Es konnte keine Umsetzung des Substrates durch PsyC aufgrund einer vorhandenen α -Hydroxylierung beobachtet werden.

Die Wiederholung der Assays mit dem postulierten Substrat **35** als SNAC-Derivat bzw. **36** als CoA-Derivat scheinen nach den erfolgten Experimenten erforderlich zu sein. Einerseits sollte die Aktivität von PsyC an den Substraten selbst und andererseits an ACP-gebundenen Substraten untersucht werden. Die Untersuchung an ACP-gebundenen Substraten kann erfolgen, indem die CoA-Derivate auf PsyA-ACP₃ (Expression bereits unter 5.1.1.7 dargestellt) mit Hilfe der Sfp übertragen wird. Die Sfp kann über das Plasmid pET-*sfp* exprimiert als N-terminales His-Tag Protein exprimiert und gereinigt werden (Abb. 5-43).

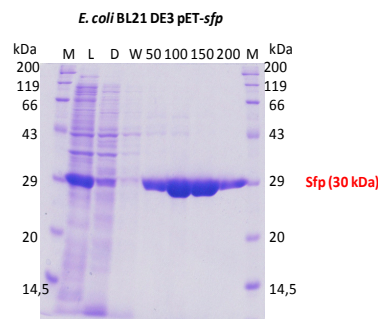


Abb. 5-43: Proteingel der Expression der Sfp.

Kultivierung: *E. coli* BL21 DE3 pET29-*sfp*; 200 mL LB (Kn⁵⁰); 0,5 mg x mL⁻¹ IPTG; 16 °C; 14 h. **Aufreinigung** 6.6.5.

M = Marker, **L** = Lysat, **D** = Durchlauf, **W** = Waschfraktion, **30** = 30 mM Imidazol Elutionsfraktion, **50** = 50 mM Imidazol Elutionsfraktion, **100** = 100mM Elutionsfraktion, **150** = 150 mM Imidazol Elutionsfraktion, **200** = 200 mM Imidazol Elutionsfraktion, **P** = Pellet.

Die Analytik kann über FT-ICR-MS Messungen erfolgen. Die Massen der ACP-beladenen Substrate liegen in Größenordnungen, in denen die Massenunterschiede von 14 des hydroxylierten Substrat-ACP gegenüber dem nicht-hydroxylierten Substrat-ACP, auch an Protein gebundenen Intermediaten gemessen werden können. Durchgeführt wurden die Experimente noch nicht, da aus zeitlichen Gründen die Synthese der Substrate zu aufwendig gewesen wäre.

Ebenfalls nicht in enzymatischen Assays untersucht wurde PsyK, dessen Expression und Reinigung erfolgreich war (5.1.5.2). Da sich die putative Funktion von PsyC als Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängige α -Hydroxylase, durch den Vergleich mit anderen Proteinen (5.1.5) und durch den Nachweis von Fe als möglichen Co-Faktor in dem folgenden Abschnitt (5.1.5.4), zu bestätigen schien, wurden die Assays mit PsyC zuerst bearbeitet.

5.1.5.4 Fe(II)-Nachweis an PsyC

Außer der Untersuchung der α -hydroxylierenden Funktion von PsyC sollte ein Nachweis des Fe(II) Co-Faktors erfolgen. Die Detektion von enzymgebundenem Fe(II) ist ein wichtiger Schritt die postulierte Funktion von PsyC als Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängige α -Hydroxylase zu unterstützen. Insbesondere deshalb, da die enzymatische Umsetzung unter 5.1.5.3 bisher nicht gezeigt werden konnte. Zur Detektion von enzymgebundenen Metallen können verschiedene Methoden verwendet werden. Beispielsweise wurde zur Detektion von Mangan des AurF, einer N-Oxygenase des Aureothin-Clusters, eine Kombination aus kolorimetrischer Eisenbestimmung, optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES), und Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) verwendet um Metalle des Proteins nachzuweisen.^{197,198} Eine weitere Analyse der Einbettung des Mangans in die Sekundär- und Tertiärstruktur des Enzyms konnte mittels Elektronenspinresonanz (ESR)-Analysen erfolgen.¹⁹⁸ Eine weitere Methode ist die Partikel induzierte Röntgenemission (PIXE), die bereits zur Detektion von Eisen an der Xanthin-Hydroxylase von *Aspergillus nidulans* verwendet wurde.¹⁹⁹

Zur Detektion des vermuteten Fe(II)-Co-Faktors wurde PsyC entsprechend 5.1.5.2 exprimiert. Zusätzlich wurde das Medium mit 0,04 mM Endkonzentration $(\text{NH}_4)_2\text{Fe(II)SO}_4$ supplementiert. PsyC wurde dabei als Octahistidyl-Fusionsprotein sowie als Fusionsprotein mit dem Sumo-Tag erhalten. Da die Elutionsfraktionen des Octahistidyl-Fusionsproteins Verunreinigungen von Chaperon-Protein (GroEL und GroES) enthielten, war die zusätzliche Analytik des Sumo-Fusionsprotein wichtig, um unspezifische Wechselwirkungen des Fe(II) mit den Chaperonen auszuschließen. Die Aufreinigung (entsprechend 6.6.5) wurde so modifiziert, dass der Waschschrift nicht wie üblich mit 1 bis 2 mL Lysepuffer (Tab. 6-30) durchgeführt wurde, sondern mit 5 mL Lysepuffer. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass kein unspezifisches Fe in den Elutionsfraktionen vorhanden ist. Die erhaltenen Elutionsfraktionen enthielten, wie schon unter 5.1.5.2 erwähnt, sehr geringe Konzentrationen an PsyC. Unter dem Gesichtspunkt, dass pro Enzym-Molekül ein Eisen-Atom gebunden sein sollte, stellt diese Tatsache besondere Anforderungen an die Sensitivität der Eisendetektionsmethode. Bei der höchsten erhaltenen Proteinkonzentration von $0,7 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$, das bei dem vorhandenen Elutionsvolumen von 1 mL einer Stoffmenge von 0,0016 nmol entspricht, sollten 0,0016 nmol PsyC-gebundenes Fe(II) vorhanden sein. Daher sollten die eingesetzten Analysemethoden diese Eisenkonzentrationen detektieren können. Der sensitivste kolorimetrische Nachweis, der in der Literatur gefunden werden konnte, ist die Detektion mittels Ferene (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(2-(5-furylsulfonicacid)-1,2,4-triazine Dinatriumsalz $\times \text{H}_2\text{O}$).²⁰⁰⁻²⁰³ Dieser Nachweis wurde auch schon zur Bestimmung des enzymgebundenen Eisen des Eisen-Schwefel-Flavoenzym 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium aminobutyricum* verwendet.²⁰⁴ Aufgrund der berechneten Eisenkonzentrationen wurde allerdings klar, dass auch diese sensitive Testmethode an

die Grenze des kolorimetrisch Messbaren treffen könnte, da die Kalibriergerade üblicherweise mit Eisenkonzentration von 2 bis 20 nmol erstellt wird.²⁰⁴ Dies konnte durch die Messungen (entsprechend 6.8.1) bestätigt werden (Daten nicht dargestellt).

Nach den Ergebnissen des kolorimetrischen Tests wurden Messungen mittels ICP-OES durchgeführt und versucht, hierüber messbare Konzentrationen von Metallen zu detektieren. Dazu wurden die stärksten Emissionslinien von Eisen, Fe 2382 und Fe 2599, axial vermessen. Für die Betrachtung weiterer Elemente wurden ebenfalls möglichst starke Emissionslinien gewählt. Nach ersten Messungen konnten die Elemente Co, Cu, Cd, Mn, Mo, Se, V und W nicht detektiert werden und als Co-Faktor ausgeschlossen werden. Aufgrund der Messwerte stellte sich jedoch das für Fe (II) α -Ketoglutarat abhängige α -Hydroxylasen charakteristische Fe als detektierbar heraus. Weitere Elemente, die detektiert werden konnten, waren Ca, Mg, Ni und Zn. Zum Vergleich wurden diese Elemente zusätzlich zum Eisen vermessen. Um zu der zu messenden Probe einen möglichst ähnliche Negativkontrolle zur Verfügung zu haben wurde PsyD O-MT, die besonders gut exprimiert wird (vgl. 5.1.6.2) und kein enzymgebundenes Eisen enthalten sollte, unter identischen Bedingungen kultiviert und aufgereinigt. Die Messwerte dieser Probe wurden als Null-Werte definiert. Dadurch werden Fe-Verunreinigungen aus der Kultivierung, den Aufreinigung und von Lösungen automatisch berücksichtigt. Zur Quantifizierung wurden ebenfalls Standards angesetzt, indem den Elutionsfraktionen von PsyD O-MT kommerziell erhältliche Einzelementstandards zugegeben wurden. Durch die erhaltenen Messwerte bekannter Eisenkonzentrationen konnte das Gerät kalibriert werden. Durch diese Kalibrierung des Gerätes wurde eine optimale Quantifizierung der Proben gewährleistet, bei der ebenfalls die Verunreinigungen der Elutionsfraktionen berücksichtigt wurde. Um aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen eine möglichst gute Vorstellung bezüglich der PsyC-spezifischen Eisenkonzentrationen zu bekommen, wurden jeweils vier verschiedene 100 mM und 150 mM Imidazol Elutionsfraktionen des Sumo-PsyC-Fusionsproteins sowie jeweils vier verschiedene 100mM, 150mM und 200 mM Imidazol Elutionsfraktionen vermessen (Abb. 5-44).

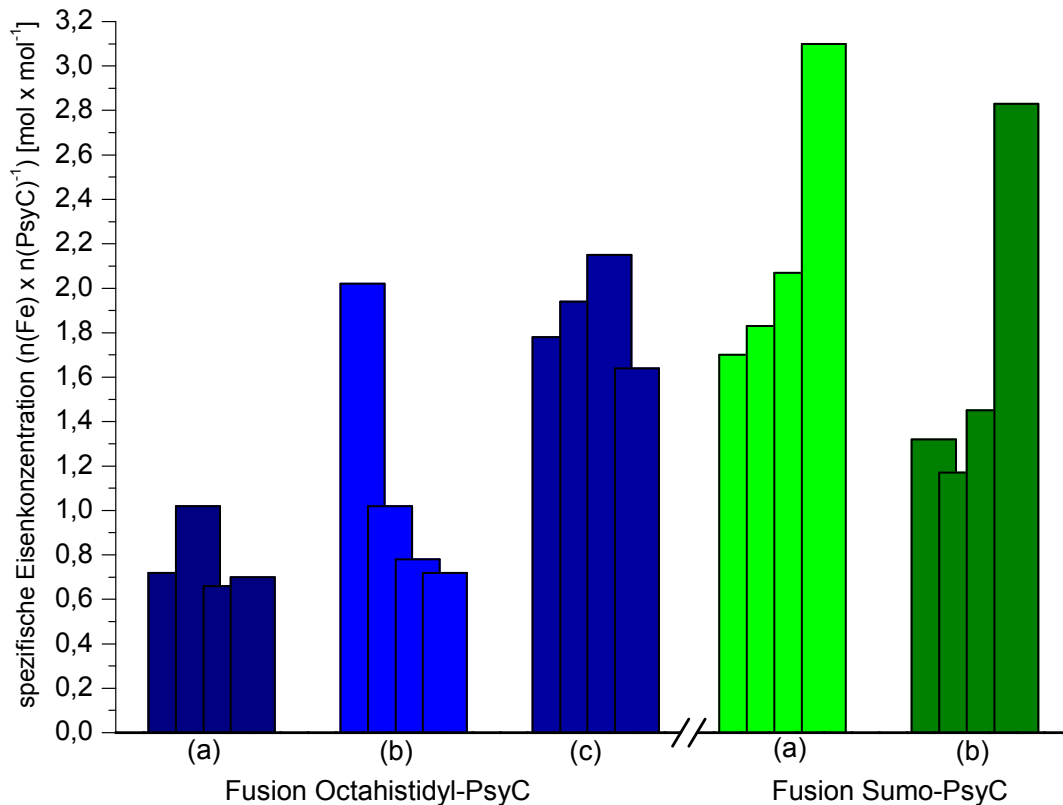


Abb. 5-44: PsyC spezifische Eisenkonzentrationen in den Elutionsfraktionen.

(a) 200 mM Imidazol Elutionsfraktionen; (b) 150 mM Imidazol Elutionsfraktionen; (c) 100 mM Imidazol Elutionsfraktionen. (a bis c) Es wurden jeweils 4 Proben vermessen und im Diagramm dargestellt.

Aus den Messwerten der Abbildung konnte eine PsyC-spezifische Eisenkonzentration von $1,53 (\pm 0,71)$ errechnet werden. Aus der getrennten Betrachtung von Octahistidyl-fusionierten Proteinen bzw. Fusionen mit dem Sumo-Tag ergeben sich PsyC-spezifische Eisenkonzentrationen von $1,26 (\pm 0,59)$ bzw. $1,93 (\pm 0,70)$. In der Literatur wurde an der Xanthin-Hydroxylase von *Aspergillus nidulans* beispielsweise eine Protein-spezifische Eisenkonzentration von 1,3 bestimmt.¹⁹⁹ Daher liegen die Messwerte in vergleichbaren Bereichen. Die relativ hohen Standardabweichungen existieren aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen und der relativ geringen Volumina der Elutionsfraktionen, die für die Messungen vorhanden waren. Die Messzeiten mussten daher auf ein Minimum begrenzt werden, sodass für die Equilibrierung des Signals nur wenig Zeit zur Verfügung stand. Daher ist der Fehler der Messungen sicherlich recht hoch. Außerdem wurden die Proteinkonzentrationen aufgrund der vorhandenen co-eluierten Chaperone über die Bandenintensitäten der Proteingele bestimmt (6.6.10.2). Die erhaltenen Proteinkonzentrationen dieser Methode waren sicherlich ebenfalls mit einem größeren Fehler behaftet, als bei fotometrischen Testmethoden, sodass über die Proteinkonzentrationen ebenfalls ein Fehler in die Berechnung eingeht. Insgesamt ist jedoch ein deutlicher Zusammenhang zwischen PsyC-Konzentration und Fe-Konzentration zu erkennen. In den jeweiligen vermessenen Elutionsfraktionen variieren die Proteinkonzentrationen zwischen $0,015 \text{ mg x mL}^{-1}$ und $0,063 \text{ mg x mL}^{-1}$

und dessen gemessene Fe-Konzentrationen weisen trotz der unterschiedlichen Proteinkonzentrationen die oben gezeigten Verhältnisse auf. Bei unspezifisch vorhandenem Fe in den Elutionsfraktionen sollten sich die Eisen-PsyC-Verhältnisse nicht gleichermaßen verhalten sondern ungleichmäßig sein, wie dies bei den weiteren vermessenen Elementen Ca, Mg, Ni und Zn der Fall ist (Abb. 5-45). Die Messwerte stammen aus den identischen Proben, die auch in der Abb. 5-44 vermessen wurden. Alle Proben wurden allerdings nur für das Element Fe vermessen. Für die Messung der Elemente in Abb. 5-45 wurden zwei der vier in Abb. 5-44 vermessenen Proben selektiert.

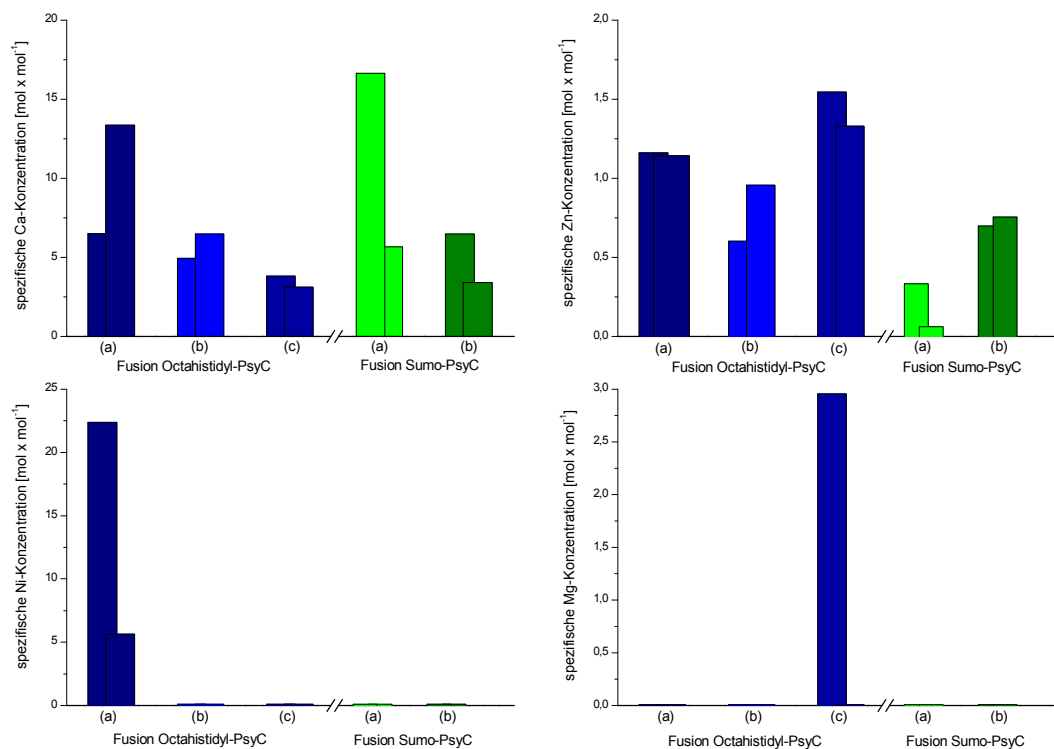


Abb. 5-45: PsyC spezifische Konzentrationen der Elemente Ca, Zn, Ni und Mg.

(a) 200 mM Imidazol Elutionsfraktionen; (b) 150 mM Imidazol Elutionsfraktionen; (c) 100 mM Imidazol Elutionsfraktionen.

Aus den Messungen von Ca, Ni und Mg zeigte sich kein Konzentrationsverhältnis zwischen PsyC und gemessenen Elementen, die auf einen Co-Faktor von PsyC schließen lassen. Ca kommt zwar in relativ hohen spezifischen Konzentrationen ($> 2,5$) vor, allerdings lassen die Differenzen zwischen den einzelnen vermessenen Proben darauf schließen, dass Ca entweder unspezifische Wechselwirkungen mit den Proteinen der Elutionsfraktion eingeht oder mit der Ni-NTA Agarose wechselwirkt. Dies sollte in weiteren Messungen nochmals überprüft werden. Letztendlich konnten die Elemente Ni und Mg als Co-Faktor ausgeschlossen werden und Ca scheint aufgrund der Höhe der Messwerte und der Konzentrationsverhältnisse zwischen PsyC und Ca ebenfalls nicht als Co-Faktor in Frage zu kommen. Bei Zn ergeben sich allerdings ähnlich PsyC/Zn-Konzentrationsverhältnisse wie bei Fe. Dabei fällt auf,

dass in den Octahistidyl-PsyC Elutionsfraktionen höhere Konzentrationsverhältnisse vorhanden sind als es bei den Sumo-Fusionsproteinen der Fall ist. Die eingesetzten Elutionsfraktionen der Octahistidyl-PsyC-Fusionen enthalten die Chaperone GroES und GroEL. Da bei der Bindung von GroEL an die hydrophobe Oberfläche des Zielproteins Zink-Kationen involviert sind^{205,206}, könnten die gemessenen Zink-Konzentrationen Chaperon-assoziiert in den Elutionsfraktionen vorhanden sein und nicht PsyC-assoziiert. Eine genaue Bestimmung der GroEL/Zn-Verhältnisse konnte nicht durchgeführt werden, da die Proteinkonzentrationen von GroEL in den Elutionsfraktionen nicht bestimmt wurde.

Insgesamt ergibt sich aus diesen ICP-OES Messungen eine sehr klare Analyse. Die gemessenen spezifischen Fe-Konzentration unterstützen die postulierte Funktion von PsyC als Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängige α -Hydroxylase. Alle anderen in Frage kommenden Elemente konnten als Co-Faktor ausgeschlossen und am Beispiel von Zn konnten die ähnlichen Konzentrationsverhältnisse von Protein zu Zink über die Involvierung von Zn bei der Faltungskatalyse von GroEL begründet werden. Da PsyC nur geringe Ähnlichkeit zu anderen, bereits charakterisierten Enzyme besitzt, war dies ein wichtiger Hinweis auf die Funktion. Weitere Experimente könnten Fe als Co-Faktor noch spezifischer nachweisen. Hierzu zählen vergleichende Experimente zu den bisher erfolgten Messungen unter einer Inkubation von PsyC mit dem Komplexbildner EDTA und folgender chromatographischer Reinigung. Fe sollte nach dieser Prozedur nicht mehr detektierbar sein. Diese Experimente wurden auch schon an der Xanthine Hydroxylase von *Aspergillus nidulans* angewandt.¹⁹⁹ Außerdem könnte vor der Messung eine Dialyse erfolgen, wodurch unspezifisch in der Probe vorhandene Elemente ausgeschlossen werden könnten. Bei AurF konnte Fe gegenüber Mn durch diese Methode als Co-Faktor ausgeschlossen werden.¹⁹⁸ Außerdem könnte über ESR-Experimente die Einbettung des Element Fe in die Sekundär bzw. Tertiärstruktur analysiert werden. Der limitierende Faktor dieser Experimente wird allerdings immer die sehr geringe Proteinkonzentration sein. Vor diesen Experimenten könnten daher weitere Optimierungsexperimente der Expression und Aufreinigung sinnvoll sein um mit höheren Proteinkonzentrationen arbeiten zu können. Ebenfalls sollte in weiteren Experimenten α -Ketoglutarat als zweiter Co-Faktor nachgewiesen werden. Dies würde die Vermutung, dass PsyC als Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängige α -Hydroxylase katalytisch aktiv ist, weiter verstärken. Möglich ist die Detektion beispielsweise über einen enzymatischen Assay.²⁰⁷

5.1.6 β -Methoxylierungen

Ein weiteres interessantes Enzym der Psymberin **21**-Biosynthese ist die intermodulare, methoxylierende Domäne PsyD O-MT. Homologe Domänen sind in den Clustern der Myxothiazol-,¹⁰⁰ der Stigmatellin-¹⁰¹ sowie der Jamaicamid-Biosynthese⁵¹ vorhanden. Aus der Domänen-Position im Cluster des Psymberins **21** und der anderen PKS-Systeme kann abgeleitet werden, dass durch diese Domäne Methoxygruppen an wachsenden Polyketiden eingeführt werden. Um diese Funktion auch

biochemisch zu untersuchen, sollen durch Alignments die Grenzen der Domäne festgelegt werden, Expressionsplasmide zur heterologen Expression von PsyD O-MT erstellt werden sowie Enzymassays mit den postulierten Substraten durchgeführt werden. Die postulierten Substrate sind in diesen Fällen identisch oder ähnlich zu denen des α -hydroxylierenden PsyC (vgl. 5.1.5.3), da die Enzyme am gleichen Psymberin-Intermediat enzymatisch aktiv werden sollten. Fraglich ist jedoch, ob die Methoxylierung oder die α -Hydroxylierung zuerst eingeführt wird und ob dies Konsequenzen bezüglich der akzeptierten Substrate hat.

5.1.6.1 Klonierung der PsyD O-MT

Zur Klonierung der Expressionsplasmide wurden die Vektoren pASK-IBA3 und pASK-IBA5 sowie der Vektor pHIS8 ausgewählt (Abb. 5-46). Die Grenzen des Moduls wurden mit Hilfe eines Alignments festgelegt und *psyD* O-MT mittels PCR (6.5.1) und spezifischen Primern (Tab. 6-11) amplifiziert. Darauf folgte eine T/A-Klonierung (6.5.14) in den Vektor pBluescript SK(+). Die erhaltenen Lagerungsplasmide tragen die Bezeichnung pHN43, pHN45 und pHN47. Die Übertragung erfolgte durch Restriktion von pHN43 mit *Bsa*I, pHN45 mit *Bsa*I sowie pHN47 mit *Bam*HI und *Eag*I. Die einzubringenden Fragmente wurden durch Gelelektrophorese gereinigt und reisoliert (6.5.8). Das Insert aus pHN45 wurde in pASK-IBA3, das Insert aus pHN45 in pASK-IBA5 sowie das Insert aus pHN47 in pHIS8 ligiert (6.5.11). Die fertiggestellten Expressionsplasmide tragen die Bezeichnung pHN44, pHN46 und pHN48.

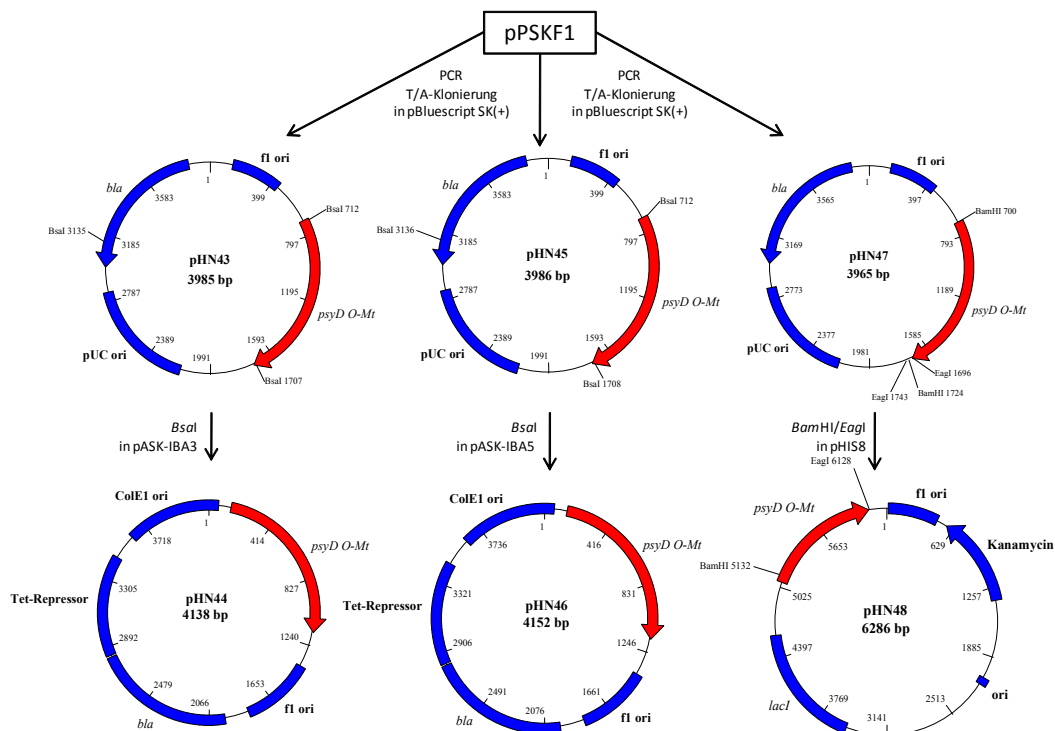


Abb. 5-46: Klonierung der PsyD O-MT-Expressionsplasmide pHN44, pHN46 und pHN48. Die DNA-Sequenz wurde vom Cosmid pPSCG2⁶¹ mittels PCR amplifiziert.

5.1.6.2 Expression von PsyD O-MT

Zur Expression wurden die Plasmide in *E. coli* BL21 DE3 transformiert und in Expressionskulturen und einer anschließenden affinitätschromatographischen Reinigung auf die Expression von PsyD O-MT getestet (Abb. 5-47).

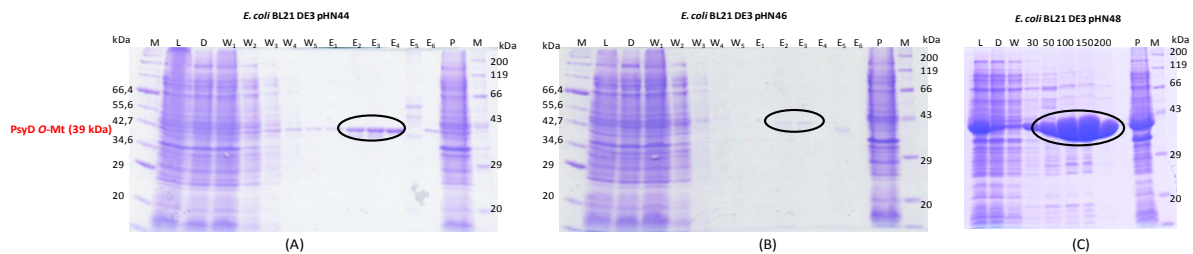


Abb. 5-47: Proteingel der Expression von PsyD O-MT.

(A) *E. coli* BL21 DE3 pHN44; 200 mL LB (Amp¹⁰⁰); 0,2 mg/mL Anhydrotetracyclin; 16 °C; 16 h. Aufreinigung 6.6.6.

(B) *E. coli* BL21 DE3 pHN46; 200 mL LB (Amp¹⁰⁰); 0,2 mg/mL Anhydrotetracyclin; 16 °C; 16 h. Aufreinigung 6.6.6.

(C) *E. coli* BL21 DE3 pHN48; 200 mL LB (Kn⁵⁰); 0,5 mM IPTG; 16 °C; 16 h. Aufreinigung 6.6.5.

(A) und (B) M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W₁ bis W₅ = Waschfraktionen 1 bis 5, E₁ bis E₆ = Elutionsfraktionen 1 bis 6, P = Pellet. (C) M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, 30 = 30 mM Imidazol Elutionsfraktion, 50 = 50 mM Imidazol Elutionsfraktion, 100 = 100mM Elutionsfraktion, 150 = 150 mM Imidazol Elutionsfraktion, 200 = 200 mM Imidazol Elutionsfraktion, P = Pellet; SDS-PAGE (Trenngel): 12 %.

Nach den Expressionen zeigte sich, dass PsyD O-MT sowohl als N-terminales Strep-Tag Protein und C-terminales Strep-Tag Protein (Abb. 5-47, (A) und (B)) als auch als N-terminales His-Tag Protein (Abb. 5-47, (C)) in löslicher Form erhalten werden konnte. Die höchsten Konzentrationen wurden dabei in der T7-regulierten Expression über *E. coli* BL21 DE3 pHN48 mit 9,8 mg x mL⁻¹ PsyD O-MT erreicht. Eine Optimierung der Expressionsbedingungen war daher nicht notwendig.

5.1.6.3 O-Methoxylierungsassay

Da das Protein in sehr guten Mengen exprimiert werden konnte, sollten Enzymassays die Umsetzung der postulierten Substrate nachweisen (Abb. 5-48). Die Substrate sind, wie schon erwähnt (5.1.6), identisch zu den Substraten des α -Hydroxylierungsassays. In den Assays wird S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor eingesetzt.

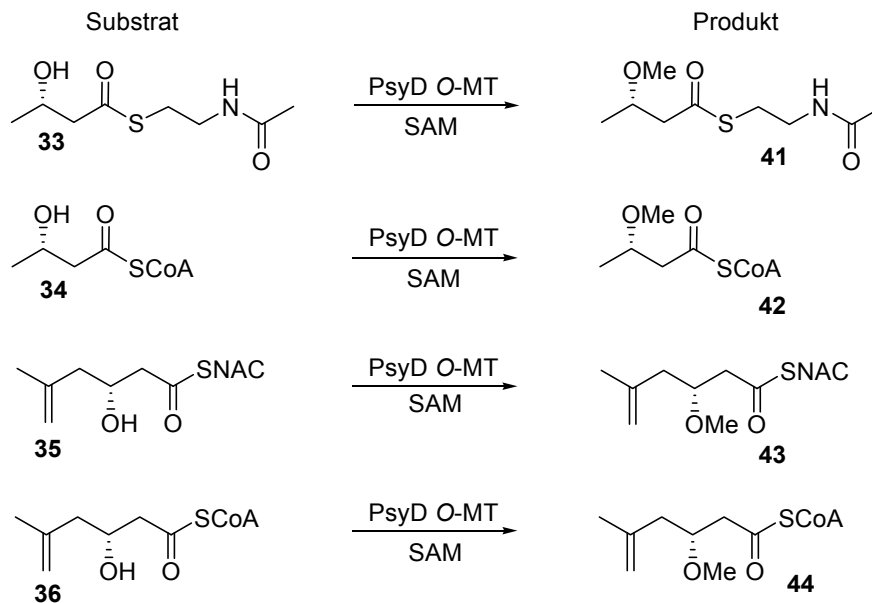


Abb. 5-48: Substrate für den *O*-Methoxylierungsassay sowie die postulierten enzymatischen Reaktionen von PsyD *O*-MT.

In den Arbeiten von Julia Katzschmarek war die Synthese des SNAC-Derivates **33** erfolgreich.¹⁹¹ Daher konnten mit diesem Substrat Assays durchgeführt werden. Für den methodischen Ansatz des *O*-Methylierungsassay konnte auf die Arbeiten von Katrin Zimmermann zurückgegriffen werden, die bereits enzymatische Methylierungsreaktionen an Enzymen der Pederin **20**-Biosynthese aufklären konnte.^{91,92} Der Assay wurde entsprechend 6.7.4 durchgeführt. Die Analytik der enzymatischen Reaktion erfolgte durch LC-MS Messungen. Die erfolgten Assays zeigten jedoch keine Umsetzung des Substrates **33** zum Produkt **41**. Analog zu den Experimenten des α -Hydroxylierungsassays wurden gereinigtes Enzym (6.7.4.1), das Zelllysate (6.7.4.2) sowie ganze Zellen (6.7.4.3) in den Assays getestet. Keines der erfolgten Experimente zeigte eine Umsetzung des eingesetzten Substrates **33**. Das Substrat selbst konnte jedoch in allen Messungen detektiert werden. Die Läufe der LC-MS wurden nicht dargestellt, da die Detektion des Substrates schon unter den Experimenten mit PsyC gezeigt wurde (Abb. 5-42). Die Diskussion über die fehlende Umsetzung kann hier analog zu den PsyC Experimenten geführt werden. Der wahrscheinlichste Grund für die fehlende Umsetzung scheint das nicht identische Substrat **33** gegenüber dem postulierten **35** bzw. **36** zu sein. Substrat **35** und **36** standen bisher nicht zur Verfügung, da die Synthese noch nicht erfolgreich war. Daher sollten die Experimente mit den hypothetischen Substraten eine Möglichkeit für die erfolgreiche Umsetzung bieten. Gleichzeitig erscheinen die Experimente mit ACP-gebundenen Substraten bei diesen Assays noch vielversprechender, da die native Reaktion, durch die Modul-integrierte Lokalisation der PsyD *O*-MT, definitiv an einem ACP-gebundenen Intermediat des Psymberins stattfindet. Hierzu steht das ACP (PsyD-ACP₁) des ersten Moduls von PsyD, welches ebenfalls die PsyD *O*-MT enthält, aus den Experimenten unter 5.1.1.7 zur Verfügung. Diese Versuche wurden nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

5.1.7 Formulierung einer Proteinexpressionsstrategie für PKS

Aufgrund der ausgiebigen Experimente zur heterologen Expression von verschiedensten Proteinen, die bei der Polyketidsynthese eine Rolle spielen, sollen an dieser Stelle die Ergebnisse zusammengefasst werden. Schließlich konnten alle zu charakterisierende Enzyme in sehr guten bis ausreichenden Konzentrationen in löslicher Form erhalten werden, sodass die angewendeten Proteinexpressionsmethoden sicherlich eine gute Expressionsstrategie für die Enzyme der Pederin **20**- und Psymberin **21**-Biosynthese darstellen und unter Umständen auf Enzyme anderer trans-AT-PKS-Cluster übertragbar sind. Bei den Expressionen traten hauptsächlich Probleme auf, die die Löslichkeit des Proteins betrafen, oder das Zielprotein wurde weder unlöslich noch löslich exprimiert. Die angewendeten Methoden konnten dieses Problem beheben. Die im Folgenden beschriebenen und bei der Expression angewendeten Methoden beschränken sich auf die in dieser Arbeit verwendeten. Beispielsweise, Probleme mit dem G/C-Gehalt des zu exprimierenden Gens, das nur durch ein synthetisch hergestelltes Gen behoben werden kann, werden nicht erwähnt. Außerdem bestehen die angewendeten Methoden aus bereits in der Proteinexpression getesteten Systemen, wurden jedoch für die Expression von Polyketidsynthasen im Rahmen dieser Arbeit im Arbeitskreis Piel angewendet und etabliert. Die zusammenfassenden Betrachtungen erfolgen getrennt über die Punkte 1) Auswahl der Expressionsvektoren, 2) Optimierung des Mediums, der Temperatur und der Induktionskonzentrationen, 3) Expressionsstämme und 4) Co-Expression von Chaperonen und Fusionen mit einem Löslichkeits-Tag.

1) Auswahl der Expressionsvektoren

Auf Basis der Klonierung wurde in dieser Arbeit darauf geachtet, dass über die ausgewählten Expressionsvektoren eine Flexibilität bezüglich des Aufreinigungs-Tags sowie der Lokalisation des Tags (N-terminal oder C-terminal) besteht. Außerdem sollte die Regulation der Proteinexpression über verschieden starke Promotoren erfolgen. In dieser Arbeit wurden dazu die Vektoren pASK-IBA3, pASK-IBA5, pET52b(+) und pHIS8 verwendet. Die Flexibilität bezüglich des Tags war daher durch einen N-terminalen (pASK-IBA5) oder C-terminalen (pASK-IBA3) Strep-Tag sowie durch einen N-terminalen His-Tag (pHIS8) gegeben. Über pET52b(+) stand ein Expressionssystem zur Verfügung, das das Protein N-terminal mit einem Strep-Tag II und C-terminal mit einem His-Tag fusioniert. Die Erfolge dieser Strategie zeigen sich bei der Expression von PedC (5.1.2.1). Die Expression über die Vektoren pHIS8, pASK-IBA5 und pET52b(+)⁹¹ zeigen weder lösliches Protein, noch unlösliches Protein im Pellet, was darauf schließen lässt, dass keine Expression aufgrund der N-terminalen Fusion des Proteins erfolgt. Eine Expression konnte jedoch durch die C-terminale Fusion mit einem Strep-Tag II in dem Vektor pASK-IBA3 erreicht werden. Weiterhin zeigte sich PedC unlöslich im Pellet. Dies konnte trotzdem als Erfolg bezeichnet werden und in weiteren Versuchen über die Co-Expression

von Chaperonen behoben werden (5.1.2.1)). Ob die Regulation über das *tetA*-Operon anstatt über den T7-Promotor einen zusätzlichen Beitrag zur erfolgreichen Expression geliefert hat kann aus den Ergebnissen nicht definitiv abgeleitet werden. Jedoch scheint die Regulation durch den über einen Repressor strikt regulierten Promotor des *tetA*-Operons sinnvoll zu sein, da eine fehlende Expression aufgrund einer möglichen Toxizität von überexprimierten Proteinen vorhanden sein kann. Für diese Fälle ist der Einsatz von strikt regulierten Regulationssystemen für die Proteinexpression die Methode der Wahl.^{208,209}

2) Optimierung des Mediums, der Temperatur und der Induktionskonzentrationen

Die Optimierung der Expression von löslichen Proteinen über die Auswahl der Medien war zur Behebung der Löslichkeitsprobleme und Proteinkonzentrationen in den Elutionsfraktionen nicht erfolgreich. Getestet wurden am Beispiel von verschiedenen Expressionen LB-, TB-, HSG-Medium sowie das Overnight Express Autoinduction TB Medium. Besonders letzteres wird in der Literatur als Erfolg versprechend für die Expression von löslichen Proteinen beschrieben.²¹⁰⁻²¹² Dieses konnte an einigen hier exprimierten Proteinen nicht bestätigt werden.

Durch die Optimierung der Expressionstemperatur konnten jedoch gute Erfolge erzielt werden. Viele Proteine, die bei 30 bis 37 °C ausschließlich unlösliches Protein aufwiesen, konnten dagegen bei Expressions-Temperaturen von 16 °C als lösliches Protein erhalten werden. Daher fanden Expressionen letztendlich ausschließlich bei 16 °C für 12 bis 16 h statt.

Die Induktionsstärken wurden ausschließlich über die Induktion des T7-Promotors mit unterschiedlichen Konzentrationen IPTG getestet. Die Endkonzentrationen an erhaltenem Protein konnten durch die unterschiedlichen Induktionsstärken sehr wohl beeinflusst werden. Jedoch konnte keines der Proteine, die unlöslich waren, durch diese Optimierung in löslicher Form erhalten werden.

3) Expressionsstämme

Für die Expression wurden die Stämme *E. coli* BL21 DE3, *E. coli* Rosetta-gami 2 DE3 pLysS und *E. coli* ArcticExpress RIL DE3 Zellen verwendet. *E. coli* BL21 DE3 wurde standardmäßig verwendet. Die anderen Stämme tragen für die Proteinexpression in *E. coli* komplementierende tRNA-Gene. Zusätzlich sollen Proteine, die schwer in löslicher Form erhalten werden können, über *E. coli* Rosetta-gami 2 DE3 pLysS über die Mutation in den Genen *trxB/gor* eine bessere Disulfidbrückenbildung im Cytoplasma zulassen und zu löslichem Protein führen.^{213,214} In *E. coli* ArcticExpress RIL DE3 Zellen soll der Erhalt von löslichen Proteinen über die Co-Expression der Chaperone *cpn60* und *cpn10* mediiert werden. Die Co-Expression von Chaperonen wird unter Punkt 4 analysiert. Erfolgreiche Expressionen durch den Stamm *E. coli* Rosetta-gami 2 DE3 pLysS ergeben sich aus den in dieser Arbeit exprimierten

Proteinen nicht. Jedoch konnte durch Katrin Zimmermann bereits gezeigt werden, dass bei dem Doppel-ACP von PedI3 die Expression in diesem Stamm im Gegensatz zu der Expression in *E. coli* BL21 DE3 lösliches Protein lieferte.⁹¹ In Einzelfällen ist diese Optimierung daher zu empfehlen. Der Stamm *E. coli* ArcticExpress RIL DE3 wurde nicht an Proteinen getestet, die in biochemischen Experimenten dieser Arbeit verwendet wurden, sondern an Proteinen des *sup*-Clusters.²¹⁵ Der Stamm ermöglicht die Expression der Proteine in löslicher Form. Die Beschreibung dieser Optimierung erfolgt unter Punkt 4, da die erfolgreiche Expression an der Co-Expression der Chaperone lag.

4) Co-Expression von Chaperonen und Fusionen mit einem Löslichkeits-Tag

Als erfolgreichste Methode, nicht-lösliches Protein letztendlich doch in löslicher Form aus den Expressionen zu erhalten, war bei den Proteinen der Psymberin **21**- und Pederin **20**-Biosynthese die Co-Expression von Chaperonen. Dafür wurden zwei Systeme eingesetzt. Entweder konnte die Co-Expression der Chaperone über die Plasmide pKJE7, pG-KJE8, pGro7, pTf16 oder pG-Tf2 erfolgen oder es wird der Stamm *E. coli* ArcticExpress RIL DE3 verwendet. *E. coli* ArcticExpress RIL DE3 kodiert die GroEL-, GroES-homologen Proteine Cpn60 und Cpn10 aus *Oleispira antarctica* (Fa. Startagene). Da bisher keine Betrachtung von Expressionen mit dem Stamm *E. coli* ArcticExpress RIL DE3 dargestellt wurde, folgt dies in Abb. 5-49, soll allerdings nur als Beispiel für eine erfolgreiche Expression dienen. Weitere Analysen wurden mit dem Protein nicht durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine gute Expression des Zielproteins. Allerdings treten, wie auch schon bei den homologen Chaperonen GroES und GroEL, Verunreinigungen mit dem Chaperon Cpn60 auf, allerdings in geringerem Ausmaß.

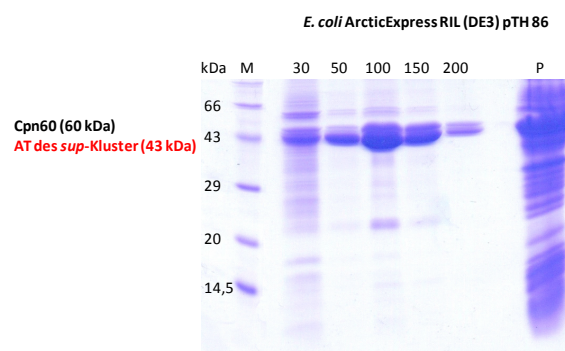


Abb. 5-49: SDS-Page einer Expression mit *E. coli* ArcticExpress RIL DE3.

Dargestellt sind Proben der Imidazol-Elutionsfraktionen (30 – 200 mM) und das Pellet (P). *E. coli* ArcticExpress RIL DE3 pTH86; 200 mL LB-Medium (Kn⁵⁰), 0,5 mM IPTG, 12 °C; 20 h. Das Plasmid pTH86 wurde von Thomas Hochmuth zur Verfügung gestellt.

Vor allem mit Hilfe der oben genannten Plasmide konnten die Proteine PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukte, PedM, PedC, PedL, PedP sowie PsyC in löslicher Form erhalten werden und

machen weitere *in vitro*-Untersuchungen überhaupt erst möglich. Sicherlich ergeben sich, wie schon in anderen Abschnitten erwähnt, auch Probleme, da die Chaperone häufig mit den Zielproteinen assoziiert sind und nicht voneinander trennbar sind. Daher treten für weitere Analysen, wie beispielsweise der massenspektrometrischen Messung von Intermediat-beladenen Modulen oder Domänen, Probleme auf.

Für die Fälle, in denen für die weiteren Analysen reines, nicht durch Chaperon verunreinigtes Protein notwendig ist, bleibt die Möglichkeit einer Fusion mit einem Löslichkeits-Tag. Dieses konnte an PsyC fusioniert mit dem Sumo-Tag gezeigt werden.

Abschließend sollte noch erwähnt werden, dass bezüglich der Optimierung der Proteinexpression zahlreiche andere Methoden existieren^{104,117,118,216-228} und diese Betrachtung nicht umfassend ist, sondern nur die hier angewendeten Methoden wiedergibt. Für die Anwendung bei der Expression von kleinen Domänen von Polyketidsynthasen (z.B. einzelne ACPs, ca. 10 kDa) bis hin zu ganzen Modulen (z.B. PedI3, ca. 160 kDa) zeigten sich die Methoden jedoch als erfolgreich.

5.1.8 Reinigung des Zielproteins nach Co-Expression von Chaperonen

Die Proteine der Pederin **20**-Biosynthese, PedI3, PedM, PedL, PedP und PedC sowie PsyC (aus pHN50) der Psymberin **21**-Biosynthese konnten nur unter Co-Expression von Chaperonen als lösliches Protein erhalten werden. Allerdings zeigte sich nach der Aufreinigung eine starke Kontamination mit Chaperonen. Für einige weitere Experimente ist eine weitere Aufreinigung essentiell, um die darauf folgenden Experimente erfolgreich durchführen zu können. In einigen Fällen liefern die kontaminierten Proteine dennoch in *in vitro* Assays Aktivität. Dies konnte erfolgreich bei der PedD-medierten Substratübertragung mit Hilfe von radioaktiv markiertem Malonyl-CoA **6** am Modul PedI3 gezeigt werden (5.1.2.2). Für einige andere Analysen ist es jedoch unerlässlich, möglichst reines Protein zur Verfügung zu haben. Beispielsweise bei der massenspektroskopischen Analyse der Enzymassays, die zur Aufklärung der Exomethylengruppenformierung im Pederin **20** führen sollten, oder bei der Eisenbestimmung der Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängigen Hydroxylase PsyC ist reines Protein sehr wichtig. Daher wurden Strategien entwickelt, um die jeweiligen Zielproteine von den Chaperonen zu trennen. Es wurden drei methodische Ansätze entwickelt. Eine herkömmliche Methode, Proteine voneinander zu trennen, ist die FPLC. Getestet wurde diese Aufreinigungsmethode an PsyC. Da PsyC sowohl unter der Co-Expression der Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE exprimiert wurden als auch unter der Co-Expression von GroES und GroEL sollten Ionenaustauschchromatographie- und Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)-Läufe Aufschluss über eine mögliche Trennung von PsyC und den Chaperonen geben. Eine andere Methode, die an PedI3 getestet wurde, war eine kultivierungstechnische Methode, die eine Trennung von PedI3 und Chaperon schon während der Kultivierung verursachen sollte. Da die

Chaperone einerseits die Proteinfaltung katalysieren und andererseits die Proteolyse von Proteinen verhindert,²²⁹⁻²³¹ treten sie während der Proteinexpression intensiv in Wechselwirkung mit dem überexprimierten Protein. Daher wurde vermutet, dass die Verunreinigungen durch die Chaperone aufgrund der bestehenden Wechselwirkungen mit dem Zielprotein in den Elutionsfraktionen vorhanden ist und nicht aufgrund von Wechselwirkungen mit der Ni-Nta-Matrix. Um den Katalysezyklus der Chaperone schon vor dem Zellaufschluss abzuschließen, wurde die Proteinexpression zu einem definierten Zeitpunkt unterbrochen und die Zellen abzentrifugiert. Danach erfolgte eine erneute Kultivierung unter $200 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ Chloramphenicol, wodurch die gesamte Proteinbiosynthese und daher auch die Expression von Zielprotein und Chaperone unterbrochen wurde. Diese zweistündige Folgekultivierung sollte den bereits exprimiertem Zielprotein-Chaperone-Aggregaten Zeit geben, den Chaperon katalysierten Faltungsmechanismus abzuschließen und die Chaperon-Zielprotein-Aggregate voneinander zu trennen. In der Literatur wurde diese „Zwei-Schritt Kultivierung“ bereits erfolgreich eingesetzt.²³² Die dritte Methode beruht auf der Wechselwirkung der Chaperone mit Casein²³⁰ und das für den Katalysezyklus der Chaperone wichtige Mg-ATP.²³³ Casein wurde bereits erfolgreich angewendet um die Enzyme Rhodanase und Rubisco-Protein A von DnaJ und GroEL zu trennen.^{230,234} Zusätzlich wurde Casein bereits erfolgreich zur Aufreinigung von Chaperonen angewendet.²³⁵ Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch zur Aufreinigung der unter Co-Expression von Chaperonen erhaltene Proteine durch die Zugabe von Mg-ATP der abschließende Katalyseschritt der Chaperone beschleunigt wird sowie durch die Zugabe von Casein den Chaperonen ein optimaler Bindungspartner zur Verfügung gestellt wird, wodurch die Aggregate zwischen Zielprotein und Chaperone vermindert werden könnten. Die „Zwei-Schritt Kultivierung“ und die Zugabe von Mg-ATP bzw. Casein während der Aufreinigung wurde auch in Kombination getestet.

5.1.8.1 FPLC-Trennung von PsyC

Zur Trennung des Enzyms PsyC von den Chaperonen wurden Kultivierungen analog zu 5.1.5.2 durchgeführt. Zum Einsatz kamen die mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigten Elutionsfraktionen. Die Proben wurden entsprechend 6.6.11.5.1 über Ionenaustauschchromatographie bzw. entsprechend 6.6.11.5.2 in einer HIC-Chromatographie aufgereinigt. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie (Abb. 5-50). Bevor die Proteinprobe auf die Anionentauschersäule aufgetragen wurde, fand eine Umpufferung in den Niedrigsalzpuffer (Tab. 6-34) über eine Gelchromatographiesäule statt (Chromatogramm nicht dargestellt).

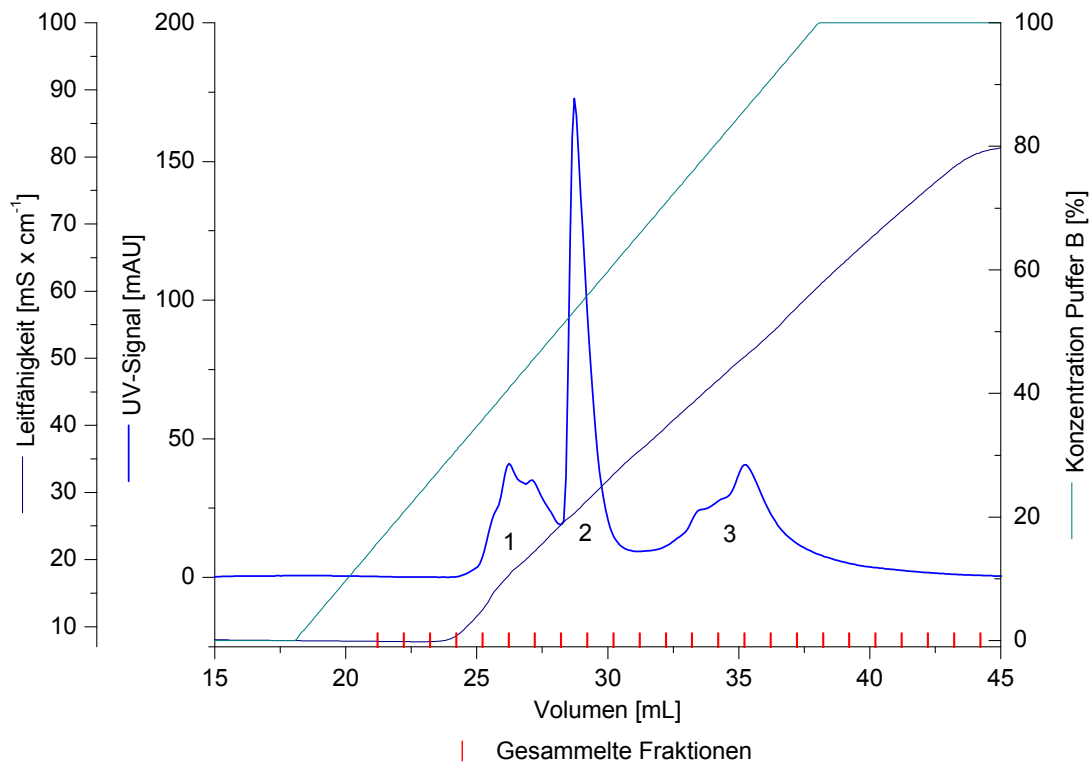


Abb. 5-50: Ionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung von PsyC.

Zur Analytik wurden die über einen Fraktionsammler gesammelten Proben auf einem Proteingel analysiert (Abb. 5-51).

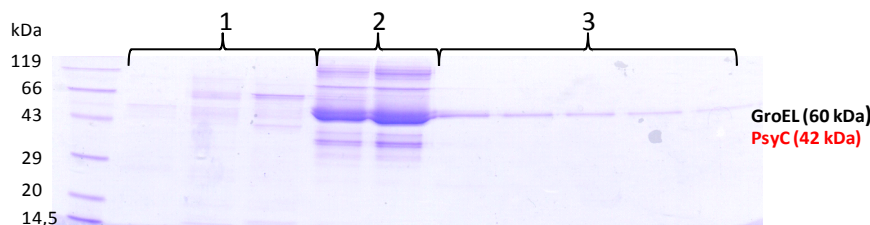


Abb. 5-51: Proteingel zur Ionenaustauschchromatographie (Abb. 5-50).

Zusammengefasst unter 1: Aufgetragene Elutionsfraktionen aus dem Fraktionsammler von Peak 1 aus Abb. 5-50.

Zusammengefasst unter 2: Aufgetragene Elutionsfraktionen aus dem Fraktionsammler von Peak 2 aus Abb. 5-50.

Zusammengefasst unter 3: Aufgetragene Elutionsfraktionen aus dem Fraktionsammler von Peak 3 aus Abb. 5-50.

SDS-PAGE (Trenngel): 12 %.

Das Chromatogramm aus Abb. 5-50 zeigt, dass die Proteine unter den gegebenen Bedingungen gebunden werden und bei steigender Salzkonzentration eluieren. Dabei entstehen drei Peaks, die über ein Proteingel analysiert wurden (Abb. 5-51). Hierbei zeigte sich, dass die Trennung von PsyC und GroEL nicht erfolgreich war. Beide Proteine eluieren im gleichen Peak. Dies sollte durch die gewählten Puffer-Bedingungen (Tab. 6-34) nicht der Fall sein, da unter dem gegebenen pH-Wert PsyC, aufgrund des Protein-spezifischen pI (Tab. 6-33), an die Säule binden sollte und GroEL nicht. Weitere Versuche fanden an PsyC statt, das durch die Chaperone DnaK und DnaJ verunreinigt war

(Daten nicht dargestellt). Es zeigte sich der gleiche Effekt (Daten nicht dargestellt). Bei weiteren Trennungsversuchen wurde die HIC-Chromatographie eingesetzt. Die Wechselwirkung zwischen Säule und Protein findet hier über hydrophobe Wechselwirkungen statt. Zusätzlich liegen die Proteine, bevor sie auf die Säule gelangen und im Gegensatz zur Ionenaustauschchromatographie, in Hochsalzpuffer (Hochsalzpuffer II, Tab. 6-35) vor, der eine bessere Trennung von PsyC und Chaperone hervorrufen könnte. Dazu wurden Säulen mit unterschiedlichen Liganden verwendet (6.6.11.5.2). In Abb. 5-52 sind die Ergebnisse der hochauflösenden Phenyl-Säule dargestellt. Weitere Chromatogramme zu einer Octyl-, und Butyl-Säule sind im Anhang dargestellt (Abb. 9-12 bis Abb. 9-15). Ergebnisse aus weiteren Versuchen über eine S-Butyl-Säule und eine nicht hochauflösende Phenyl-Säule wurden nicht dargestellt, da die Proteine auf diesen Säulen nicht über definierte Peaks eluierten. Ebenfalls nicht dargestellt wurden die HIC-Läufe, dessen Hochsalzpuffer durch die Verwendung von NaCl hergestellt wurde (Tab. 6-35, Hochsalzpuffer I), da die Elution der Proteine nicht durch definierte Peaks in den Chromatogrammen gekennzeichnet war. Die oben genannten Säulen wurden ebenfalls unter den genannten Bedingungen getestet, jedoch eluierten die Proteine nicht in definierten Peaks.

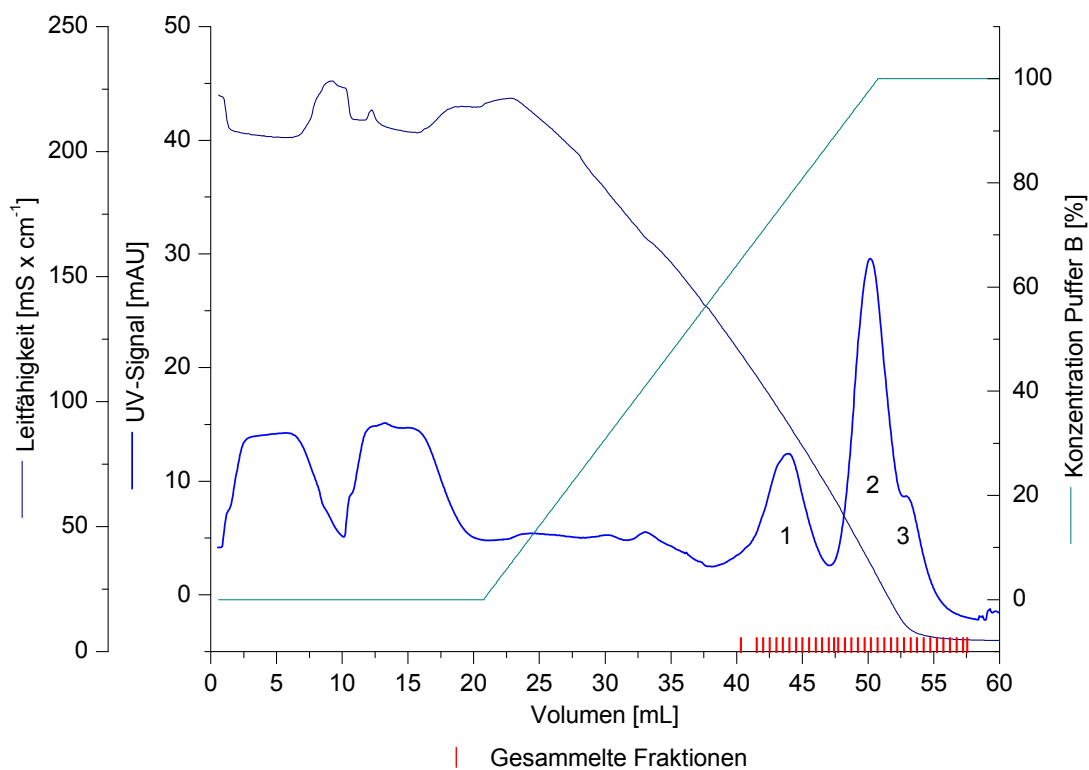


Abb. 5-52: Chromatogramm der HIC (Säule: Phenyl-HP) zur Reinigung von PsyC.

Zur Analytik wurden die über einen Fraktionsammler gesammelten Proben über eine SDS-Page analysiert (Abb. 5-52).

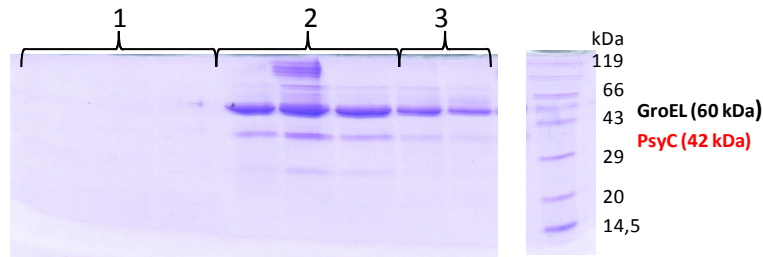


Abb. 5-53: Proteingel der HIC-Chromatographie aus Abb. 5-52.

Zusammengefasst unter 1: Aufgetragene Elutionsfraktionen aus dem Fraktionssammler von Peak 1 aus Abb. 5-52.

Zusammengefasst unter 2: Aufgetragene Elutionsfraktionen aus dem Fraktionssammler von Peak 2 aus Abb. 5-52.

Zusammengefasst unter 3: Aufgetragene Elutionsfraktionen aus dem Fraktionssammler von Peak 3 aus Abb. 5-52.

SDS-PAGE (Trenngel): 12 %.

Aus dem Chromatogramm und dem zugehörigen Proteingel ergibt sich, wie auch schon aus der Ionenaustauschchromatographie, keine erfolgreiche Trennung von PsyC und Chaperon. Sie eluieren gemeinsam in Peak 2 und 3. Ähnliche Ergebnisse zeigen die Chromatographieläufe unter der Verwendung der Octyl-, und Butyl-Säule im Anhang (Abb. 9-12 bis Abb. 9-15). Diese Ergebnisse konnten an PsyC mit Verunreinigungen von DnaK, DnaJ und GrpE nochmals bestätigt werden (Daten nicht dargestellt). Die Wechselwirkungen zwischen Chaperonen und PsyC scheinen recht stark zu sein, wenn sie über FPLC-Experimente, eine Standardmethode zur Trennung von Proteinen, nicht getrennt werden können. Weitere FPLC-Methoden wurden nicht durchgeführt, da die verwendeten Ionenstärken ($2 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) der HIC-Chromatographie höher liegen als bei anderen Chromatographiemethoden. Da unter diesen Bedingungen die Wechselwirkungen zwischen Chaperone und PsyC nicht beeinflusst werden konnten, ist dies bei anderen Chromatographiemethoden noch unwahrscheinlicher. Eine vorstellbare, nicht getestete chromatographische Methode wäre die Denaturierung der Proteine vor der chromatographischen Trennung. Dies sollte die Wechselwirkungen zwischen PsyC und Chaperonen inhibieren und eine Trennung ermöglichen. Jedoch müsste die Proteinfaltung von PsyC nach der Aufreinigung wiederhergestellt werden. Da diese Methoden nicht trivial und in zeitaufwendigen Experimenten für jedes Protein spezifisch optimiert werden muss, wurde dies im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

5.1.8.2 Trennung von Ped13 über „2-Schritt Kultivierung“ und Zugabe von Casein und Mg-ATP bei der Affinitätsreinigung

Die Trennung von Chaperon und Zielprotein über die „2-Schritt Kultivierung“ (6.6.11.3) sowie über Zugabe von Mg-ATP (6.6.11.1) und Casein (6.6.11.2) bei der Affinitätsreinigung sowie Kombinationen dieser Methoden (6.6.11.4) wurde an dem Fusionsprotein PedF-Linker/Ped13 getestet. Die folgenden Gelbilder zeigen die Ergebnisse (Abb. 5-54).

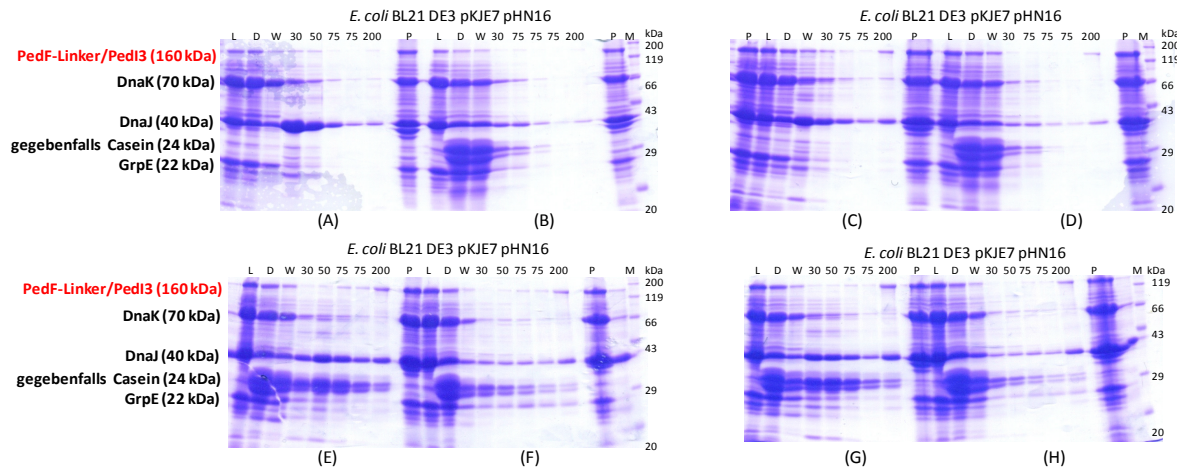


Abb. 5-54: SDS-Page der „2-Schritt Kultivierung“ sowie der Aufreinigung unter Zugabe von Casein und Mg-ATP.

(A bis H) *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 pHN16; 200 mL LB (Kn^{50} , Cm^{20}), 0,5 mg x mL⁻¹ Arabinose, 0,5 mM IPTG, 16 °C, 14 h.

(A) Aufreinigung entsprechend 6.6.5. Das Lysat wurde vor der Aufreinigung mit 5 mM Mg-ATP supplementiert.

(B) Aufreinigung entsprechend 6.6.5. Das Lysat wurde vor der Aufreinigung mit 5 mg x mL⁻¹ Casein supplementiert.

(C) 2-Schritt Kultivierung: An die Proteinexpression schloss sich eine Kultivierung unter Cm^{200} an. Aufreinigung entsprechend 6.6.5.

(D) 2-Schritt Kultivierung: An die Proteinexpression schloss sich eine Kultivierung unter Cm^{200} an. Aufreinigung entsprechend 6.6.5. Das Lysat wurde vor der Aufreinigung mit 5 mM Mg-ATP und 5 mg x mL⁻¹ Casein supplementiert.

(E) Aufreinigung entsprechend 6.6.5. Das Lysat wurde vor der Aufreinigung mit 10 mM Mg-ATP supplementiert.

(F) Aufreinigung entsprechend 6.6.5. Das Lysat wurde vor der Aufreinigung mit 10 mM Mg-ATP und 5 mg x mL⁻¹ Casein supplementiert.

(G) 2-Schritt Kultivierung: An die Proteinexpression schloss sich eine Kultivierung unter Cm^{200} an. Aufreinigung entsprechend 6.6.5. Das Lysat wurde vor der Aufreinigung mit 10 mM Mg-ATP supplementiert.

(H) 2-Schritt Kultivierung: An die Proteinexpression schloss sich eine Kultivierung unter Cm^{200} an. Aufreinigung entsprechend 6.6.5. Das Lysat wurde vor der Aufreinigung mit 10 mM Mg-ATP und 5 mg x mL⁻¹ Casein supplementiert.

(A bis H) M = Marker, L = Lysat, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, 30 = 30 mM Imidazol Elutionsfraktion, 50 = 50 mM Imidazol Elutionsfraktion, 75 = 75 mM Elutionsfraktion, 150 = 150 mM Imidazol Elutionsfraktion, 200 = 200 mM Imidazol Elutionsfraktion, P = Pellet; SDS-PAGE (Trenngel): 12 %.

Die Ergebnisse der Kultivierungen und Aufreinigungen zeigen, dass qualitativ durchaus weniger Chaperon in den Elutionsfraktionen vorhanden ist. Besonders bei DnaK, durch einen Vergleich von Abb. 5-7 mit Abb. 5-54, (D), zeigte sich dieser Effekt durch die Zugabe von Mg-ATP und Casein in Kombination mit der 2-Schritt Kultivierung. Jedoch zeigt sich dieser Effekt bei DnaJ nicht oder in wesentlich geringerem Ausmaß. DnaJ ist in den Elutionsfraktionen auch nach diesen Experimenten in höheren Konzentrationen vorhanden als das Zielprotein PedF-Linker/Pedi3. Zusätzlich zeigte sich, dass in den Elutionsfraktionen, in denen qualitativ viel DnaJ vorhanden ist, auch Casein vorhanden ist. Es liegt daher nahe, dass über den His-Tag von Pedi3 nicht nur DnaJ sondern zusätzlich, durch die Wechselwirkung von DnaJ und Casein, auch Casein co-eluiert wird. Daher kann bei Casein-Zugabe eher von einer zusätzlichen Verunreinigung gesprochen werden als von einer Verbesserung bei der Aufreinigung. Eine weitere Möglichkeit, diese Methoden zu verbessern, wäre die Zugabe von carboxy-methyliertem α -Lactalbumin in das Lysat vor der Aufreinigung. Dieses Protein ist permanent falsch gefaltet und stellt daher, wie auch das Casein, einen optimalen Bindungspartner für die Chaperone dar. Unter dem Gesichtspunkt, dass carboxy-methyliertes α -Lactalbumin ein optimaler Bindungspartner für DnaK ist^{236,237} und keine Bindungsaktivität gegenüber DnaJ²³⁶ besitzt, scheint der

Erfolg dieser Optimierung zur weiteren Abreicherung von DnaJ unwahrscheinlich. Da der optimale Bindungspartner für DnaJ, das Casein,²³⁶ bereits in diesen Versuchen getestet wurde, scheint die komplette Entfernung von DnaJ aus den Elutionsfraktionen sehr schwierig bis unmöglich.

5.1.8.3 Zusammenfassung der Trennung von PKS-Chaperon-Fraktionen

Viele Polyketidenzyme, die nicht durch herkömmliche Expressionssysteme exprimiert werden konnten, können mit Hilfe von co-exprimierten Chaperonen als lösliches Protein erhalten werden. Dies konnte an PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten sowie an PedC, PedM, PedP, PedL und PsyC gezeigt werden. Die Chaperone scheinen nach der Expression sowie Aufreinigung weiterhin mit den jeweiligen Polyketidenzymen assoziiert zu sein, da sie nicht direkt durch die Affinität zur Ni-Nta-Matrix, sondern sekundär über die Wechselwirkungen mit den His-getagten Polyketidenzymen aufgereinigt werden. Diese Assoziation zwischen Chaperon und Polyketidenzymen scheint sich durch die FPLC-Experimente zu bestätigen, da auch hier - wie an PsyC gezeigt - eine weitere Aufreinigung über Ionenaustauschchromatographie und HIC nicht erfolgreich war (5.1.8.1). Auch Änderungen in der Kultivierungsstrategie (2-Schritt Kultivierung) und Änderungen bei der affinitätschromatographischen Aufreinigung (Zugabe von Mg-ATP und Casein), die in der Literatur schon erfolgreich zur Trennung von Chaperon und Zielprotein angewendet wurden,^{230,232,234} zeigen keinen Erfolg - wie an PedI3 gezeigt. Die Aktivität der Enzyme für *in vitro* Biosynthesestudien scheint durch die assoziierten Chaperone nicht beeinflusst zu sein, da am Beispiel von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten gezeigt werden konnte, dass die PedD-medierte Substratübertragungsreaktion funktionell ist. Für andere Experimente bringt die Assoziation der Chaperone an die zu untersuchenden Proteine allerdings große Probleme mit sich. Viele Biosyntheseschritte von Polyketiden werden über Intermediat-beladene Polyketidsynthasefragmente massenspektrometrisch nachgewiesen. Die Anforderungen der Probenqualität und Proteinreinheit sind sehr hoch, da sonst das Intermediat-beladene Proteinfragment nicht selektiert werden kann.¹⁶⁰ Diese Analysemethode kann aufgrund der hier erzielten Ergebnisse für Polyketidenzyme, die unter Co-Expression von Chaperonen erhalten werden, nicht durchgeführt werden.

5.2 Heterologe Expression des Pederin-Cluster

Ein weiteres Teilprojekt der vorliegenden Arbeit bestand in der heterologen Expression des Pederin-Genclusters. Ziel war es, das Pederin **20**, über die durch Rekombination modifizierten Organismen *Acinetobacter baylyi* ADP1 und *Pseudomonas stutzeri* JM 300, heterolog zu produzieren. Die Stämme sollten sich gut zur heterologen Expression von Pederin **20** eignen, da in den DNA-Bibliotheken, die zur Detektion des Pederin-Genclusters erstellt wurden, Gene gefunden wurden, die homolog zu Genen von *Pseudomonas aeruginosa* waren.⁸¹ Außerdem liegt eine Shotgun-Genom-Sequenz des Symbionten vor.⁸¹ Dies legt nahe, dass der bisher nicht-kultivierbare Pederin **20**-Produzent aus *Paederus fuscipes* nah verwandt zu Organismen der Gattung *Pseudomonas* ist. Zusätzlich eignen sich die genannten Organismen gut zur Übertragung von ganzen Genclustern, da sie die Fähigkeit zur natürlichen Transformation besitzen.²³⁸⁻²⁴² Eine erfolgreiche Expression hätte weitreichende Konsequenzen. Die bisher schlechte Bioverfügbarkeit von Pederin **20** als potentielle, hochaktive Anti-Tumorsubstanz aufgehoben, da über die heterologen Expressionsstämme die Substanz in beliebigen Mengen exprimiert werden könnte. Außerdem könnten interessante Biosynthesen nicht ausschließlich über *in vitro* Experimente mit den biosynthetisch aktiven Proteinen erfolgen, sondern ebenfalls über Knock-Out Experimente der interessierenden Gene. Zusätzlich wäre über eine gezielte Veränderung des Clusters eine kombinatorische Biosynthese und eine damit verbundene strukturelle Veränderung möglich. Beispielsweise könnte durch strukturelle Veränderungen vielleicht die Kontaktdermatitis auslösende Eigenschaft von Pederin **20** verringert werden.

Zu Beginn der Arbeiten an diesem Teilprojekt lagen schon zahlreiche Vorarbeiten von Jing He vor. Die Übertragung des kompletten Pederin-Gencluster wurde bereits über natürliche Transformation²⁴³ erfolgreich durchgeführt.²⁴⁴ Die modifizierten Stämme trugen die Bezeichnungen *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID und *Pseudomonas stutzeri* JM300 PHB65IIA. Der Nachweis der erfolgreichen Integration aller Pederin Gene konnte ebenfalls von Jing He gezeigt werden.²⁴⁴ Zusätzlich existierten die Plasmide pHB133 und pHB136 zur Komplementierung der PPTase-Gene *sfpB*, *svp* und ein *pcpS*-Homolog. Letzteres wurde über *pcpS*-spezifische Primer mittels PCR aus der metagenomischen DNA von *Paederus fuscipes* gewonnen. pHB133 oder pHB136 sollte den Expressionstämmen PPTasen zur Verfügung stellen, die die Phosphopantetheinylierung der ACPs der Pederin-PKS durchführen können.²⁴⁴

Weitere Experimente auf Basis der mRNA zeigten, dass alle Gene bis auf *pedM*, *pedN* und *pedL* transkribiert wurden.²⁴⁴ Das Fehlen der Transkripte von *pedM*, *pedN* und *pedL* machen die Expression von Pederin **20** unwahrscheinlich, da diese Gene wahrscheinlich für die Einführung der Exomethylengruppe wichtig sind.⁸⁰ Daher ist anzunehmen, dass die weitere Biosynthese ohne eine

Exomethylengruppen-Biosynthese nicht erfolgreich ist, da das nicht exomethylierte Intermediat von den weiteren Modulen der Polyketidsynthase nicht erkannt werden könnte. Daher sollte das bereits vorhandene Plasmid pHB133 so modifiziert werden, dass es die nicht transkribierten Gene unter der Regulation eines Promotors komplementierend in den Expressionstämmen zur Verfügung stellt. Dazu wurde der bidirektionale Promotor von *pedC/pedD* ausgewählt, da die mRNA von *pedD* und *pedC* bereits nachgewiesen werden konnten. Der *pedC/pedD*-Promotor bietet gegenüber dem auf pHB133 codierten und durch *m*-Toluat induzierbaren regulatorischen Elemente *xyIS*-Aktivator und P_m -Promotor den Vorteil, dass der Zeitpunkt der Prozessierung der Proteinbiosynthese zum Zeitpunkt der Pederin **20**-Expression erfolgt und nicht durch eine Induktion. Zusätzlich sollte die Chloramphenicol-Resistenz von pHB133 und pHB136 mit der Apramycin-Resistenz ausgetauscht werden, da die verwendeten Stämme resistent gegenüber Chloramphenicol sind.²⁴⁴

5.2.1 Klonierungen der *pedM,N,L*-komplementierenden Plasmide

Als Grundlage für die Klonierungen dienten die Plasmide pHB133, pHB145 und pHB136 (Abb. 5-55). Das Plasmid pHB133 enthält, wie schon erwähnt, die komplementierenden PPTasen. Damit dieses Plasmid die Fähigkeit erlangt auch die Gene *pedN*, *pedM* und *pedL* zu exprimieren wurden die Gene aus pHB143 mittels *Bam*HI/*Bg*II ausgeschnitten und in die *Bam*HI-Schnittstelle von pHB133 ligiert. Das entstandene Plasmid trägt die Bezeichnung pHN1005. Das Plasmid pHB136 enthielt schon die Gene *pedN*, *pedM* und *pedL*, die PPTase-Gene sowie die Gene *pedP*, *pedD*, *pedC*, *pedB*, *pedA*, *pedO*, *pedE*. Somit standen zwei Plasmide (pHB136, pHN1005) zur Verfügung, die die Möglichkeit bieten, die nicht transkribierten Gene zu komplementieren. Zum sinnvollen Einsatz mussten die regulativen Elemente (*xyIS*/ P_m -Promotor) sowie die Resistenz (Chloramphenicol) der Plasmide ausgetauscht werden. Da dies über herkömmliche Klonierungsmethoden aufgrund von fehlenden, geeigneten Schnittstellen nicht erfolgen konnte, wurde dies mit der λ -red Rekombination durchgeführt.^{245,246} Diese Methode erlaubt die Modifizierung von Plasmiden durch homologe Rekombination. Die Expression der pKD46-codierten λ -Phagen-Proteine Red α (*exo*), Red β (*bet*) und Red γ (*gam*) führt in *E. coli* BW25113 zu dramatisch gesteigerten Rekombinationsraten.²⁴⁷ Lineare DNA-Fragmente können dadurch, nachdem sie in den entsprechenden Stamm elektroporiert wurden, durch Doppelcrossover in eine Zielregion zirkulärer DNA integriert werden. Die Position der Integration wird durch kurze homologe Sequenzen am Ende der linearen DNA-Fragmente gesteuert. Diese können durch PCR-Amplifizierung mit entsprechenden Primern eingeführt werden.

Dazu musste ein PCR-Templat generiert werden, über das ein Fragment amplifiziert werden konnte, das über die homologe Rekombination gezielt in die Plasmide integriert und dabei den *pedC/pedD*-Promotor gegen den *xyIS*/ P_m -Promotor sowie die Chloramphenicol-Resistenz gegen eine Apramycin-Resistenz austauscht. Dazu wurde der *pedC/pedD*-Promotor mittels spezifischer Primer

amplifiziert (Tab. 6-11) und auf Basis einer T/A-Klonierung (6.5.14) in den Vektor pBluescript SK(+) ligiert. Als Templat wurde das Cosmid pPD23E7 verwendet.³⁸ Als weiteres Fragment wurde über die Schnittstelle *Pst*I die Apramycin-Resistenz (Primer, Tab. 6-11) eingefügt. Bei der Amplifikation der Fragmente wurden die Primer so ausgewählt, dass das letztendliche Rekombinationsfragment ca. 40 bp homolog zur Integrationsstelle aufweist und einen korrekten *exo*-, *bet*- und *gam*-medierten Austausch gewährleistet. Die fertiggestellten Templat-Plasmide tragen die Bezeichnung pHN1011a und pHN1011b. Der Unterschied zwischen den Plasmiden liegt in zwei verschiedenen Orientierungen der Apramycin-Resistenz. Eine Behinderung der Transkription der Pederin-Strukturgene mit der Resistenz wurde dadurch ausgeschlossen.

Die homologe Rekombination wurde in *E. coli* BW25113 pKD46 durchgeführt. Hierzu wurden die Plasmide pHB136 bzw. pHN1005 in *E. coli* BW25113 pKD46 elektroporiert. Die genaue Vorgehensweise ist unter 6.5.19 beschrieben. Zur homologen Rekombination wird das PCR-Produkt zusätzlich in den erhaltenen Stamm elektroporiert und es erfolgt der Austausch von Chloramphenicol Resistenzgen/*xy*/*S*-Aktivator/ P_M -Promoter gegen Apramycin Resistenzgen/*pedC*/*pedD*-Promoter. Die entstandenen Plasmide wurden mit pHN1014a und pHN1014b sowie pHN1015a und pHN1015b. Dabei resultieren die Plasmide pHN1014a und b aus pHB136 sowie pHN1015a und b aus pHN1005. Die Unterscheidung in a und b erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Orientierung der Apramycin-Resistenz in den Plasmiden. Die Analyse der erhaltenen Plasmide erfolgte entsprechend 6.5.19.3. Abb. 5-55 stellt die Vorgehensweise schematisch dar.

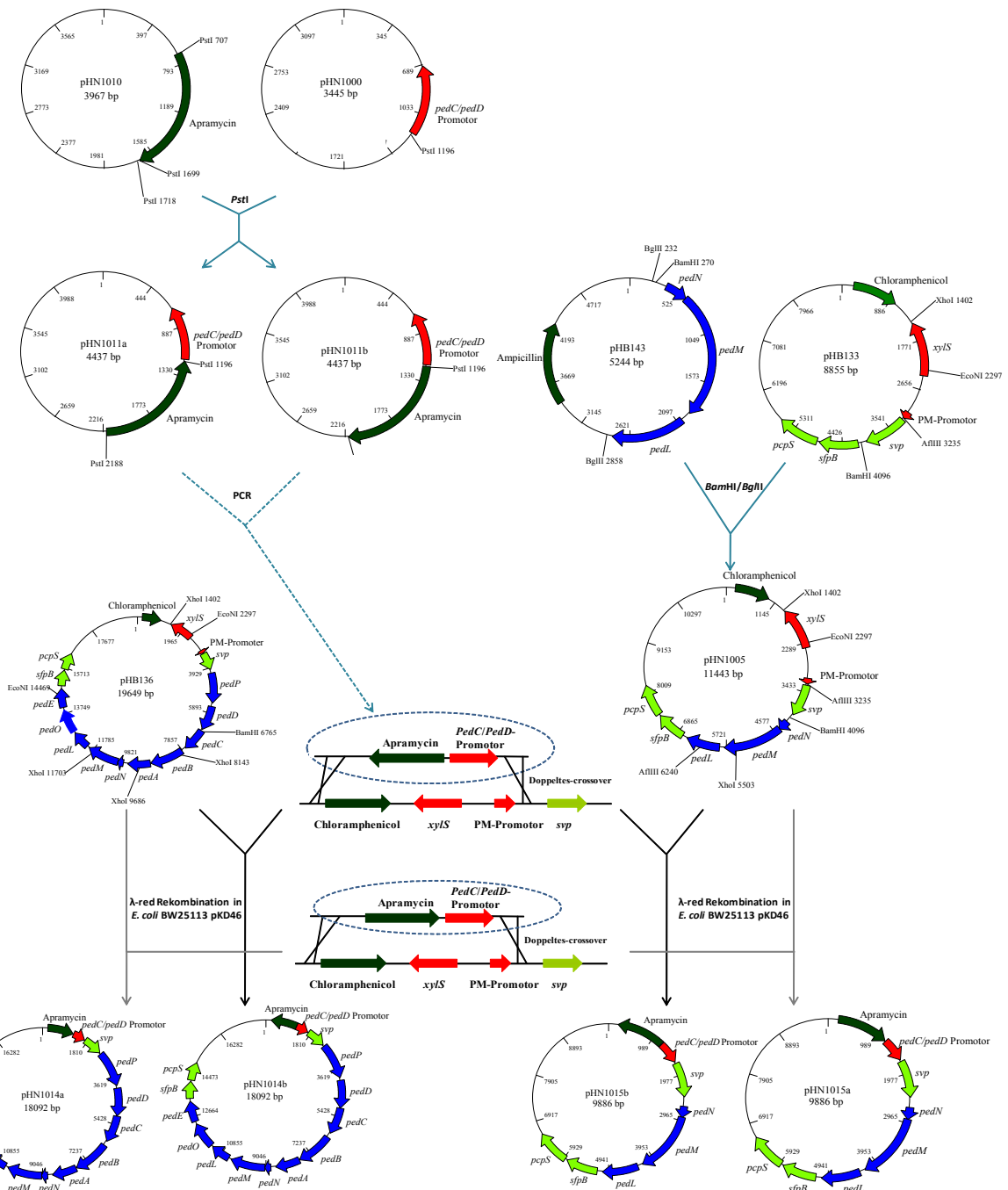


Abb. 5-55: Schematische Darstellung der λ -red medierte Klonierung der *pedN*, *pedM* und *pedL* komplementierenden Plasmide.

5.2.2 Transkriptionsanalysen

Zur Analyse der komplementierenden Funktion der erhaltenen Plasmide wurden diese in *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID und *Pseudomonas stutzeri* JM300 PHB65IIA transformiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Elektroporation in *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID für die Plasmide pHN1014a und b sowie pHN1015a und b erfolgreich war. Die Transformation der Plasmide in *Pseudomonas stutzeri* JM300 PHB65IIA war für pHN1015a und b erfolgreich. Dagegen konnten die Plasmide pHN1014a und b, vermutlich aufgrund ihrer Größe nicht transferiert werden. Die Stämme

Acinetobacter baylyi ADP1 PHB65IID pHN1014a, pHN1014b, pHN1015a und pHN1015b wurden daraufhin über Nacht angezogen und eine RNA-Isolierung (6.5.5) vorgenommen (Abb. 5-56, (a)). Daraufhin konnte durch eine Kontroll-PCR mit spezifischen Primern für Gene des Pederin-Cluster, nachgewiesen werden, dass keine DNA in den Proben vorhanden ist (Abb. 5-56, (b)).

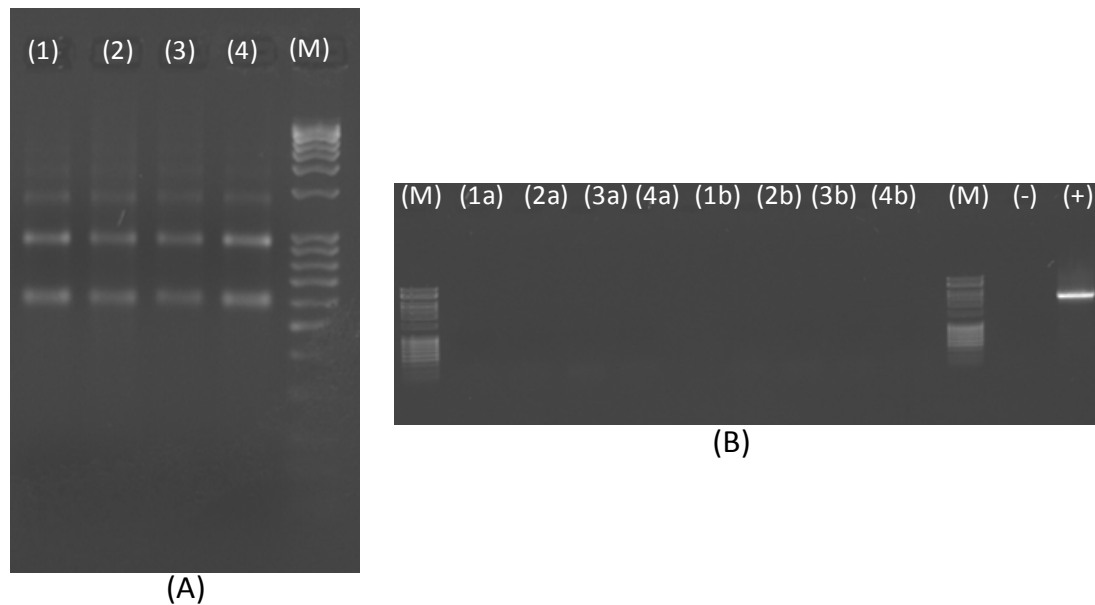


Abb. 5-56: Agarose-Gele zur Kontrolle der RNA-Isolierung.

(A) RNA-Isolation. (B) Ausschluss von DNA-Kontaminationen.

(M) Marker: 100 bp-Leiter extended; RNA von (1) *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1014a, (2) *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1014b, (3) *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1015a, (4) *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1015b. (a) PCR mit Primer *pedF* 5'-Ende, (b) PCR mit Primer *pedO,P*; (+) Positivkontrolle (Cosmid pPS8F8 mit Primer *pedO,P*); (-) Negativkontrolle (ohne Templat).

Nach den erfolgten Experimenten konnte mittels RT-PCR Experimenten (6.5.2) die Analyse der Transkription der Pederin-Gene erfolgen (Abb. 5-57). Dazu wurde ein erstes mRNA-Screening durchgeführt, dass bei den Produkten *pedCBA*, *pedF* 5'-Ende, *pedF* 3'-Ende, *pedG*, *pedI* 5'-Ende, *pedLMN* und *pedOP* nicht bei allen eingesetzten Gesamt-RNA Proben der Stämme ein eindeutiges Ergebnis lieferten (Abb. 5-57, A). Diese Reaktionen wurden zum eindeutigen Nachweis der mRNA wiederholt (Abb. 5-57, B). Bei *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1014a konnten die Transkripte für *pedCBA*, *pedF* 5'-Ende, *pedF* 3'-Ende, *pedG*, *pedH* 3'-Ende, *pedI*-3'-Ende, *pedJ*, *pedK*, *pedLMN* und *pedOP* nicht detektiert werden. Daher wurde dieser Stamm nicht weiter auf vorhandene mRNA untersucht und auch nicht in den Expressionsexperimenten eingesetzt (5.2.3). In den Wiederholungsexperimenten (Abb. 5-57, B) konnten die in der ersten Reaktion nicht eindeutig zu detektierenden Banden detektiert werden, was das Vorhandensein der mRNA für alle Pederin Gene nachweist. Besonders wichtig war der Nachweis der mRNA für *pedNML*, da diese Transkripte in den Untersuchungen der Gesamt-RNA der Stämme ohne der komplementierenden Plasmide fehlte.²⁴⁴ Daraus ergab sich, dass die mRNA von *pedNML* in den Stämmen *Acinetobacter baylyi* ADP1

PHB65IID pHN1015a, *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1015b und *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1014a transkribiert wird und die komplementierenden Plasmide funktionell sind.

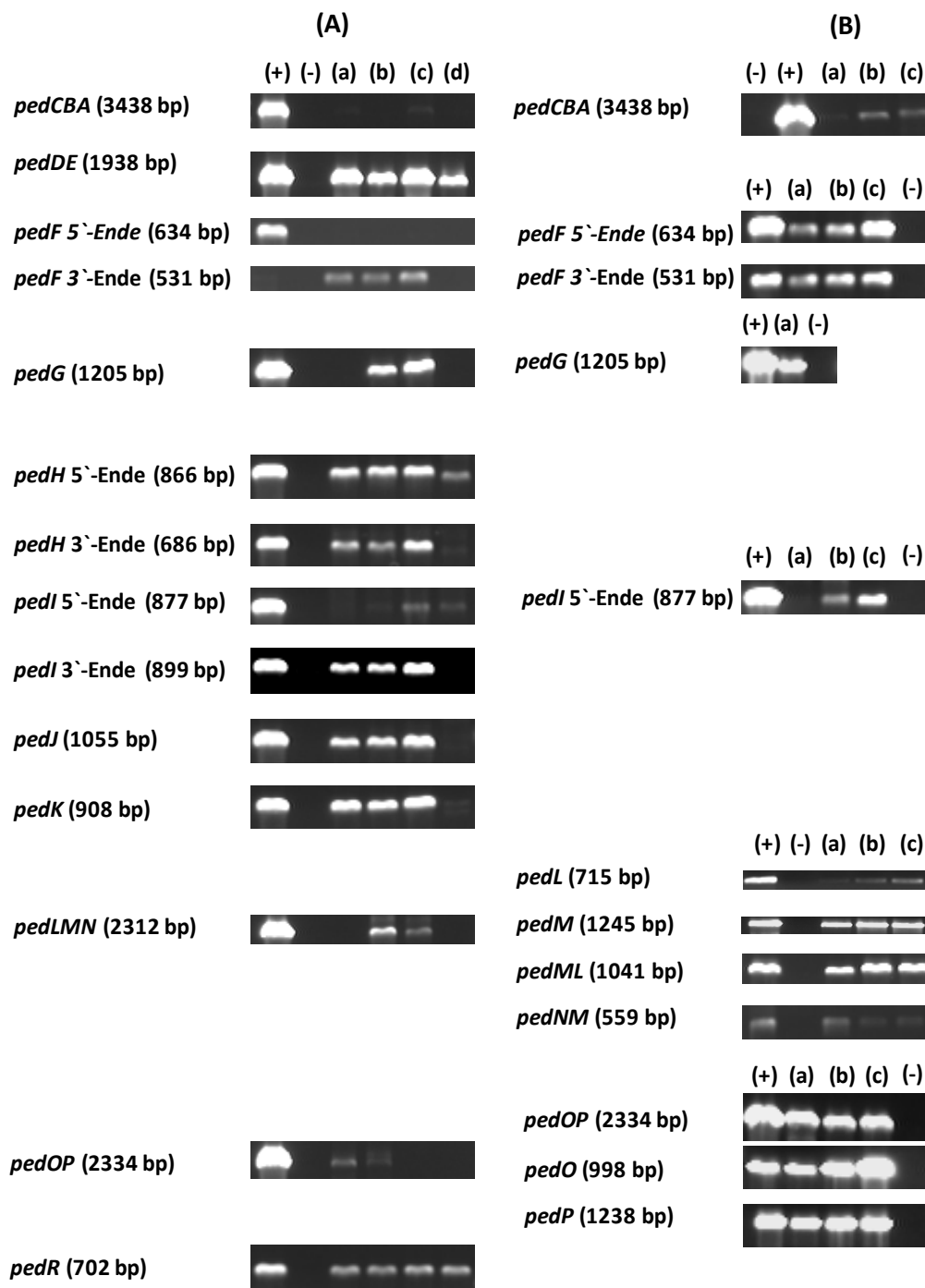


Abb. 5-57: Analyse der RT-PCR.

(A) Ergebnisse der ersten Reaktionen. (B) Ergebnisse der Wiederholungsreaktionen auf die Gene, die nach der ersten Reaktion kein eindeutiges Ergebnis geliefert haben.

(A und B) Als Templat wurde die RNA von (a) *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1015a, (b) *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1015b, (c) *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1014a und (d) *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1014b verwendet. (+) Positivkontrollen. (Templat Cosmid mit entsprechenden Genen (vgl. Tab. 6-1); (-) Negativkontrollen. Die Proben wurden identisch zu den RT-PCR Proben behandelt, allerdings wurde im Thermocycler das Temperaturprofil der Reverse-Transkriptase-Reaktion entfernt, sodass keine mRNA in die cDNA umgeschrieben werden konnte.

Somit wurde nachgewiesen, dass alle Gene des Pederin-Clusters in den Stämmen transkribiert werden. Die Transformationen von *Pseudomonas stutzeri* JM300 PHB65IIA mit den komplementierenden Plasmiden pHN1015a und pHN1015b erfolgten zeitlich versetzt, sodass eine RNA-Isolierung dieser Stämme erst nach den mRNA Nachweisen in den *Acinetobacter*-Stämmen hätte erfolgen können. Da eine erfolgreiche Transkription von *pedNML* über die Plasmide pHN1015a und b bereits bei den *Acinetobacter*-Stämmen erfolgte und der Nachweis aller übrigen Transkripte durch den im Genom integrierten Pederin-Cluster erfolgen, wurden hier keine Transkriptionsanalysen durchgeführt. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die Plasmide in den Stämmen ebenfalls für die Transkription der Gene *pedNML* verwendet werden können, da die Organismen *Pseudomonas* und *Acinetobacter* nah verwandt sind. Die Stämme wurden auf eine Pederin **20**-Biosynthese untersucht (5.2.3).

5.2.3 Expressionsexperimente

Aufgrund der Transkription des kompletten Satzes der Pederin Gene wurden die Stämme *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1015a, *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1015b und *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID pHN1014a sowie *Pseudomonas stutzeri* JM300 PHB65IIA pHN1015a und *Pseudomonas stutzeri* JM300 PHB65IIA pHN1015b auf eine Biosynthese von Pederin **20** getestet. Dabei wurden unterschiedliche Kultivierungsbedingungen verwendet (Tab. 5-4).

Tab. 5-4: Kultivierungsbedingungen bei der Pederin **20**-Expression.

Medium	Volumen [mL]	Stamm	Temperatur [°C]	Kultivierungsdauer [d]	Kolben
LB-Agar	ca. 300	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1015a	30	10	-
LB-Agar	ca. 300	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1015b	30	10	-
LB-Agar	ca. 300	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1014a	30	10	-
LB-Agar	ca. 300	<i>P. stutzeri</i> JM300 PHB65IIA pHN1015a	30	10	-
LB-Agar	ca. 300	<i>P. stutzeri</i> JM300 PHB65IIA pHN1015b	30	10	-
M9-Agar	ca. 300	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1015a	30	10	-
M9-Agar	ca. 300	<i>A. r. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1015b	30	10	-
M9-Agar	ca. 300	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1014a	30	10	-
M9-Agar	ca. 300	<i>P. stutzeri</i> JM300 PHB65IIA pHN1015a	30	10	-
M9-Agar	ca. 300	<i>P. stutzeri</i> JM300 PHB65IIA pHN1015b	30	10	-
LB-Flüssigkultur	400 u. 500	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1015a	16, 20 u. 24	7, 14	Ohne Schikane
LB-Flüssigkultur	400 u. 500	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1015b	16, 20 u. 24	7, 14	Ohne Schikane

Fortsetzung Tab. 5-4:

Medium	Volumen [mL]	Stamm	Temperatur [°C]	Kultivierungsdauer [d]	Kolben
LB-Flüssigkultur	400 u. 500	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1014a	16, 20 u. 24	7, 14	Ohne Schikane
LB-Flüssigkultur	400 u. 500	<i>P. stutzeri</i> JM300 PHB65IIA pHN1015a	16, 20 u. 24	7, 14	Ohne Schikane
LB-Flüssigkultur	400 u. 500	<i>P. stutzeri</i> JM300 PHB65IIA pHN1015b	16, 20 u. 24	7, 14	Ohne Schikane
LB-Flüssigkultur	500	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1015a	20	7, 14	Mit Schikane
LB-Flüssigkultur	500	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1015b	20	7, 14	Mit Schikane
LB-Flüssigkultur	500	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1014a	20	7, 14	Mit Schikane
LB-Flüssigkultur	500	<i>P. stutzeri</i> JM300 PHB65IIA pHN1015a	20	7, 14	Mit Schikane
LB-Flüssigkultur	500	<i>P. stutzeri</i> JM300 PHB65IIA pHN1015b	20	7, 14	Mit Schikane
M199-Flüssigkultur	50	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1015a	30	5	Ohne Schikane
M199-Flüssigkultur	50	<i>A.r sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1015b	30	5	Ohne Schikane
M199-Flüssigkultur	50	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1014a	30	5	Ohne Schikane
HSG Flüssigkultur	400	<i>P. stutzeri</i> JM300 PHB65IIA pHN1015a	20	7	Ohne Schikane
HSG Flüssigkultur	400	<i>P. stutzeri</i> JM300 PHB65IIA pHN1015b	20	14	Ohne Schikane
Landy-Flüssigkultur	400	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1015a	30, 24	7	Ohne Schikane
Landy-Flüssigkultur	400	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1015b	30,24	7	Ohne Schikane
Landy-Flüssigkultur	400	<i>A. sp.</i> ADP1 PHB65IID pHN1014a	30,24	7	Ohne Schikane
Landy-Flüssigkultur	400	<i>P. stutzeri</i> JM300 PHB65IIA pHN1015a	30,24	7	Ohne Schikane
Landy-Flüssigkultur	400	<i>P. stutzeri</i> JM300 PHB65IIA pHN1015b	30,24	7	Ohne Schikane

Die Expressionskulturen wurden nach der Kultivierung mit Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel abgedampft und die verbleibenden Rückstände mittels LC-MS Messungen auf vorhandenes Pederin **20** untersucht. Als Positivkontrolle konnten Kultivierungen von *Acinetobacter baylyi* ADP1 und *Pseudomonas stutzeri* JM300 verwendet werden, der aufgereinigtes Pederin **20**⁹¹ zugegeben und analog kultiviert, extrahiert und analysiert wurde. Dadurch konnte außer der Funktion als Positivkontrolle ebenfalls ausgeschlossen werden, dass die Stämme katabolische Enzyme für Pederin **20** besitzen und Pederin **20** möglicherweise abbauen. Außerdem wurde damit überprüft, ob über die Extraktion Pederin **20** aus der Kultivierung isoliert und mittels LC-MS detektiert werden kann. Als Negativkontrolle diente eine Kultivierung von *Acinetobacter baylyi* ADP1 und *Pseudomonas stutzeri* JM300 die analog zu den Pederin-Expressionsstämmen kultiviert wurde.

Die Analysen ergaben jedoch keine Hinweise auf produziertes Pederin **20** (Daten nicht dargestellt). Durch eine Veränderung der Expressionsbedingungen (Temperatur (16 °C, 20 °C, 24 °C und 30 °C), Flüssigkultur gegenüber Kultur auf Agarplatten, komplexe Medien gegenüber Minimalmedien (LB-, HSG-, M9- und Landy²⁴⁸-Medium) und die Verwendung unterschiedlicher Kultivierungszeiträume (5 bis 14 d)) konnte keine Pederin **20**-Produktion gezeigt werden. Auch eine getrennte Aufarbeitung der Zellen und des Mediums hatte keine Detektion von Pederin **20** zu Folge. Daher war die Biosynthese von Pederin **20** unter den verwendeten Bedingungen nicht erfolgreich. Zusätzlich wurden die Massenspektren auf Intermediate der Pederin **20**-Biosynthese untersucht. In der Biosynthese des Bacillaens **30** konnte beobachtet werden, dass durch ein Fehlen der Thioesterase am Ende des Clusters Intermediate von den einzelnen Modulen hydrolysiert werden und über LC-MS detektiert werden konnten.²⁴⁹ Daher hätte es sein können, dass die Pederin **20**-Biosynthese in den Stämmen bis zu einem bestimmten Intermediat katalysiert worden wäre und hier ebenfalls eine Hydrolyse des entsprechenden Intermediats vorhanden gewesen wäre. Die Massen der Intermediate konnten in den Massenspektren ebenfalls nicht gefunden werden. Zusätzlich wurde nach Intermediaten gesucht, die keine C-6-Hydroxylierung und C5-Methylierung aufweisen, da der Zeitpunkt dieser Funktionalisierung bisher nicht aufgeklärt werden konnte. Auch diese Intermediate konnten nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse bestätigten sich in einer Dünnschichtchromatographischen Analyse der *Pseudomonas* Stämme (Abb. 5-58) und *Acinetobacter*-Stämme (Daten nicht dargestellt).

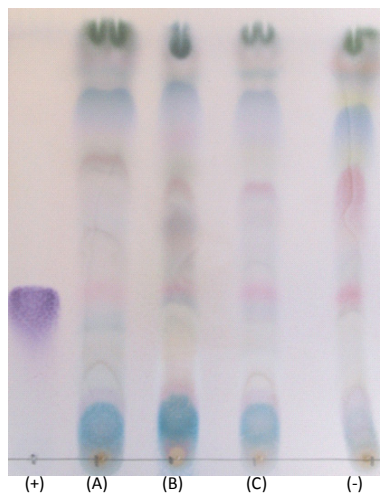


Abb. 5-58: Dünnschichtchromatographische Analyse der Kultivierungsextrakte.

(+) gereinigtes Pederin **20**⁹¹; (A) *Pseudomonas stutzeri* JM300 PHB65IIA pHN1015a; (B) *Pseudomonas stutzeri* JM300 PHB65IIA pHN1015b; (C) *Pseudomonas stutzeri* JM300 PHB65IIA ; (-) *Pseudomonas stutzeri* JM300.

5.2.4 Analyse der nicht vorhandenen Pederin-Produktion

Da aus den Kultivierungen weder Pederin **20** noch eines der Intermediate nachgewiesen werden konnte, wurde nach Gründen gesucht, die für die Ursache der fehlenden Expression zuständig sein

könnten. Im Allgemeinen sollten *Pseudomonas* spp. und die nah verwandten *Acinetobacter* spp. in der Lage sein, die Biosynthese von Polyketiden durchzuführen, da sie unter anderen die Polyketide Mupirocin **29**²⁵⁰ und Coronatin²⁵¹ herstellen. Dies lässt vermuten, dass die biosynthetische Maschinerie für die Biosynthese von Polyketiden vorhanden sein sollte. Allerdings kann dies auch Stamm-abhängig sein und nicht in jedem *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter* spp. vorhanden sein. Auch das erforderliche Substrat für die Biosynthese sollte vorhanden sein, da für die Biosynthese des Pederins **20** Substrate des Primärstoffwechsels (Malonyl-CoA **6**) ausreichen sollten. Außerdem sollten die Stämme in der Lage sein, die Phosphopantetheinylierungen der ACPs und PCPs durchzuführen. Falls die verwendeten Stämme keine geeigneten PPTasen zur Phosphopantetheinylierungsreaktion der Pederin-ACPs besitzen sollten, kann diese Funktion von den komplementierenden Plasmiden (Abb. 5-55) übernommen werden. Die auf den Plasmiden codierte PPTase *svp* wurde bereits erfolgreich auf eine Phosphopantetheinylierung der ACPs der Pederin **20**-Biosynthese getestet (vgl. 5.1.1.8).

Aufgrund der Betrachtungen bezüglich der Substratverfügbarkeit, der Einführung von posttranslationalen Modifikationen und der allgemeinen Betrachtung über die Organismen Polyketide zu exprimieren, weisen die Ergebnisse auf Probleme bei der Proteinbiosynthese hin. Diese könnten auf Basis des Codongebrauchs existieren. Mit Hilfe der Software „Graphical Codon Usage Analyzer“²⁵² wurde der Codongebrauch des Pederin-Clusters mit der der verwendeten Stämme verglichen. Da der Codongebrauch des Stammes *Pseudomonas stutzeri* JM300 aufgrund der bisher fehlenden Sequenzierung des Genoms nicht bekannt war, wurde alternativ der Codongebrauch mit *Pseudomonas aeruginosa* verglichen. Die Auswertung erfolgte dabei auf Basis der relativen Adaptivität.²⁵³ Dies bedeutet, dass die Anzahl der vorhandenen Codons einer Spezies in Beziehung dazu gesetzt werden, wieviele Codons insgesamt für die spezifische Aminosäure kodieren. Dabei wird die meist verwendete Aminosäure auf 100 normiert und alle anderen demgemäß eingeordnet. Da der Algorithmus des Programmes maximal mit einem Datensatz von 10000 bp rechnen kann wird in Abb. 5-59 das Ergebnis der ersten 10000 bp der kodierenden Pederingene dargestellt. Die relative Adaptivität der verbleibenden codierenden Pederinsequenzen wies tendenziell das gleiche Ergebnis auf wie das, der ersten 10000 kodierenden Basenpaare und wurde daher nicht dargestellt.

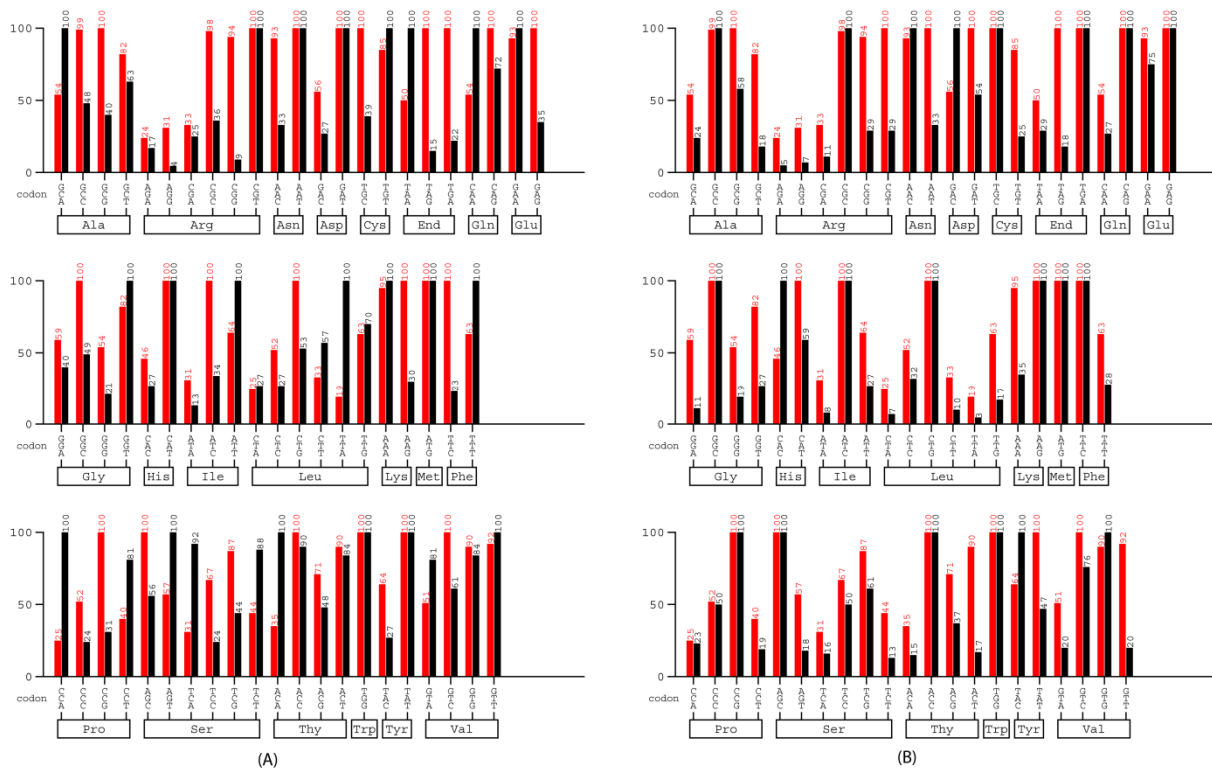


Abb. 5-59 Vergleich der relative Adaptivität des Codongebrauchs des Pederin-Cluster mit der der zur heterologen Expression verwendeten Stämme.

(A) *Acinetobacter baylyi* ADP1 (schwarze Säulen) vs. Pederin-Cluster (rote Säulen), (B) *Pseudomonas aeruginosa* (schwarze Säulen) vs. Pederin-Cluster (rote Säulen).

Die Vergleiche des Codongebrauchs des Pederin-Clusters und der Expressionsstämme ergaben, dass im Pederin-Cluster einige Triplets Aminosäuren kodieren, die in dem Codongebrauch der Expressionsstämme so gut wie gar nicht verwendet werden. Gravierende Unterschiede bezüglich der relativen Adaptivitäten von AGG und CGG (jeweils kodierend für Arg) zeigten sich bei *Acinetobacter baylyi* ADP1 bei einem Vergleich mit dem Pederin-Cluster (Abb. 5-59, A). Auch bei *Pseudomonas* sp. konnte ein moderater Unterschied bezüglich der relativen Adaptivitäten für die Codons AGA und AGG (Arg), ATA (Ile) sowie CTA, CTT und TTA (kodierend für Leu) festgestellt werden (Abb. 5-59, B). Ein Problem war, dass keine Forschungsarbeiten existieren, die Grenzwerte für die relativen Adaptivitäten festlegt. Daher konnte keine Aussage getroffen werden, ab welchen Differenzen in der relativen Adaptivität die heterologe Expression auf Probleme stoßen könnte. Allerdings könnte es durchaus sein, dass aufgrund des Codongebrauchs eine heterologe Expression des Pederin-Clusters erschwert wird. Eine Lösung diesbezüglich könnte eine rekombinante Komplementierung der selten verwendeten tRNAs darstellen. In *E. coli* führte diese Methode in zahlreichen Fällen zu einer erfolgreichen Expression von Proteinen.^{103,254} Außerdem könnte der Codongebrauch des Pederin-Clusters an den der Stämme angepasst werden. Diese Methode wurde auch an PKS-Genen in vielen Fällen erfolgreich angewendet.²⁵⁵⁻²⁵⁷ Allerdings wäre dies, unter Berücksichtigung der Größe des Pederin-Clusters, ein enormer Aufwand.

Ein weiterer Grund für die fehlende Pederin **20**-Produktion könnten Bedingungen im intrazellulären Umfeld darstellen. Beispielsweise sind in einigen Fällen Chaperone bei der Proteinfaltung von PKSs beteiligt. An der Albicidin-Biosynthese konnte gezeigt werden, dass ein Homolog des HtpG-Chaperon von *E. coli* notwendig für die Biosynthese des Naturstoffes ist.¹¹² Allerdings besitzen die verwendeten Stämme ein zu *htpG* homologes Gen. Andererseits scheint die absolute Notwendigkeit dieser Proteine fraglich, da bisher selten diese Gene in Polyketid-Clustern gefunden wurde.¹¹⁴ Außerdem konnte bisher nicht gezeigt werden, dass inaktive Gencluster auf Mutationen zurückzuführen sind, die in den Genen von Chaperonen lokalisiert sind.¹¹⁴ Dennoch kann es nicht ausgeschlossen werden, dass die fehlende Biosynthese des Pederin **20** auf diesen Faktoren beruhen.

Die weitere Untersuchung der Expressionsstämme im Hinblick auf exprimierte Proteine erfolgt derzeit in der Arbeitsgruppe von Professor Schweder an der Universität Greifswald. Unter Umständen könnten diese Proteom-Untersuchungen aufklären, welche der PKS-Proteine erfolgreich aus der mRNA translatiert werden und welche nicht.

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse beschäftigten sich mit der Expression und Untersuchung von Enzymen der Pederin **20**- und Psymberin **21**-Biosynthese. Für die Expression stehen, nach den im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Expressionen, eine Reihe von Methoden zur Verfügung, mit der 14 Enzyme der Pederin- und Psymberin-PKS in sehr guten bis ausreichenden Konzentrationen in löslicher Form exprimiert werden konnten und sich daher offensichtlich gut zur heterologen Expression von PKSs aus bakteriellen Symbionten eignen. Die Optimierung der Proteinexpression erfolgte hauptsächlich über eine Co-Expression von Chaperonen, die Verwendung unterschiedlicher Promotoren und Aufreinigungs-Tags, die Variation der Expressionstemperatur und die Zugabe von Detergentien bei der Aufreinigung der Proteine. Es konnten sowohl einzelne Domänen als auch ganze Module exprimiert werden. Davon zeigten PedI3, dessen Linkerfusionsprodukte sowie PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ in Kombination mit der AT PedD bereits Aktivität (5.1.2.2). Besonders die Co-Expression von Chaperonen zeigte sich bei vielen Proteinen (PedI3 und Linkerfusionsprodukte (5.1.1.6), PedC (5.1.2.1), PedM (5.1.4.2), PedL (5.1.4.2), PedP (5.1.4.2) und PsyC (5.1.5.2)) als sehr hilfreich, da sie hierdurch im Gegensatz zu herkömmlichen Proteinexpressionsmethoden in löslicher Form exprimiert werden konnten. Jedoch war die Aufreinigung des Zielproteins häufig mit einer Co-Elution von Chaperonen verbunden. Dies führte in den folgenden Enzymassays teilweise zu Problemen. Die angewendeten Methoden sollten weiter verbessert werden. Außerdem sollten weitere Reinigungsmethoden bei der Trennung von Zielprotein und Chaperon getestet werden, damit die massenspektroskopische Analyse von Intermediat-beladenen Proteinfragmenten möglich wird.

Bei der Charakterisierung der *trans*-AT-mediierten Substratübertragung auf ACPs konnte bei der Pederin-PKS festgestellt werden, dass PedD für die Übertragung des Elongationssubstrats Malonyl-CoA **6** zuständig ist. Hierzu konnten die ACPs der Pederin-PKS PedN,⁹¹ die Doppel-ACP von PedI3⁹¹ sowie das komplette Modul PedI3 und Linkerfusionsprodukte (5.1.1.6) exprimiert werden. Ebenfalls erfolgreich war die Expression der beiden Psymberin ACPs PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ (5.1.1.7). Die für die Aktivität der ACPs wichtige posttranslationale Modifikation der Phosphopantetheinylierung konnte in allen Fällen durch die Co-Expression der PPTase Svp erreicht werden und entweder mittels Massenspektrometrie (5.1.1.8) oder indirekt durch eine erfolgreiche Substratübertragung auf die *holo*-Form und fehlende Substratübertragung auf die *apo*-Form (5.1.2.2) nachgewiesen werden. Der Einsatz der Enzyme in den Assays (5.1.2.2) zeigte, dass PedD Malonyl-CoA **6** im Gegensatz zu Acetyl-CoA **5** auf alle exprimierten ACPs überträgt. Die Übertragung erfolgte nicht bei der *apo*-Form der ACPs. Somit besitzt PedD eine Substratspezifität jedoch keine ACP-Spezifität. Die Reaktion konnte zusätzlich kinetisch charakterisiert werden (5.1.3). Hierzu wurden die AT PedD und die ACPs PedN und PsyA-ACP₃ bei 10 °C in einem gekoppelten Assay (Abb. 5-25) eingesetzt. Die Messdaten zeigten einen typischen Verlauf einer Michaelis-Menten Kinetik und

ergaben für die PedD-katalysierte Substratübertragung auf PedN einen Wert für K_M von 2,3 μM , für k_{cat} von 0,045 s^{-1} sowie für $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ von 0,019 $\text{s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. Die PedD-katalysierte Substratübertragung auf das ACP PsyA-ACP₃ zeigte einen K_M von 1,7 μM , einen k_{cat} von 0,044 s^{-1} sowie einen $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ von 0,0257 $\text{s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. Die Selbstacylierungsreaktion von PedN ergab für K_M 54 μM , für k_{cat} 0,005 s^{-1} sowie für $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ 0,00009 $\text{s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$. Die Selbstacylierungsreaktion von PsyA-ACP₃ wurde K_M zu 131 μM , k_{cat} zu 0,0059 s^{-1} sowie $k_{\text{cat}} \times K_M^{-1}$ zu 0,000045 $\text{s}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$ ermittelt. Die zweite AT PedC aus dem Pederin-Cluster konnte als C-terminales Strep-Tag Protein und als Fusion mit dem Maltosebindeprotein⁹¹ exprimiert werden (5.1.2.1). Im Gegensatz zu PedD war es jedoch nicht in der Lage Substrate zu akzeptieren und auf die ACPs zu übertragen (5.1.2.2). Daher ist bislang nicht bekannt welche Funktion die zweite AT bei der Pederin **20**-Biosynthese übernimmt. Das PedC als evolutives, inaktives Relikt im Gencluster vorliegt ist unwahrscheinlich, da mit PedC phylogenetisch nah verwandte Proteine sehr weit verbreitet sind in *trans*-AT PKS-Genclustern. Außerdem werden inaktive Genabschnitte im Laufe der Evolution relativ schnell eliminiert. Ebenfalls ungeklärt bleibt, welches Enzym für die Übertragung des Startersubstrats (Acetyl-CoA **5**) zuständig ist. Hierzu sollten Experimente mit der GNAT-Domäne durchgeführt werden, die zeigen könnten ob die Übertragung der Startereinheit, wie bei der Biosynthese des Curacin A,⁹⁷ ebenfalls durch dieses Enzym gewährleistet wird.

Die Untersuchung der Biosynthese der Exomethylengruppe im Pederin **20** konnte im Rahmen dieser Arbeit in so weit vervollständigt werden, dass alle Enzyme für eine *in vitro*-Untersuchung in löslicher Form exprimiert werden konnten. Hierzu gehören das Modul PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukte, die KS PedM, die CR PedL, die HMGS PedP, die AT PedD und das ACP PedN (5.1.4.2). Zentraler Bestandteil der Assays stellt das Modul PedI3 dar, für das bereits durch eine erfolgreiche Substratübertragung Aktivität gezeigt werden konnte (5.1.2.2). Ebenfalls zeigte das ACP PedN und die AT PedD Aktivität (5.1.2).⁹¹ Jedoch sind für die massenspektroskopische Analytik der Assays, die herkömmlicherweise durch die Massenanalyse Intermediat-beladener Proteinfragmente erfolgt,¹⁶⁰ Verbesserungen in der Reinigung von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten sowie von PedM, PedP und PedL notwendig. Diese Proteine sind bisher in den Elutionsfraktionen der Aufreinigung mit Chaperonen verunreinigt und konnten weder mittels FPLC, noch durch die 2-Schritt Kultivierung bzw. eine Zugabe von Casein und Mg-ATP zum Lysat weiter aufgereinigt werden (5.1.8). Eine andere Möglichkeit wäre die Verbesserung der massenspektroskopischen Methode, sodass trotz der Verunreinigungen durch Chaperone eine Analytik von Intermediat-beladenen Proteinfragmenten möglich wird. Hierzu wurde getestet, ob eine Detektion der Phosphopantetheinylierung von PedI3 nach einem tryptischem In-Gel-Verdau mit folgender MALDI-TOF-TOF-MS Messung detektiert werden konnte (5.1.1.8). Da allerdings MALDI-TOF-TOF-MS Messungen im Vergleich zu anderen massenspektroskopischen Methoden eine relativ geringe Auflösung haben und nicht sicher war, ob

die Phosphopantetheinylierung während dem tryptischen Verdau und der folgenden Aufreinigung stabil ist, war dies nicht erfolgreich. Letztendlich sollten daher in weiteren Studien Optimierungen bei der Trennung von Zielprotein und Chaperon oder eine Verbesserung der massenspektroskopischen Methode dazu führen, dass die enzymatischen Reaktionen, die bei der Einführung der Exomethylengruppe involviert sind, *in vitro* untersucht werden können. Daraufhin könnten über Punktmutationen die CR-Domänen und ACP-Domänen von PedI3 einzeln inaktiviert werden und ebenfalls in den Assays getestet werden. Diese Untersuchungen könnten zeigen, welche Aufgabe in der Pederin-PKS drei CRs und zwei ACPs innerhalb von PedI3 besitzen.

Für eine Aufklärung der Funktionalisierung von Psymberin **21** durch eine Hydroxylierung in der α -Position konnten die Enzyme PsyC und PsyK exprimiert und gereinigt werden (5.1.5.2). PsyC konnte als N-terminales His-Tag Protein unter Co-Expression von Chaperonen und als Fusion mit dem Sumo-Löslichkeitstag exprimiert werden. Aufgrund einer entfernten Verwandtschaft zu Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängigen Hydroxylasen von PsyC ist es ein geeigneter Kandidat zur Einführung von Hydroxylierungen (5.1.5). Außerdem konnte durch ein Alignment das für Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängige Hydroxylasen typische und konservierte Aminosäuremotiv His¹-X-Asp/Glu-X_n-His² gefunden werden (5.1.5). Allerdings zeigten die enzymatischen Assays mit PsyC bisher keine erfolgreiche Umsetzung (5.1.5.3). Daher sollte, neben dem bisher getesteten SNAC-Substrat **33**, ebenfalls das postulierte Substrat als SNAC-Derivat **35** und CoA-Derivat **36** getestet werden. Aufgrund des bisher nicht erfolgreichen Assays wurde die Detektion von enzymgebundenem Fe mittels ICP-OES-Messungen durchgeführt (5.1.5.4). Die Messungen ergaben, dass PsyC-spezifische Eisenkonzentrationen von 1,26 (\pm 0,59) für die His₈-Fusionsproteine und 1,93 (\pm 0,70) für die Fusionen mit dem Sumo-Löslichkeits-Tag vorhanden sind. Alle anderen Elemente konnten als Co-Faktor ausgeschlossen werden oder lagen nicht in PsyC-spezifischen Konzentrationen vor. Die Detektion von Fe war nach der fehlenden Umsetzung in den Assays sowie der lediglich entfernten Verwandtschaft von PsyC zu Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängigen Hydroxylasen ein wichtiger Nachweis. PsyK ist eine FAD-abhängige Oxidoreductase und zeigt aufgrund der großen Ähnlichkeit zu einem Enzym der Myxothiazol-Biosynthese, das eine Hydroxylierung an einem Glycinrest einführt, das Potential zur Einführung einer Hydroxylierung. Es konnte als N-terminal getagtes His₈-Protein sowie als C- und N-Terminal getagtes Strep-Tag II Protein exprimiert werden (5.1.5.2). Enzymassays haben mit PsyK bisher nicht stattgefunden. Diese sollten in weiteren Studien durchgeführt werden. Falls aus den PsyC- bzw. PsyK-Assays eine Umsetzung erfolgen sollte, könnten weitere Substrate getestet werden um das Potential dieser Enzyme für die kombinatorische Biosynthese auszuloten. Unter Umständen können die Gene mit anderen PKS-Clustern rekombiniert werden, sodass die genannten Funktionalisierungen auch bei anderen Metaboliten auftreten. Dadurch könnten neue, unnatürliche Polyketide entstehen, die neue oder verbesserte Bioaktivitäten aufweisen.

In der Psymberin-PKS existiert im ersten Modul von PsyD eine Domäne, dessen Position für eine Einführung einer *O*-Methylierung in der β -Position spricht. Für die Aufklärung dieser Funktionalisierung von Psymberin **21** konnte die intermodulare Domäne PsyD *O*-MT als N-terminales His₈-Fusionsprotein und als C- und N-terminales Strep-Tag II Fusionsprotein exprimiert und gereinigt werden (5.1.6.2). Der Einsatz des His₈-Fusionsproteins in den Assays zeigte jedoch keine Umsetzung (5.1.6.3). Der Grund hierfür liegt womöglich an dem SNAC-Testsubstrat **33**, das nicht homolog zu den postulierten Substraten **35** bzw. **36** ist. Daher sollte in weiteren Assays das postulierte SNAC-Substrat **35** bzw. CoA-Substrat **36** auf eine Umsetzung getestet werden. Falls eine Umsetzung stattfinden sollte, könnten weitere Substrate getestet werden und eine mögliche Verwendung der PsyD *O*-MT in der kombinatorischen Biosynthese ausgelotet werden. Andere Polyketide könnten vielleicht durch eine solche Methoxylierung andere und verbesserte Bioaktivitäten aufweisen.

Zur heterologen Expression des Pederin-Genclusters standen die Stämme *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID und *Pseudomonas stutzeri* JM300 PHB65IIA zur Verfügung. Diese enthielten den kompletten Pederin-Gencluster. Jedoch zeigte sich in Transkriptionsanalysen, dass die Gene *pedN*, *pedM* und *pedL* nicht transkribiert werden. Zur Komplementierung wurden die Plasmide pHN1014a, pHN1014b, pHN1015a und pHN1015b kloniert (5.2.1) und die resultierenden Stämme erneut auf die Transkription der Pederin-Gene getestet. Es konnte eine Transkription des kompletten Satzes der Pederin-Gene nachgewiesen werden (5.2.2). Allerdings zeigte sich keine Pederin **20**-Produktion (5.2.3). Ein möglicher Grund könnte auf Ebene der Translation liegen, da der Codongebrauch der Expressionsstämme Abweichungen zum Codongebrauch des Pederin-Clusters aufweist (5.2.4). Um dies weiter zu untersuchen könnte beispielsweise ein Plasmid konstruiert werden, das die selten verwendeten tRNAs in den Expressionsstämmen komplementiert und dadurch eine Pederin **20**-Produktion ermöglicht. Die Möglichkeiten, die sich aus einer nachhaltigen Pederin **20**-Produktion ergeben würden, wären weitreichend. Die bisher geringe Bioverfügbarkeit der Substanz wäre aufgehoben, eine *in vivo* Aufklärung der Biosynthese wäre möglich und durch rekombinante Techniken könnten neue Pederin-Derivate realisiert werden, die vielleicht neue oder spezifischere, antitumorale Aktivitäten aufweisen würden. Zudem wäre es unter Umständen möglich, die ungewollte Bioaktivität der Kontaktdermatitis zu dezimieren oder ganz zu annullieren.

6 Material und Methoden

6.1 Cosmide, Vektoren, Plasmide und Organismen

6.1.1 Cosmide

Ausgangspunkt für Klonierungen in Expressionsvektoren zur heterologen Proteinexpression waren Cosmide, aus heterologen DNA-Bibliotheken (Tab. 6-1).^{38,61,80} Die Cosmide dienen auch als Positivkontrollen in PCR- und RT-PCR Experimenten.

Tab. 6-1: Verwendeten Cosmide.

Genclustertzugehörigkeiten	Bezeichnung	Kodierte Biosynthesegene
Pederin-Cluster	pPD23E7	<i>pedA, pedB, pedC, pedD, pedE, pedF</i> 5'-Ende
	pPS8F8	<i>pedN, pedM, pedL, pedO, pedP, pedQ, pedR</i>
	pPD9F12	<i>pedG, pedH, pedF</i> 3'-Ende
	pPS9D2	<i>pedI, pedJ, pedK</i>
Psymberin-Cluster	pPSKF1	<i>psyA, psyD, psyC</i>
	pPSCG2	<i>psyK</i>

6.1.2 Vektoren und Plasmide

Für die Klonierung der *ped*-Gene zur heterologen Genexpression dienten verschiedene Vektoren. Zum Einen wurden Vektoren für die Lagerung und Sequenzierung von PCR-Produkten (Tab. 6-2) und zum Anderen Vektoren für die eigentliche Proteinexpression (Tab. 6-3) verwendet. Plasmide für die Co-Expression verschiedener Chaperone sind in Tab. 6-4 dargestellt.

Tab. 6-2: Vektoren zur Lagerung und Sequenzierung von amplifizierten PCR-Fragmenten (Plasmidkarten unter 9.1.1).

Vektor	Resistenz (verwendete Konzentration)	Herkunft
pBluescript SK(+)	Ampicillin (100µg x mL ⁻¹)	Fa. Stratagene
pCR2.1 TOPO	Kanamycin (50µg x mL ⁻¹)	Fa. Invitrogen
pGEM-T Easy	Ampicillin (100µg x mL ⁻¹)	Fa. Promega

Tab. 6-3: Vektoren zur Proteinexpression (Plasmidkarten unter 9.1.2).

Vektor	Expressionsspezifikationen	Resistenz (verwendete Konzentration)	Herkunft
pET52b(+)	Tag: N-terminaler Strep-Tag II und C-terminaler His ₁₀ -Tag Promotor: T7 Induktion: 0,1-1mM IPTG	Ampicillin (100 µg x mL ⁻¹)	Fa. Novagen
pHIS8	Tag: N-terminaler His ₈ -Tag Promotor: T7 Induktion: 0,1-1mM IPTG	Kanamycin (50 µg x mL ⁻¹)	Arbeitsgruppe Prof. B. Moore (San Diego)
pHIS8-svp	Tag: N-terminaler His ₈ -Tag Promotor: T7 Induktion: 0,1-1mM IPTG Co-Expression: svp	Kanamycin (50 µg x mL ⁻¹)	Arbeitsgruppe Prof. B. Moore (San Diego)

Fortsetzung Tab. 6-3

Vektor	Expressionsspezifikationen	Resistenz (verwendete Konzentration)	Herkunft
pASK-IBA3	Tag: C-terminaler Strep-Tag II Promotor: tetA Induktion: 200ng x mL ⁻¹ Anhydrotetracycline	Ampicillin (100 µg x mL ⁻¹)	Fa. IBA (Göttingen)
pASK-IBA5	Tag: N-terminaler Strep-Tag II Promotor: tetA Induktion: 200ng x mL ⁻¹ Anhydrotetracycline	Ampicillin (100 µg x mL ⁻¹)	Fa. IBA (Göttingen)
pET-Sumo	Tag: N-terminaler His ₆ -Tag gefolgt von Sumo-Tag (11kDa) Promotor: T7 Induktion: 0,1-1mM IPTG	Kanamycin (50 µg x mL ⁻¹)	Fa. Invitrogen

Tab. 6-4: Plasmide zur Co-Expression verschiedener Chaperone. (Plasmidkarten unter 9.1.3).

Plasmid	Promoter/Induktion	Kodierte Chaperone	Resistenz (verwendete Konzentration)	Herkunft
pGro7	<i>araB</i> /Arabinose (0,5-4 mg x mL ⁻¹)	<i>groES/groEL</i>	Chloramphenicol (20 µg x mL ⁻¹)	Fa. Takahara
pG-Tf2	<i>Pzt1</i> /Tetracyclin (1-10 ng x mL ⁻¹)	<i>groES/groEL/tig</i>	Chloramphenicol (20 µg x mL ⁻¹)	Fa. Takahara
pKJE7	<i>araB</i> /Arabinose (0,5-4 mg x mL ⁻¹)	<i>dnaK/dnaJ/grpE</i>	Chloramphenicol (20 µg x mL ⁻¹)	Fa. Takahara
pTf16	<i>araB</i> /Arabinose (0,5-4 mg x mL ⁻¹)	<i>Tig</i>	Chloramphenicol (20 µg x mL ⁻¹)	Fa. Takahara
pG-KJE8	<i>araB</i> /Arabinose (0,5-4 mg x mL ⁻¹) <i>Pzt1</i> /Tetracyclin (1-10 ng x mL ⁻¹)	<i>dnaK/dnaJ/grpE</i> <i>groES/groEL</i>	Chloramphenicol (20 µg x mL ⁻¹)	Fa. Takahara

6.1.3 Organismen

Zur Lagerung von Ligationen, Konstrukten und Expressionsplasmiden wurden die Stämme *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* DH5α, *E. coli* JM109 sowie *E. coli* TOP10 verwendet. In den Stamm *E. coli* ET12567 wurden Plasmide transformiert, die keine Methylierungen tragen sollten. Dadurch wurden sie für methylierungsempfindliche Restriktionsenzyme zugänglich gemacht. Als Proteinexpressionstämmen dienen *E. coli* BL21 DE3, *E. coli* Rosetta-gami 2 DE3 pLysS und *E. coli* ArcticExpress DE3. Der Stamm *E. coli* BW25113 pKD46 wurde für die λ-red mediierte homologe Rekombination eingesetzt. Die Stämme *Acinetobacter baylyi* ADP1 PHB65IID und *Pseudomonas stutzeri* JM300 PHB65IIA enthalten ins Genom integriert den kompletten Pederin-Cluster und fanden in der heterologen Expression des Pederin-Cluster Anwendung. Analog hierzu, wurden die Wildtyp-Stämme *Acinetobacter baylyi* ADP1 und *Pseudomonas stutzeri* JM 300 als Negativkontrolle verwendet. *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 wurde als Donor für die Isolierung der genomischer DNA verwendet und lieferte einen Teil aus dem *eryA*-Gen des Erythromycin-Cluster (Tab. 6-5).

Tab. 6-5: Übersicht über die verwendeten *E. coli*, *Acinetobacter* und *Pseudomonas*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> BL21 DE3	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , DE3	Fa. Invitrogen
<i>E. coli</i> ET12567	<i>Dam</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁻ , <i>hsdM</i> ⁻	MacNeil et al. ²⁵⁸
<i>E. coli</i> Rosetta-gami 2 DE3 pLysS	Δ(<i>ara-leu</i>)7697, Δ <i>lacX74</i> , Δ <i>phoA</i> , Pvu II, <i>phoR</i> , <i>araD139</i> , <i>ahpC</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , DE3, F' [<i>lac</i> ⁺ <i>lacI^q</i> <i>pro</i>], <i>gor522::Tn 10</i> , <i>trxB</i> , pLysSRARE2, (Cam ^R , Str ^R , Tet ^R)	Fa. Novagen
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Fa. Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI^q ΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)]	Fa. Stratagene
<i>E. coli</i> DH5α	<i>fhuA2</i> , Δ(<i>argF-lacZ</i>)U169, <i>phoA</i> , <i>glnV44</i> Φ80, Δ(<i>lacZ</i>)M15, <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i>	Taylor et al. ²⁵⁹
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>)	Fa. Stratagene
<i>E. coli</i> BW25113 pKD46	Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-4</i>), <i>lacI_p-4000</i> (<i>lacI</i> ⁺), λ ⁻ , <i>rpoS369</i> (Am), <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i> pKD46: <i>repA</i> , <i>araC</i> , <i>bla</i> , [tL3], <i>repA101</i> (ts), <i>araBp-gam-bet-exo</i> , <i>oriR101</i> , <i>bla</i> (Amp ^R)	Gust et al. ^{245,260} Datsenko et al. ²⁴⁷
<i>E. coli</i> ArcticExpress RIL DE3	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^R , <i>gal</i> λDE3, <i>endA</i> , <i>Hte</i> [<i>cpn10cpn60 Gent^R</i>] [<i>argU ileY leuW Str^R</i>]	Fa. Stratagene
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	Wildtyp	Vaneechoutte et al. ²⁶¹
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1 PHB65IID	enthaltene Gene: <i>pedA</i> , <i>pedB</i> , <i>pedC</i> , <i>pedD</i> , <i>pedE</i> , <i>pedF</i> , <i>pedN</i> , <i>pedM</i> , <i>pedL</i> , <i>pedO</i> , <i>pedP</i> , <i>pedG</i> , <i>pedH</i> , <i>pedI</i> , <i>pedJ</i> , <i>pedK</i> , (Kan ^R)	Jing He ²⁴⁴
<i>Pseudomonas stutzeri</i> JM 300	Prototroph	Roselló et al. ²⁶² Carlson et al. ²³⁹ Berndt et al. ²⁶³
<i>Pseudomonas stutzeri</i> JM300 PHB65IIA	Prototroph; enthaltene Gene: <i>pedA</i> , <i>pedB</i> , <i>pedC</i> , <i>pedD</i> , <i>pedE</i> , <i>pedF</i> , <i>pedN</i> , <i>pedM</i> , <i>pedL</i> , <i>pedO</i> , <i>pedP</i> , <i>pedG</i> , <i>pedH</i> , <i>pedI</i> , <i>pedJ</i> , <i>pedK</i> , (Kan ^R)	Jing He ²⁴⁴
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	Wildtyp	DSMZ Nr. 40517 ²⁶⁴

6.2 Medien

Die aufgeführten Medien bzw. Medienkomponenten wurden für 20 min bei 121 °C im Autoklaven hitzesterilisiert. Es wurden sowohl Flüssig- als auch Festmedien verwendet. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums wurde entsprechend dem zu kultivierenden Stamm und gegebenenfalls Plasmid die geeignete Menge des jeweiligen Antibiotikums zugegeben. Die Antibiotika sowie Ihre Konzentrationen sind für die Stämme in Tab. 6-6 sowie Tab. 6-7 und für die Plasmide in Tab. 6-2 bis Tab. 6-4 sowie Tab. 6-26 bis Tab. 6-28 angegeben.

LB-Medium (Luria Bertani)^{265,266}:

5	g x L^{-1}	NaCl
5	g x L^{-1}	Hefeextrakt
10	g x L^{-1}	Trypton
15	g x L^{-1}	Agar

pH = 7,4 (NaOH)

Das Flüssigmedium wurde ohne Agar angesetzt.

Lennox Medium²⁴⁶:

10	g x L^{-1}	Trypton
5	g x L^{-1}	Hefextrakt
5	g x L^{-1}	NaCl
1	g x L^{-1}	Glucose
15	g x L^{-1}	Agar

pH = 7,4 (NaOH)

Das Flüssigmedium wurde ohne Agar angesetzt.

SGGP-Medium²⁶⁷:

4	g x L^{-1}	Bacto-Pepton
4	g x L^{-1}	Hefeextrakt
2	g x L^{-1}	Glycin
0,5	g x L^{-1}	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

pH = 7 – 7,2

Nach dem Autoklavieren wurde 20 mL sterile 50 % (w/v) Glucoselösung und 20 mL sterile 0,5 M KH_2PO_4 -Lösung zugegeben.

GYM *Streptomyces*-Medium (DSMZ-Medium Nr. 65):

4.0	g x L^{-1}	Glucose
4.0	g x L^{-1}	Hefeextrakt
10.0	g x L^{-1}	Malzextrakt
2.0	g x L^{-1}	CaCO_3
12.0	g x L^{-1}	Agar

pH = 7,2

Das Flüssigmedium wurde ohne Agar und CaCO_3 angesetzt.

HSG-Medium (halb synthetisches Glycerin-Medium)²⁶⁸:

14,8	g x L^{-1}	Glycerin
13,5	g x L^{-1}	Bacto-Pepton
7,0	g x L^{-1}	Hefeextract
2,5	g x L^{-1}	NaCl
2,3	g x L^{-1}	K_2HPO_4
1,5	g x L^{-1}	KH_2PO_4
0,14	g x L^{-1}	$\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

TB-Medium (Terrific broth)²⁶⁹:

12	g	Trypton
24	g	Hefeextrakt
4	ml	Glycerin

ad 900 mL ddH₂O

Nach dem Autoklavieren wurden 100mL einer sterilfiltrierten Lösung mit 0.17 M KH₂PO₄ und 0.72 M K₂HPO₄ (pH=7,2) zugegeben.

SOB-Medium²⁷⁰:

20	g x L ⁻¹	Trypton
5	g x L ⁻¹	Hefeextrakt
0,584	g x L ⁻¹	NaCl
0,186	g x L ⁻¹	KCl

pH = 7,0

Vor Gebrauch wurde dem Nährmedium 10 mL x L⁻¹ einer 2 M Mg²⁺-Lösung zugegeben, welche aus 1 M MgCl₂ x 6 H₂O und 1 M MgSO₄ x 7 H₂O hergestellt wurde.

SOC-Medium:

20	g x L ⁻¹	Trypton
5	g x L ⁻¹	Hefeextrakt
0,584	g x L ⁻¹	NaCl
0,186	g x L ⁻¹	KCl

pH = 7,0

Vor Verwendung wurde dem Nährmedium 10 mL x L⁻¹ einer 2 M Mg²⁺-Lösung zugegeben, welche aus 1 M MgCl₂ x 6 H₂O und 1 M MgSO₄ x 7 H₂O hergestellt wurde. Im Gegensatz zu dem SOB-Medium wurde mit 20 mM Glucose supplementiert.

M9-Medium (Minimalmedium)²⁶⁵:

6	g	Na ₂ HPO ₄
3	g	KH ₂ PO ₄
0.5	g	NaCl
1	g	NH ₄ Cl

ad 990 mL ddH₂O

Nach dem Autoklavieren wurden 10 mL einer sterilfiltrierten 100 mM MgSO₄, 20 % (w/v) Glucose, 10 mM CaCl₂ und 100 mM Thiaminhydrochlorid Lösung zugegeben.

M199-Medium (Fa. Sigma):

Das Medium wird vom Hersteller steril geliefert und wurde direkt verwendet.

Overnight Express Autoinduction TB Medium (Fa. Novagen/Merck):

60 g der granulierten Medienbestandteile wurden in 1 L destilliertem Wasser unter sterilen Bedingungen gelöst und mit 10 mL Glycerin supplementiert. Es erfolgte eine Erhitzung für 2 min in der Mikrowelle, wonach das Medium nach der Abkühlung für die Proteinexpressionen eingesetzt werden konnte.

6.3 Puffer und Reaktionslösungen

In den Versuchen fanden folgende Puffer Verwendung. Weitere Puffer und Lösungen sind direkt zu den einzelnen Methoden ausgewiesen.

TE-Puffer:

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

TAE-Puffer (50x)²⁶⁵:

0,12 % (v/v) Eisessig
0,48 % (w/v) Tris
1 mM EDTA
pH = 8,0 (HCl)

Der Puffer wurde vor Gebrauch mit ddH₂O zum 1 x TAE Puffer verdünnt.

6.4 Mikrobiologische Techniken

6.4.1 Stammhaltung in Kryokulturen

Als Grundlage für die gentechnischen sowie mikrobiologischen Arbeiten dienen bei -80 °C gehaltene Kryokulturen. Die Zellen wurden hierfür jeweils in 5 mL LB-Medium im Reagenzglas auf einem Rotationsschüttler bei 200 min⁻¹ unter geeigneten Bedingungen (6.4.2) im Bezug auf Medium, Temperatur und Antibiotikakonzentration angezogen. Wahlweise konnte je nach Volumenbedarf auch ein Schüttelkolben anstatt des Reagenzglases verwendet werden. Nach der Anzucht der Stämme bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 wurde die Kultivierung abgebrochen. Zu dem entsprechenden Ansatz wurde der gleiche Volumenanteil an sterilen 30 % Glycerin/Wasser-Gemisch (v/v) gegeben. Die entstandene Glycerinkultur wurde in Kryoröhrchen gefüllt und bei -80 °C tiefgefroren.

6.4.2 Kultivierung von Bakterien

Die verwendeten Bakterien wurden unter verschiedenen Bedingungen kultiviert, die im Folgenden aufgelistet werden (Tab. 6-6). Abweichungen von diesen Standardbedingungen bzw. zusätzliche Parameter sind direkt zu den einzelnen Experimenten im Ergebnis- und Diskussionsteil ausgewiesen.

Tab. 6-6: Kultivierungsbedingungen der verschiedenen *E.coli*-Stämme.

Stamm	Medium	Temperatur [°C]	Antibiotikum/Konzentration [µg/mL]	Schüttler-geschwindigkeit [min ⁻¹]
<i>E. coli</i> BL21 DE3	LB-Medium	37	-	200
<i>E. coli</i> ET12567	LB-Medium	37	-	200
<i>E. coli</i> Rosetta-gami 2 DE3 pLysS	LB-Medium	37	Streptomycin (50 µg x mL ⁻¹) Chloramphenicol (32 µg x mL ⁻¹) Tetracycline (12 µg x mL ⁻¹)	200
<i>E. coli</i> TOP10	LB-Medium	37	Streptomycin (50 µg x mL ⁻¹)	200
<i>E. coli</i> XL1-Blue	LB-Medium	37	Tetracycline (20 µg x mL ⁻¹)	200
<i>E. coli</i> DH5α	LB-Medium	37	-	200
<i>E. coli</i> JM109	LB-Medium	37	-	200
<i>E. coli</i> BW25113 pKD46	LB-Medium	30	Ampicillin (100 µg x mL ⁻¹)	200
<i>E. coli</i> ArcticExpress DE3	LB-Medium	37	Gentamycin (20 µg x mL ⁻¹) Streptomycin (50 µg x mL ⁻¹)	200

Tab. 6-7: Kultivierungsbedingungen der Stämme *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter baylyi* ADP1, und *Saccharopolyspora erythraea*.

Stamm	Medium	Temperatur [°C]	Antibiotikum	Schüttler-geschwindigkeit [min ⁻¹]
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	LB-Medium	30	-	200
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1 PHB65IID	LB-Medium	30	Kanamycin (20 µg x mL ⁻¹)	200
<i>Pseudomonas stutzeri</i> JM 300	LB-Medium	30	-	200
<i>Pseudomonas stutzeri</i> JM300 PHB65IIA	LB-Medium	30	Kanamycin (20 µg x mL ⁻¹)	200
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	SGGP, GYM <i>Streptomyces</i> - Medium	30	-	200

6.4.3 Transformation

Die Transformation ist eine Methode, die das Einbringen von Fremd-DNA in zelluläre Organismen ermöglicht. Dabei sind zwei methodische Ansätze voneinander zu unterscheiden. Das Einbringen von DNA über einen Hitzeschock (6.4.3.3) in chemisch kompetente Zellen oder über die sogenannte Elektroporation (6.4.3.4) in elektrokompente Zellen. Die Zellen müssen allerdings vor der eigentlichen Transformation kompetent gemacht werden um DNA aufzunehmen (6.4.3.1 und 6.4.3.2).

6.4.3.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 5 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und übernacht kultiviert. Die Übernachtskultur wurde in einen Schüttelkolben mit 200 mL frischem LB-Medium transferiert und bei 37 °C auf einem Inkubationsschüttler bei 200 min⁻¹ inkubiert. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 wurde die Kultivierung abgebrochen und die Kolben rasch auf Eis gestellt. Die Zellen wurden bei 5000 g und 4 °C für 6 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 25 mL eiskaltem TFB I Puffer (Tab. 6-8) resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (5000 g, 5 min, 4 °C) und in 4 mL TFB II Puffer (Tab. 6-8) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu 100 µL aliquotiert und nach dem Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

Tab. 6-8: Puffer zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen.

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

6.4.3.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Generierung elektrokompetenter Zellen wurde eine Übernachtskultur (5 mL) in 200 mL LB-Medium im Schüttelkolben bei 200 min⁻¹ und 37 °C kultiviert. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,8 wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und auch die weiteren Schritte unter stetiger Kühlung durchgeführt. Die Zellen wurden bei 5000 g für 5 min und 4 °C abzentrifugiert. Um die Salze von den Zellen zu entfernen wurde aufeinanderfolgend mit 100 mL 10 % (v/v) Glycerin, mit 50 mL 10 % (v/v) Glycerin und mit 10 mL 10 % (v/v) Glycerin gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurde jeweils bei 5000 g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die verbleibenden Zellen wurden letztendlich in 1 mL 10 % Glycerin/Wasser (v/v) resuspendiert und in vorgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße zu 70 µL ausaliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C für die Transformation mittels Elektroporation gelagert.

6.4.3.3 Hitzeschocktransformation

Die chemisch kompetenten Zellen (6.4.3.1) wurden mit bis zu 10 µL Vektor oder Ligationsansatz 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zur DNA-Aufnahme bei 42 °C für 50 s hitzeshockt. Der Ansatz wurde auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 900 µL LB-Medium für 1 h bei

37 °C inkubiert. Im Folgenden konnten die transformierten Zellen auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika von den nicht-transformierten Zellen selektiert werden.

6.4.3.4 Elektroporation

Alle Arbeitsschritte der Elektroporation wurden möglichst kühl bzw. auf Eis durchgeführt. Zu den elektrokompenten Zellen (6.4.3.2) wurden 1-2 µL der DNA bzw. in Einzelfällen bis zu 10 µL Ligationsansatz gegeben und in eine Elektroporationsküvette (0,2 cm Schichtdicke) transferiert. Die Küvette wurde zuvor für 10 min unter UV-Licht in einem UV-Crosslinker sterilisiert. Der Ansatz wurde im Elektroporator plaziert und mit dem Programm Ec2 (Gerät: Biorad Genpulsar) einer kurzzeitigen Spannung von 2500 V ausgesetzt. Nach dem Vorgang wurde schnell 1 mL LB-Medium auf die Zellen gegeben und es erfolgte eine Kultivierung bei 37 °C für 1 h bei 200 min⁻¹ in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß. Im Folgenden konnten die Zellen auf Selektivagar ausplattiert werden.

6.4.4 Blau/Weiß Selektion auf transformierte positive Klone

Die Plasmide zur Lagerung und Sequenzierung von PCR-Fragmenten (Tab. 6-2) geben die Möglichkeit, nach der Transformation nicht nur transformierte von nicht-transformierten Klonen zu unterscheiden, sondern auch die Klone zu erkennen, die im transformierten Plasmid DNA aufgenommen haben. Dies geschieht über die Lokalisation der MCS im Reporter gen *lacZ* (IPTG-induzierbar). Eine Ligation von DNA in dieses Gen bedeutet eine Destruktion des Gens, welches die β-Galactosidase kodiert. β-Galactosidase hydrolysiert X-Gal zu Galactose und einem blauen, wasserunlöslichem Indigo-Farbstoff. Eine positive Insertion in die MCS kann daher durch die Färbung der Zellen sichtbar gemacht werden.

Hierzu wurden die Transformanden aus 6.4.3 wie beschrieben auf Selektivagar ausplattiert. Die Agarplatten wurden zuvor mit 40 µL einer 20 mg x mL⁻¹ X-Gal-Lösung in DMF sowie mit 40 µL einer 20 mg x mL⁻¹ IPTG-Lösung imprägniert. Nach der Inkubation färbten sich transformierte Zellen, deren Plasmide Fremd-DNA aufgenommen haben, weiß und transformierte Zellen, deren Plasmid kein Insert tragen, blau.

6.4.5 Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen

Eine Konzentrationsbestimmung von Suspensionskulturen wurde fotometrisch als optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) vorgenommen. Als Referenz diente das jeweilig verwendete Medium und wurde von dem Messwert subtrahiert.

6.5 Molekularbiologische Techniken

6.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde unter anderem dazu verwendet Biosynthesegene für die Proteinexpressionsvektoren zu amplifizieren. Als Templat dienten hierbei die unter 6.1.1, Tab. 6-1 aufgeführten Cosmide. Als Einziges PCR-Fragment in den Proteinexpressionsvektoren, das nicht von den genannten Cosmiden amplifiziert wurde, ist der *eryA*-Linker_{1,2} zu nennen. Als Templat wurde hier die genomische DNA von *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338 (Tab. 6-5) verwendet. Außerdem wurden DNA-Fragmente für die λ -red-medierte homologe Rekombination amplifiziert. Hierzu gehören der *pedC/pedD*-Promotor von pPD23E7 (Tab. 6-1) und die Apramycin-Resistenz von pIJ 773 (Tab. 6-26). Eine weitere Anwendung der PCR war die Überprüfung von konstruierten Plasmiden. Als Templat wurde hier das zu überprüfende Plasmid verwendet.

Der übliche Reaktionsansatz wurde entsprechend Tab. 6-9 verwendet. Die verwendeten Primer sind unter 6.5.1.2, Tab. 6-11 und Tab. 6-12 dargestellt.

Tab. 6-9: Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion.

Volumen [μ L]	Substanz
1 μ L	Templat
1 μ L	dNTP (10mM)
0,5 μ L	Vorwärtsprimer (50 μ M)
0,5 μ L	Rückwärtsprimer (50 μ M)
5 bzw. 10 μ L	Puffer (10x bzw. 5x)
0,5 μ L	DNA-Polymerase
ad 50 μ L	ddH ₂ O

Für die unterschiedlichen Amplifizierungsaufgaben wurden verschiedene thermostabile DNA-Polymerasen verwendet. Für die Analyse von konstruierten Plasmiden und die Kolonie-PCR (6.5.1.1) kam die *Taq*-DNA-Polymerase zum Einsatz und der zugehörige 10xThermoPol-Puffer. Für die Amplifikation der Biosynthesegene und die λ -red-medierten homologen Rekombinationsexperimente wurde die Verwendung der *Pfu*-DNA-Polymerase oder das Expand High Fidelity PLUS PCR System gewählt. Die eingesetzten Polymerasen besitzen eine 3`-5`-Exonucleaseaktivität, wodurch die Fehlerrate minimiert wird. Gegebenenfalls wurde nach erfolgreicher Amplifikation mit der *Pfu*-DNA-Polymerase eine A-tailoring-Reaktion (6.5.14.2) angeschlossen, um die PCR-Produkte für T/A-Klonierungen vorzubereiten. Diese Reaktion ist bei dem Expand High Fidelity PLUS PCR System nicht notwendig, da in diesem System neben der proof-reading-DNA-Polymerase die *Taq*-DNA-Polymerase vorhanden ist, welche die 5`-A-Überhänge generiert. Als Puffer für die proof-reading-DNA-Polymerasen wurde jeweils der mitgelieferte 5 x Reaktionspuffer verwendet. Die Reaktionsansätze wurden zur Amplifikation in einem sogenannten Thermocycler plziert und einem Temperaturprogramm ausgesetzt (Tab. 6-10).

Tab. 6-10: Temperaturprogramm für die PCR.

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Heizdeckel	106	∞	
Initiation Denaturierung	96	120	} 30 bis 40 Zyklen
Denaturierung	96	30	
Annealing	Primerabhängig*	30	
Elongation	72	60 x (1000 bp) ⁻¹	
Abschließende Elongation	72	300	
Abkühlung	4	∞	

*Die verwendeten Annealingtemperaturen sind zu den verwendeten Primern unter 6.5.1.2, Tab. 6-11 und Tab. 6-12 angegeben.

Nach erfolgter PCR konnte das Ergebnis auf Agarosegelen getestet werden (6.5.7). Bei allen PCR-Reaktionen wurden Negativkontrollen durchgeführt. Hierzu wurden identische Ansätze gefahren - nur das jeweilige Templat fehlte im Reaktionsansatz.

6.5.1.1 Kolonie-PCR

Die analytische PCR oder auch Kolonie-PCR ermöglichte den Erhalt eines PCR-Produktes bei einem Einsatz von ganzen Zellen als Templat enthaltende Matrix. Diese Vorgehensweise war mit einer erheblichen Zeitersparnis verbunden, da der Schritt der Plasmidisolierung entfiel. Allerdings war die Störungsanfälligkeit der enzymatischen Reaktionszyklen durch Verunreinigungen stark erhöht. Daher wurde diese PCR-Variante in der vorliegenden Arbeit nur zu analytischen Zwecken verwendet und nicht zur Klonierung von Biosynthesegenen.

Bei der Zugabe von Zellen wurden möglichst wenige Zellen mit einem Zahnstocher von einer Platte oder Flüssigkultur zum Reaktionsansatz gegeben. Im Weiteren wurde die PCR analog zu 6.5.1 durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand in einer anfänglichen Denaturierungstemperatur von 96 °C für 10 min anstatt von 2 min. Durch die hohe Temperatur für einen längeren Zeitraum wurden die Zellen aufgeschlossen und die Template-DNA lag für eine Amplifikation frei im Reaktionsansatz vor. Detergentien zu einem effizienteren Zellaufschluss wurden nicht genutzt.

6.5.1.2 Oligonucleotide („Primer“)

Für die Amplifikation der Biosynthesegene wurden spezifische Primer konstruiert. Bei der Konstruktion wurden geeignete Schnittstellen für die *In Frame*-Klonierung in den Expressionsvektor angefügt. Falls der Expressionsvektor kein eigenes Stop-Codon enthielt und das zu exprimierende Gen keinen eigenen ORF (open reading frame) besaß wurde bei der Konstruktion der Primer ein Stop-Codon angefügt.

Die jeweiligen Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms DNASTar Primerselect 5.03 designt. Die optimale Annealingtemperatur wurde ebenfalls zu den jeweiligen Primern durch das Programm berechnet. Eine mathematische Bestimmung ist über folgenden Zusammenhang möglich^{271,272}.

$$T_m = 81,5 + 16,6 \times (\log_{10}[J^+]) + 0,41 \times (\%G + C) - \left(\frac{675}{n}\right) - 1,0 \times (\text{Fehlpaarungen}) - 0,63 \times (\%FA)$$

T_m = Schmelztemperatur; J^+ = Konzentration monovalenter Kationen [$\text{mol} \times \text{L}^{-1}$];
 $\%G + C$ = Anteil Basen Guanin und Cytosin [%]; n = Anzahl der Basen im Oligonucleotid;
 $\%Fehlpaarungen$ = Anteil der fehl gepaarten Basen im Oligonucleotid [%];
 $\%FA$ = Anteil des Formamids im Puffer [%]

$$T_a^{opt} = 0,3 \times T_m^{Primer} + T_m^{Produkt} - 14,9$$

T_a^{opt} = optimale Annealingtemperatur; T_m^{Primer} = Schmelztemperatur Primer;
 $T_m^{Produkt}$ = Schmelztemperatur Produkt

Eine Ausnahme stellten hier die Primer zur *Bsa*I-Klonierung von Biosynthesegenen in den Vektor pASK-IBA3 und pASK-IBA5 dar. Hier erfolgte die Primerkonstruktion über das Programm Primer D`Signer 1.1. Dieses Programm entwickelt die Primer spezifisch für die Klonierung von Genen in die pASK-Vektorserie für unterschiedliche Restriktionsschnittstellen und optimiert die Primer für eine Annealing-Temperatur von 55 °C.

Die folgende Tab. 6-11 listet die verwendeten Primer zur Amplifikation der Biosynthesegene für die Expressionsvektoren auf. Bei den ersten 10 Primern zur Klonierung des Moduls *ped*3 sowie den letzten 2 Primern zur λ -red-Klonierung sind keine Zielvektoren angegeben, da diese Amplifikationsprodukte für die Klonierung in Shuttle-Vektoren genutzt wurden und erst die weiteren Klonierungsschritte zu den letztlichen Expressionsplasmiden führten. Eine genauere Betrachtung hierzu ist unter 5.2.1 bzw. 6.5.19 zu finden.

Tab. 6-11: Verwendete Primer zur Amplifikation der Biosynthesegene für die Expressionsvektoren.

Gen (Zielvektor)	Sequenz (5' → 3')	optimale Annealing- Temperatur [°C]
<i>ped</i> 3 ₁ 5'-Ende	AAAGGATCCGAGTGCCAGACCCTGGATGCCT CTCCAAGAAGCCCGCAAAAATAG	61,0
<i>ped</i> 3 ₁ 3'-Ende	ATGACACTTTGCACGAACAGGAGA AAACGGCCGTGACCGTACGTACTGAGAAAATTCTGCC	57,4
<i>ped</i> 3 ₂ 5'-Ende	AAAGGATCCGAGTGCCAGACCCTGGATGCCT CTCCAAGAAGCCCGCAAAAATAG	61,0
<i>ped</i> 3 ₂ 3'-Ende	ATGACACTTTGCACGAACAGGAGA AAACGGCCGTGACCGTACGTACTGAGAAAATTCTGCC	57,4
<i>ped</i> F-Linker	AAAGGATCCAGCGTTAATATTCATCAGCAGCTTAAA AAACCTCAGGAGAATCTTCGCCTCTCTT	53,0
<i>ped</i> 3-Modulanfang Fusion <i>ped</i> F-Linker	AAACCTGAGGCAATCGCAGTGATCGGC CTCCAAGAAGCCCGCAAAAATAG	59,5
<i>ery</i> A-Linker ₁	AAAGGATCCGAGAAGGTGGCGGAGTACCTCCGTCGGGCG AAACCTCGGATTCCAGCTCGCGGATGCGCTGCCGGG	64,4
<i>ery</i> A-Linker ₂	AAAGGATCCGAAAAGGTGACTGACAGCGAGAAGGTGGCGGAGT AAACCTCGGATTCCAGCTCGCGGATGCGCTGCCG	63,6

Fortsetzung Tab. 6-11

Gen (Zielvektor)	Sequenz (5' → 3')	optimale Annealing- Temperatur [°C]
<i>pedI3</i> -Modulanfang Fusion <i>eryA</i> -Linker	<u>AAATCCGAGGCAATCGCAGTGATCGGC</u> <u>CTCCAAGAAGCCCGCAAAAATAG</u>	59,5
<i>pedL</i> (pHIS8)	<u>GGATCCGTCTATCAAACGATCCAGGTTGTTTACA</u> <u>CGGCCGCTAAGCTTCCAAGGAACTGTCCGGTA</u>	59,4
<i>pedL</i> (pET52b(+))	<u>GTCGACAGCTTCCAAGGAACTGTCCGGTA</u> <u>GTCGACGTCTATCAAACGATCCAGGTTGTTTAC</u>	58,9
<i>pedC</i> (pHIS8)	<u>CCATGGGAAAGACTTGCAAAATATACAGA</u> <u>CCATGGCTAACGTTGGTCGAGTTCGAGCAGACG</u>	55,3
<i>pedC</i> (pASK3)	<u>ATGGTAGGTCTCAAATGAAAGACTTGCAAAATATACAGAACAC</u> <u>ATGGTAGGTCTCAGCGCTACGTTGGTCGAGTTCGAGCAGA</u>	55,0
<i>pedC</i> (pASK5)	<u>ATGGTAGGTCTCAGCGCCAAAGACTTGCAAAATATACAGAACAC</u> <u>ATGGTAGGTCTCATATCAACGTTGGTCGAGTTCGAGCAGA</u>	55,0
<i>psyD</i> O-MT (pHIS8)	<u>GGATCCGTTGAGAGTGGGGACGCGGATCA</u> <u>CGGCCGTCAGGAACCTGAAAGTTCTACTTCGGGTTT</u>	61,2
<i>psyD</i> O-MT (pASK3)	<u>ATGGTAGGTCTCAAATGGTTGAGAGTGGGGACGCGGAT</u> <u>ATGGTAGGTCTCAGCGCTGGAACCTGAAAGTTCTACTTCGG</u>	55,0
<i>psyD</i> O-MT (pASK5)	<u>ATGGTAGGTCTCAGCGCCGTTGAGAGTGGGGACGCGGAT</u> <u>ATGGTAGGTCTCATATCAGGAACCTGAAAGTTCTACTTCGG</u>	55,0
<i>psyC</i> (pHIS8)	<u>GGATCCTATGCCTTGTTGAAACCAGACGCCGC</u> <u>CGGCCGTTAGAGCCAGACTAGTTTATGATTGGCTTCAAT</u>	59,1
<i>psyC</i> (pET52b+)	<u>GGATCCGTATGCCTTGTTGAAACCAGACGCCGC</u> <u>GCGGCCGCGAGCCAGACTAGTTTATGATTGGCTTCAAT</u>	58,7
<i>psyC</i> (pASK3)	<u>GAATTCTATGCCTTGTTGAAACCAGACGCCGC</u> <u>CTGCAGGAGCCAGACTAGTTTATGATTGGCTTCAAT</u>	55,0
<i>psyC</i> (pASK5)	<u>GAATTCGTATGCCTTGTTGAAACCAGACGCCGC</u> <u>CTGCAGTTAGAGCCAGACTAGTTTATGATTGGCTTCAAT</u>	55,0
<i>psyC</i> (pET-Sumo)	<u>ATGTATGCCTTGTTGAAACCAGACGCCGC</u> <u>TTAGAGCCAGACTAGTTTATGATTGGCTTCAAT</u>	59,1
<i>psyK</i> (pHIS8)	<u>GGATCCAGTCTAGTCTTCAAAGCTTATTGGGCGTGCA</u> <u>GCGGCCGCTCACCGGTACATGGCGACAAGCTGCTTC</u>	62,7
<i>psyK</i> (pASK3)	<u>ATGGTAGGTCTCAAATGCACTAGTCTTCAAAGCTTATTGG</u> <u>ATGGTAGGTCTCAGCGCTCCGGTACATGGCGACAAGCTG</u>	55,0
<i>psyK</i> (pASK5)	<u>ATGGTAGGTCTCAGCGCCAGTCTAGTCTTCAAAGCTTATTGG</u> <u>ATGGTAGGTCTCATATCACCGGTACATGGCGACAAGCTG</u>	55,0
<i>psyA-ACP₃</i> (pHIS8)	<u>GGATCCACGTCGAGCGGGGAACTTGCGACAGTGG</u> <u>CGGCCGTTAAACGCATACCGCTTCGAGCTGCTGCGC</u>	61,9
<i>psyA-ACP₃</i> (pASK3)	<u>GAATTCACGTCGAGCGGGGAACTTGCGACAGTGG</u> <u>CTGCAGAACGCATACCGCTTCGAGCTGCTGCGC</u>	55,0
<i>psyA-ACP₃</i> (pASK5)	<u>GAATTCGACGTCGAGCGGGGAACTTGCGACAGTGG</u> <u>CCATGGTTAAACGCATACCGCTTCGAGCTGCTG</u>	55,0
<i>psyD-ACP₁</i> (pHIS8)	<u>GGATCCACTTCGTCGCCAAAGGGCAATCTGACCG</u> <u>CGGCCGTCAGGTATACACGCTTCGATGTGGGACGCCAA</u>	60,6
<i>psyD-ACP₁</i> (pASK3)	<u>ATGGTAGGTCTCAAATGACTTCGTCGCCAAAGGGCAATC</u> <u>ATGGTAGGTCTCAGCGCTAGGTATACACGCTTCGATGTGGG</u>	55,0

Fortsetzung Tab. 6-11

Gen (Zielvektor)	Sequenz (5' → 3')	optimale Annealing- Temperatur [°C]
<i>psyD</i> -ACP ₁ (pASK5)	<u>ATGGTAGGTCTCAGCGCCACTTCGTCGCCAAAGGGCAATC</u> <u>ATGGTAGGTCTCATATCAAGGTATACACGCTTCGATGTGGG</u>	55,0
<i>pedC/pedD</i> - Promotor*	<u>AAACTCGAGATGGCGATGAATTCTCCCAAGCTGGCG</u> <u>AAAACATGTATATACAGTTCCTTGATCGATGAGAGAAGCTTAAATATAAGA</u>	57,9
Apr ^R *	<u>AAACTGCAGAGAATAGGAAGCTTCGGAATAGGA</u> <u>AAACTGCAGACCAGCGTACGGCCACAGAAT</u>	50,2

Basen die komplementär zum Templat sind wurden fett dargestellt, angefügte Schnittstellensequenzen unterstrichen und angefügte Stop-Codons kursiv gekennzeichnet. Nicht zusätzlich gekennzeichnete Basen 5' der angefügten Schnittstelle dienen zum effektiven Restriktionsschnitt und nicht näher gekennzeichnete Basen 3' der angefügten Schnittstelle verhindern einen Frameshift oder sind für die Klonierung mit dem Restriktionsenzym BsaI in die Vektoren pASK-IBA3 oder pASK-IBA5 essentiell.

*Die durch die PCR amplifizierten DNA-Fragmente des *pedC/pedD*-Promotor sowie der Apr-Resistenz dienen nicht zur Expression von Proteinen sondern wurden in der Generierung von Plasmiden verwendet, die in den λ -red Rekombinationsexperimenten Verwendung fanden.

In Tab. 6-12 wurden die Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die λ -red Rekombinationsexperimente dargestellt. Eine genauere Beschreibung der λ -red mediierten homologen Rekombination erfolgte unter 5.2.1 und 6.5.19.

Tab. 6-12: Verwendete Primer zur Amplifikation verschiedener DNA-Fragmente für die λ -red Experimente.

Gen	Sequenz	Optimale Annealing- Temperatur [°C]
Apr ^R - <i>pedC/</i> <i>pedD</i> -Promotor	<u>GCGATCATGGTATATCTCCTTCTGCGGCCGCAATTCACATATACAGTTCCTTGAT</u> <u>CGATGAGAGAAGCTTA</u> <u>CGGGCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTGCAGACCAGCGTA</u> <u>CGGCCACAGAATG</u>	59,5
Apr ^R - <i>pedC/</i> <i>pedD</i> -Promotor	<u>GCGATCATGGTATATCTCCTTCTGCGGCCGCAATTCACATATACAGTTCCTTGAT</u> <u>CGATGAGAGAAGCTTA</u> <u>CGGGCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTGCAGAGAATAGG</u> <u>AACTTCGGAATAGGA</u>	59,5

Fett markiert sind die komplementären Sequenzen zum Erhalt des Produktes aus der Apramycin Resistenz und *pedC/pedD*-Promotor. Die nicht markierten Basen sind komplementär zu den Sequenzen, die in der homologen Rekombination rekombinieren.

Die Oligonucleotide wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert. Die gelieferten, lyophilisierten Primer wurden mit TE-Puffer zu einer 500 μ M Stammlösung angesetzt. Vor der jeweiligen PCR wurde daraus die 50 μ M Arbeitslösung durch eine 1:10 Verdünnung mit Wasser hergestellt.

6.5.1.3 Reinigung von PCR-Produkten

Die aus der PCR stammenden Produkte wurden vor weiteren Klonierungsschritten gereinigt. Dies erfolgte mit dem PCR-Purification Kit der Firma Qiagen und wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

6.5.2 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Der Nachweis von mRNA durch die RT-PCR wurde verwendet, um einen Transkriptionsnachweis sämtlicher Pederin-Gene bei der heterologen Expression des Pederin-Clusters zu liefern. Hierfür war die Isolierung der Gesamt-RNA aus den verschiedenen Stämmen notwendig, die zur heterologen Genexpression dienen. Die RNA-Isolierung ist unter 6.5.5 beschrieben. Auch die unter 6.5.5 beschriebene Arbeitsweise aufgrund der Instabilität von RNA wurde hier angewendet.

Für die reverse Transkription und die Amplifikation der cDNA wurde das SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* DNA Polymerase der Firma Invitrogen verwendet. Diese Reaktion ermöglichte das Umschreiben der RNA in cDNA und die Amplifikation der cDNA durch spezifische Primer in einem Schritt. Die folgende Tab. 6-13 zeigt den verwendeten Reaktionsansatz.

Tab. 6-13: Reaktionsansatz der RT-PCR.

Volumen [μL]	Substanz
5 μL	2x Reaktionsmix
0,5 μL	RNA
0,5 μL	Forwärtsprimer
0,5 μL	Rückwärtsprimer
0,25 μL	ssTranscriptase
3,5 μL	H ₂ O (RNase frei)

Das für die RT-PCR notwendige Temperaturprogramm wurde in einem Thermocycler realisiert. Tab. 6-14 präsentiert das verwendete Programm.

Tab. 6-14: Temperaturprogramm der RT-PCR.

	Temperatur	Zeit	
Heizdeckel	106 °C	∞	
Reverse Transkription	55 °C	30 min	
Initiation Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	15 s	} 30 bis 40 Zyklen
Annealing	Primerabhängig*	30 s	
Elongation	68 °C	60 x (1000 bp) ⁻¹	
Abschließende Elongation	68 °C	5 min	
Abkühlung	4 °C	∞	

*Die verwendeten Annealingtemperaturen sind direkt zu den verwendeten Primern in Tab. 6-15 angegeben.

Für den Transkriptionsnachweis der Pederingene über die RT-PCR waren spezifische Primer notwendig (Tab. 6-15). Für die multimodularen Gene *pedF*, *pedH* und *pedI* waren dabei entsprechende Primer für den Genanfang und das Genende erforderlich, da eine RT-PCR über das ganze Gen aufgrund der Größe der Fragmente nicht möglich ist. Die übrigen Transkripte wurden über Primerpaare nachgewiesen, die über einen großen Teil des Transkriptes amplifizieren (*pedN,M,L*; *pedO,P*; *pedC,B,A*; *pedD,E*; *pedR*; *pedK*; *pedJ*; *pedG*) und wurden in einigen Fällen nochmals erneut durch andere Sequenzen der Primer bestätigt (*pedO*; *pedP*; *pedA,B,C* 5'-Ende; *pedABC* 3'-Ende; *pedN,M*; *pedM,L*).

Tab. 6-15: Verwendete Primer zum Nachweis von mRNA.

Gen	Sequenz	optimale Annealing- Temperatur [°C]
<i>pedN,M,L</i> *	GAAGCGATATCCACCCTCAA TAGATGTTTTCAAGATTATTAG	52,7
<i>pedN</i> *	CACTGTACATACTGGCTGAG CAATGTGATAGCGAGAAATA	51,1
<i>pedM</i> *	TTTGGGCTGTTTTGGGCTGTG CGGCCATGATCTTACGACTTTC	57,8
<i>pedL</i> *	ACGAGCGTAGCGATAGATGTT GATCCAGGTTCCGTTTAC	53,6
<i>pedO,P</i> *	GCCTGCCGATATACAAAAGATGCT CCAGGCGCCAGGGATTAGAT	56,7
<i>pedC,B,A</i> *	CGCGCAGATGAAAAGGCAGTG GGGGCGCCAGCTATACGAACAA	59,7
<i>pedD,E</i> *	GAAGATCCGCGAGCGTCAACTC ATCGCCTTCTCCGTATCATTAG	56,5
<i>pedR</i> *	CCGCCAGGCAAAAAGGTGTAGAG AGCCAGTCGAGGAAGCGTTTGA	58,0
<i>pedK</i> *	AAGGCATTATTATACGCAGAAG TCGCCTCAGTGGGAATACAG	53,4
<i>pedJ</i> *	GGAGCGCCAACGAAAAACAGC CGGTAACGGTCCAGCAACT	57,3
<i>pedG</i> *	AGCTGAGTGAAGGGGCCATAGATT CGCGCACTTGATAAACTTCCAGA	58,6
<i>pedI</i> 5`-Ende*	TTTTGGAGCGGGCGGGTCAGTCG ACGTCATCCCGGCTCATTGTCCA	60,5
<i>pedI</i> 3`-Ende*	GTGAATGGCCTGGAAACCTTAT GTACGCCGCCGACTCTGAC	57,8
<i>pedH</i> 5`-Ende*	CGGCGGCGGATGAGACA CAGATTGATGCCGATGAACA	58,0
<i>pedH</i> 3`-Ende*	ATGCGGCTGCTGGTAATGTTT AGCACTGCGGCAATGTCCACTA	58,9
<i>pedF</i> 5`-Ende*	CTGCGCCCTGAGCCTTTTGTGT GTAGCCGCAGCCCCTCCATCT	58,8
<i>pedF</i> 3`-Ende*	GTACCCGGCGTTGATTGTTCTGTC TCTGGCTCGGGTTCGGATAGTGTA	60,4
<i>pedO</i> *	TCCGCACCTGATTTTGT CATTTTTGTGCAGATACGAA	52,9
<i>pedP</i> *	CCTATATGGTGGCAGTG ATTCTTTGATTCCGATAG	51,3
<i>pedA,B,C</i> 5`- Ende	GCGCGCAGATGAAAAGGCAGTGCTTG GCGCGGAATATCTCAATAAACGCATCGCCT	62,3
<i>pedA,B,C</i> 3`- Ende	CGCCATAGCGCCGGCTACATAC ACTTGCAAAAATATACAGAACACTCACCCGG	59,1
<i>pedN,M</i>	AGTCCAGGCTTCCAGCGCTGACAACAC ATGATCAGAGAAAGAATATTCAATGTGATA	56,0
<i>pedM,L</i>	CTAAGCTTCCCAAGGAAACTGTCCGGTA CATCCATCCCTCCTTGAACCTCGAC	59,6

*Die markierten Oligonucleotide wurden von Jing He konstruiert und wurden in dieser Arbeit verwendet.²⁴⁴

Die Oligonucleotide wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert. Die gelieferten, lyophilisierten Primer wurden mit TE-Puffer zu einer 500 μM Stammlösung angesetzt. Vor der jeweiligen PCR wurde daraus die 10 μM Arbeitslösung durch eine 1:50 Verdünnung mit Wasser hergestellt.

6.5.3 Isolierung genomischer DNA

Für die Amplifizierungen von DNA-Fragmenten aus dem Erythromycin A 2-Genclusters, war die Isolierung genomischer DNA aus dem Stamm *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 notwendig. Als Ausgangsmaterial diente eine 5 mL Flüssigkultur des Stammes, der unter geeigneten Bedingungen (6.4.2) über Nacht angezogen wurde. 1 mL der Kultur wurden durch Zentrifugation (5000 g, 5 min) gesammelt und das Pellet in 500 μL STE-Puffer über 3 h bei 37 °C geschüttelt. Nach der Zugabe von 250 μL 2 % (w/v) SDS wurde nochmals mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert. Eine Reinigung der DNA erfolgte im Zweiphasensystem durch Zugabe von 250 μL Phenol-Chloroform-Lösung. Es wurde gründlich gemischt (mindestens 30 s gevortext) bis die Lösung komplett milchartig erschien. Eine Phasentrennung wurde durch eine Zentrifugation bei 13000 g für 10 min erreicht. 600 μL des Überstandes wurden zur Fällung der genomischen DNA zu 600 μL Isopropanol und 60 μL 3 M Natriumacetat (pH = 5,3) gegeben. Die DNA wurde bei 15000 g für 2 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde mit 500 μL eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 1 min bei 15000 g zentrifugiert. Die genomische DNA wurde 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und zur Lagerung in 50 μL TE-Puffer über Nacht gelöst und abschließend bei -20 °C eingefroren.

STE-Puffer:

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

Vor Gebrauch wurde dem Puffer 5 mg \times mL⁻¹ Lysozym zugefügt und die Lösung sterilfiltriert.

6.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmiden aus Mikroorganismen wurde eine 5 mL Übernachtskultur angezogen. 1,5 mL der Kultur wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und die Zellen bei 5000 g für 30 s abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 μL Puffer I (Tab. 6-16) resuspendiert. Um den Abbau der RNA durch die in Puffer I enthaltene RNase zu gewährleisten, erfolgte eine Inkubation für ca. 10 min bei Raumtemperatur. Der alkalische Aufschluss der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 μL Puffer II (Tab. 6-16). Die alkalischen Bedingungen wurden maximal 2 min aufrechterhalten, bevor die Lösung durch Zugabe von 200 μL Puffer III (Tab. 6-16) neutralisiert wurde und ein Großteil der Zellbestandteile, außer Plasmid-DNA, ausfiel. Die ausgefällten

Bestandteile wurden bei 15000 g für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein weiteres 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 500 µL Chloroform überführt und gevortext. Die Phasentrennung der wässrigen Phase von der Chloroform-Phase wurde durch erneute Zentrifugation bei 15000 g für 5 min erreicht. 500 µL der oberen wässrigen Phase wurde in ein weiteres 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 350 µL Isopropanol überführt und gemischt. Die ausfallende Plasmid-DNA wurde bei 15000 g für 20 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde mit 500µL eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und erneut bei 15000 g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und Rückstände des Ethanols in der Speed Vac für 20 min abgedampft. Die verbleibende Plasmid-DNA wurde zur Lagerung in 50 µL H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

Tab. 6-16: Verwendete Puffer der Plasmidisolierung.

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

*10 mg RNase A wurden in 1 ml TE-Puffer gelöst, 1 min bei 99 °C gekocht und zu 99 ml der autoklavierten Lösung gegeben.

6.5.5 Isolierung von RNA

Zum Nachweis der Transkription der Pederingene während der heterologen Expression wurde die Gesamt-RNA der verwendeten Expressionsstämme isoliert. Diese konnte im Weiteren in der RT-PCR (6.5.2) auf vorhandene mRNA untersucht werden.

Da RNA wesentlich instabiler als DNA ist, wurde hier ganz besonders auf Sterilität und eine RNase-freie Umgebung bzw. Arbeitsweise geachtet. Für die Isolierung der RNA wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Der zu untersuchende Expressionsstamm wurde unter geeigneten Bedingungen (6.4.2) bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,7 angezogen und für 5 min bei 5000 g bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 100 µL sterilfiltriertem TE-Puffer (400 µg x mL⁻¹ Lysozym) für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Es erfolgte die Zugabe von 350 µL RLT-Puffer und eine Zentrifugation bei 5000 g für 2 min. Zum Überstand wurden 250 µL 96 % Ethanol gegeben, leicht vermischt und auf eine RNeasy Mini Säule gegeben. Durch eine Zentrifugation bei 8500 g für 15 s wurde eine Adsorption der Nucleinsäuren an die Membran der Säule erreicht. Es erfolgte ein Waschschriff mit 350 µL Puffer RW I und eine weitere Zentrifugation bei 8500 g für 15 s. Für die Untersuchung der Proben mittels RT-PCR war es essentiell, eine DNA-freie RNA-Lösung zu erhalten. Daher erfolgte eine dreifache DNase I-Behandlung.

- I. Zur Entfernung der DNA wurde eine Lösung aus 10 μL DNase I Lösung und 70 μL Puffer RDD auf die Säule gegeben. Während der Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur erfolgte der enzymatische Abbau der DNA durch die DNase-Aktivität. Es wurde eine Zugabe von 350 μL Puffer RW I und eine Zentrifugation bei 8500 g für 15 s durchgeführt, gefolgt von zwei Waschschritten mit 500 μL RPE Puffer mit jeweiliger Zentrifugation bei 8500 g für 15 s. Zur kompletten Entfernung des Ethanol wurde nochmals bei 8500 g für 15 s zentrifugiert. Die Elution der RNA von der RNeasy Mini Säule wurde durch Zugabe von 85 μL RNase freiem H_2O erreicht. Die RNeasy Mini Säule konnte für den folgenden Schritt II wiederverwendet werden.
- II. Im zweiten Schritt der DNA-Entfernung wurde zum Eluat 10 μL RDD Puffer sowie 5 μL DNase I Lösung gegeben. Die DNase I Inkubation erfolgte über 45 min bei Raumtemperatur. Zur behandelten Probe wurden 350 μL Puffer RLT und 250 μL 96 % Ethanol gegeben. Die Probe wurde erneut auf die bereits verwendete RNeasy Mini Säule übertragen und bei 8500 g für 15 s zentrifugiert. Daraufhin folgten zwei Waschschrritte mit RPE Puffer mit anschließender Zentrifugation bei 8500 g für 15 s. Der Ethanol Rückstand wurde durch eine erneute Zentrifugation bei 8500 g für 15 s entfernt. Eine Elution der RNA erfolgte durch Zugabe von 50 μL RNase freiem H_2O .
- III. Zum Eluat wurde für die dritte DNase Behandlung 350 μL RW I Puffer gegeben, auf eine neue RNeasy Mini Säule transferiert und bei 8500 g für 15 s zentrifugiert. Die weiteren Schritte erfolgten analog zu der ersten DNase Behandlung. Einziger Unterschied ist das Volumen des RNase freiem H_2O von 35 μL zur Elution der RNA anstatt der 85 μL in der DNase Behandlung I.

Die isolierte RNA wurde bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Puffer und Lösungen für die Isolierung von RNA:

Der RLT Puffer, RW I Puffer, RDD Puffer und RPE Puffer waren Bestandteile des RNeasy Mini Kit. 1 mL des RLT Puffer wurden direkt vor der Verwendung mit 10 μL 14,3 M β -Mercaptoethanol Lösung versetzt. Der RPE Puffer wurde als Konzentrat geliefert und vor der Verwendung 1:4 mit 96 % Ethanol verdünnt.

TE-Puffer:

Die Bestandteile von TE-Puffer sind unter 6.3 aufgeführt. Vor der Verwendung zur Zelllyse wurden 400 $\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$ Lysozym zugegeben und sterilfiltriert.

DNase I Lösung:

1500 Kunitz units der gefriergetrockneten DNase I wurden in 550 μL RNase freiem H_2O gelöst.

6.5.6 Restriktionsspaltung von DNA

Für die Rekombination von DNA kamen verschiedene Restriktionsendonucleasen vom Typ II zum Einsatz. Die Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs und Jena Bioscience bezogen und wurden nach den Herstellervorschriften verwendet. Die Restriktionsspaltung fand zu analytischen Zwecken in der Überprüfung von klonierten Plasmiden Anwendung und wurde auch zu präparativen Zwecken zur Isolierung von Klonierungsfragmenten genutzt. In der Analytik wurden 1-2 μL DNA aus der Plasmidpräparation verwendet und bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur für 0,5 bis 1,5 h inkubiert. Zu präparativen Zwecken wurden zwischen 20 μL und 40 μL aus der Plasmidpräparation (6.5.4) verwendet. Eine möglichst vollständige Restriktion wurde hier durch eine Inkubation über 3 h erreicht. Die Restriktionsansätze wurden dann über eine Gelelektrophorese (6.5.7) entsprechend der darauf folgenden Anwendung weiterverarbeitet.

6.5.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde einerseits zur Analytik von DNA-Fragmenten nach der Restriktionsspaltung und zur Analytik von RT-PCR- und PCR-Produkten eingesetzt und andererseits wurden DNA-Fragmente bekannter Größe über diese Methode voneinander getrennt, um diese dann durch eine Reisolierung (6.5.8) für weitere Klonierungen nutzbar zu machen.

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde üblicherweise 1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C mit 0,1 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ Ethidiumbromid versetzt. Für besonders kleine DNA-Fragmente wurde teilweise 1,5 % bis 1,8 % (w/v) Agarose verwendet und für besonders große DNA-Fragmente 0,8 % (w/v) Agarose. Die Agaroselösung wurde in den Träger gegossen und nach der Aushärtung der Gele in einer Elektrophoresekammer platziert. Vor der Auftragung der Proben wurden die Proben mit 6 x Bromphenolblau-Probenpuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 30 % Glycerin) gemischt. Zur elektrophoretischen Trennung erfolgte der Transfer der Proben in die Probenaschen und es wurde eine Spannung von 80 V bis 120 V angelegt. Als Referenz zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente diente, je nach erwartetem Fragment Muster der zu analysierenden Probe, 1,5 bis 2,0 μL einer 1 kB-Leiter oder einer erweiterten 100 Bp-Leiter der Firma Roth. Eine Auswertung erfolgte durch die Betrachtung der erhaltenen Banden unter UV-Licht.

6.5.8 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde verwendet, um einzelne Fragmente definierter Größe aus Restriktionsansätzen von Cosmiden und Plasmiden zu isolieren. Hierzu wurde ein Restriktionsansatz entsprechend 6.5.6 angesetzt. Allerdings wurde aufgrund des gesteigerten

DNA-Konzentrationsbedarfs, durch die Zugabe größerer Volumina der DNA-Probe, der Ansatz auf 50 µL Gesamtvolumen erhöht. Die Restriktionsfragmente wurden in der Agarosegelelektrophorese im elektrischen Feld getrennt und es konnte die DNA-Bande korrekter Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Um Mutationen durch das UV-Licht zu vermeiden wurde zwischen UV-Tisch und Gel Alufolie platziert. Zum Schneiden der Banden wurde das Gel an den Rand der Alufolie geschoben, sodass nur ein minimaler Anteil des UV-Licht in das Gel eindrang und trotzdem eine gut sichtbare Bande zum Schnitt erkennbar war. Das ausgeschnittene Gel Stück wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß transferiert. Die Isolierung des Gelstückes erfolgte mit Hilfe des Gelextraktionskits der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben. Je nach angestrebter Fragmentkonzentration wurde mit 30 µL bis 50 µL Elutionspuffer eluiert. Die erfolgreiche Isolierung wurde durch auftragen von 1 µL bis 4 µL der Probe auf ein Agarosegel kontrolliert. Zur Lagerung wurden die isolierten Fragmente bei -20 °C eingefroren.

6.5.9 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und der DNA-Reinheit erfolgte fotometrisch. Hierzu wurden 5 µL der zu messenden Probe in 95 µL Wasser verdünnt (20 fach) und in einer Mikroküvette bei den Absorptionsmaxima für DNA (260nm) und Protein (280nm) vermessen. Als Referenzlösung wurde H₂O verwendet. Aus der Tatsache, dass 50 µg doppelsträngige DNA einer OD_{260nm} von 1 entsprechen, konnte die Konzentration (c_{DNA}) über folgende Formel berechnet werden.²⁷³

$$c_{DNA} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = OD_{260\text{nm}} \times 20 \times 50$$

Eine Auskunft über die Reinheit ergab sich aus dem Vergleich mit dem Absorptionsmaximum von Proteinen (OD_{280nm}). Je näher der Quotient aus OD_{260nm} und OD_{280nm} bei 2 liegt desto reinere DNA-Lösung liegt vor. Verunreinigungen durch RNA, einzelsträngige DNA oder Oligonucleotide wurden vernachlässigt, da die erhaltene Messgenauigkeit für die erfolgten Experimente ausreichend war.

6.5.10 Vektordephosphorylierung mit der Antarctic Phosphatase

In einigen Klonierungen erfolgte die Integration der Fragmente nur über ein Restriktionsenzym, sodass der lineare Vektor an beiden Enden das gleiche klebrige Ende aufwies. Um in der Ligation eine Religation der beiden klebrigen Enden des Vektors zu vermeiden, wurden diese an den 5`-Enden dephosphoryliert. Dazu wurde die Antarctic Phosphatase der Firma NEB in folgendem Ansatz verwendet (Tab. 6-17).

Tab. 6-17: Reaktionsansatz der Dephosphorylierungsreaktion.

Menge	Substanz
x μg	Vektor
1 μl x μg^{-1} DNA	Antarctic Phosphatase (5 u x μL^{-1})
1-2 μl	10 x Antarctic Phosphatase Puffer
ad 10-20 μl	ddH ₂ O

Der enzymatische Ansatz wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. Um eine vollständige Dephosphorylierung der klebrigen Enden zu erreichen wurde die gleiche Menge Antarctic Phosphatase erneut zugegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Phosphatase bei 65 °C für 10 min, um weitere Phosphatasereaktionen in der Ligationsreaktion zu vermeiden.

6.5.11 Ligation

Mit der Ligationsreaktion wurden zum Einen die PCR-Fragmente in die T/A-Vektoren kloniert und zum Anderen die verschiedenen Inserts in die Expressionsvektoren ligiert. Die Vektoren und das Insert waren über glatte oder klebrige Enden zueinander kompatibel und wurden vor der Ligation über eine Gelisolation (6.5.8) gereinigt. Die enzymatische Reaktion wurde über die T4-DNA-Ligase katalysiert (New England Biolabs, Jena Bioscience). Folgender Ansatz wurde dabei übernacht bei 4 °C inkubiert (Tab. 6-18).

Tab. 6-18: Reaktionsansatz der Ligation.

Volumen [μL]	Substanz
1-7	Vektor
1-7	Insert
1	10 x T4-Ligase Puffer
1	T4 Ligase (0,4 U)
ad 10	ddH ₂ O

Das Konzentrationsverhältnis von Vektor zu Insert wurde möglichst mit 1:3 gewählt. Die hierfür nötigen Konzentrationen wurden halbquantitativ über die Bandenintensitäten auf einem Agarosegel (6.5.7) bestimmt. Bei der gleichzeitigen Ligation von mehreren Inserts in einen Vektor wurden alle Inserts in der dreifachen Konzentration im Verhältnis zum Vektor eingesetzt. Aufgrund dieser Abhängigkeiten sind die oben angegebenen Volumina für Vektor und Insert variabel. Nach der erfolgten Ligation wurden die Ligationsprodukte entweder direkt transformiert oder es erfolgte eine Hitzeinaktivierung der T4 Ligase bei 65 °C für 10 min mit anschließender optionaler Reinigung über DNA-Fällung vor der Transformation. Die direkte Transformation wurde häufig bei kleinen Konstrukten verwendet, wogegen größere Konstrukte der Hitzeinaktivierung und Reinigung unterzogen wurden.

6.5.12 Reinigung der DNA durch Fällung

Die DNA-Reinigung durch Fällung wurde nach den enzymatischen Zwischenreaktionen (z.B. Ligation, Dephosphorylierung) verwendet um die DNA von Enzymen und den Puffersubstanzen zu trennen. Zu 10 µL Lösung wurden dabei 10 µL 100 % Isopropanol gegeben. Eine effektive Fällung erfolgte bei -20 °C für 20 min. Die gefällte DNA wurde bei 4 °C und 8500 g für 20 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 20 µL 70 % Ethanol gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert (4 °C, 8500 g, 1 min) und das erhaltene Pellet in der Speed Vac getrocknet. Die gereinigte DNA wurde in einem Volumen von 5 µL bis 10 µL Wasser aufgenommen.

6.5.13 Herstellung von glatten Enden mittels der T4-DNA-Polymerase

Bei der Übertragung des Moduls *ped13* sowie dessen Linker-Fusionsprodukten aus dem T/A-Vektor in den Expressionsvektor war es notwendig den *EagI*-generierten Überhang für eine Ligation mit dem *HindIII*-Überhang kompatibel zu machen. Hierzu wurden die 5'-Überhänge durch das Enzym T4-DNA-Polymerase (NEB) mit dNTPs aufgefüllt. Die resultierenden glatten Enden waren hierdurch für eine Ligation kompatibel.

Da die T4-DNA-Polymerase in allen Restriktionspuffern Aktivität aufweist, konnten die *EagI*- bzw. *HindIII*-Fragmente direkt eingesetzt werden. Die Proben wurden mit dNTPs (Endkonzentration 100 µM) supplementiert und 1 U T4-DNA-Polymerase pro 1 µg DNA zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 12 °C inkubiert, bei 75 °C für 20 min inaktiviert und im Weiteren durch DNA-Fällung (6.5.12) aufgereinigt.

6.5.14 T/A-Klonierung

Die T/A-Klonierung wurde verwendet um PCR-Amplifikate in einen Vektor zu bringen. Diese Vektoren dienten zur Lagerung, Sequenzierung und ständigen Verfügbarkeit der verschiedenen Fragmente für weitere Klonierungsschritte. Die in der T/A-Klonierung verwendeten PCR Produkte wiesen, je nach verwendeter Polymerase, 3'-dATP-Überhänge auf. Die in dieser Arbeit verwendeten Polymerasen *Taq*- bzw. *Hifi-Taq*-Polymerase erzeugen im Gegensatz zur *Pfu*-Polymerase 3'-dATP-Überhänge. Daher mußte bei *Pfu*-generierten PCR-Produkten ein sogenanntes A-Tailoring durchgeführt werden, wobei dATP an das 3'-Ende angefügt wird (6.5.14.2). Als Vektoren zur Aufnahme der PCR-Produkte wurden die Vektoren pGEM-T Easy, pCR 2.1-TOPO und pBluescript SK(+) verwendet. Die Vektoren pGEM-T Easy und pCR 2.1-TOPO waren bereits geschnitten und besaßen an den 3'-Enden dTTP-Überhänge, sodass das Insert durch A-Überhänge mit den T-Überhängen des Vektors kompatibel ligieren konnte. Der Vektor pBluescript SK(+) musste für die T/A-Klonierung vorbereitet werden (6.5.14.1).

6.5.14.1 Herstellung von T/A-Vektor aus dem Vektor pBluescript²⁷⁴

Für die Generierung von glatten Enden in pBluescript SK(+) wurde die Schnittstelle *EcoRV* ausgewählt. Außerdem eignete sie sich durch die Lokalisierung in der MCS und der damit verbundene Möglichkeit einer Blau/Weiß-Selektion (6.4.4) sehr gut für die T/A-Klonierung.

Der Vektor pBluescript SK(+) wurde mit *EcoRV* geschnitten (6.5.6) und das Restriktionsenzym bei 80 °C für 20 min inaktiviert. Die 3'-dTTP-Überhänge wurden durch Zugabe von 1 U x μg^{-1} DNA Taq Polymerase sowie 10 μL 10 mM dTTP und einer Inkubation von 2 h bei 70 °C angefügt. Es folgte eine Reinigung durch Zugabe von 100 μL CHCl_3 im Zweiphasensystem und anschließender Zentrifugation bei 8500 g für 5 min. Die obere Phase wurde in 70 μL Isopropanol überführt und die ausfallenden Plasmide-DNA bei 8500 g für 20 min und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet mit 200 μL eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut bei 8500 g für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet in der Speed Vac getrocknet und in 10 μL Wasser gelöst. Der fertige T/A-Vektor konnte bei -20 °C gelagert werden.

6.5.14.2 A-Tailoring

Mit dem A-Tailoring wurden an PCR-Produkte, die mit der *Pfu*-Polymerase amplifiziert wurden, 3'-dATP-Überhänge erzeugt um sie für eine T/A-Klonierung kompatibel zu machen. Für die enzymatische Reaktion wurde die *Taq*-Polymerase in folgendem Reaktionsansatz verwendet (Tab. 6-19) und bei 72 °C für 8 bis 10 min inkubiert.

Tab. 6-19: Reaktionsansatz der A-Tailoring Reaktion.

Volumen [μL]	Substanz
2	PCR-Produkt
2	dATP (1 mM)
1	ThermoPol-Puffer (10x)
0,25	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 u x μL^{-1})
ad 10	ddH ₂ O

6.5.15 Nutzung der DNA-Methylierung in Klonierungen

In einigen Klonierungen wurden Restriktionsenzyme verwendet, die ihre Erkennungssequenz aufgrund vom Bakterium eingeführter Methylierungen nicht schneiden. Um hier trotzdem eine Restriktion zu ermöglichen wurden die zu schneidenden Vektoren und Plasmide in eine *E. coli* Mutante kloniert, dessen Methylierungssysteme *dam* und *dcm* ausgeschaltet wurden. Dies war durch den Stamm *E. coli* ET12567²⁵⁸, der *dam*⁻ und *dcm*⁻ ist, möglich. Dazu wurde das fertige Plasmid in den *E. coli* ET12567 transformiert und anschließend durch eine Plasmidisolierung reisoliert.

In einigen Fällen wurde der entgegengesetzte Effekt ausgenutzt, indem integrierte Schnittstellen des zu klonierenden Fragmentes durch Methylierungen nicht geschnitten wurden und nur die gewollte

endständige Restriktion erreicht wurde. Letzteres verdient eigentlich nicht als eigenständige Methode genannt zu werden, da alle Vektoren und Plasmide - ausgenommen die des *E. coli* ET12567 - methyliert waren. Da jedoch einige Klonierungen ohne Beachtung dieses Effektes nicht funktioniert hätten findet sie hier trotzdem Erwähnung. Die folgende Tab. 6-20 führt die Restriktionen an, welche zwingend den oben aufgeführten Prinzipien folgen mussten.

Tab. 6-20: Übersicht über die Vektoren und Plasmide, dessen Restriktion über Methylierungs-empfindliche Enzyme erfolgte.

Vektor-/Plasmid-Bezeichnung	Methylierung	Verwendete Restriktionsenzyme	Isoliertes Fragment
pPS9D2	<i>dam</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁻	<i>Clal</i> / <i>BspEI</i>	<i>ped3</i> Mittelteil
pHN1	<i>dam</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁻	<i>Bam</i> HI/ <i>Clal</i>	<i>ped3</i> Modulanfang
pHN7	<i>dam</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁻	<i>Bam</i> HI/ <i>Bsu36I</i>	<i>pedF</i> Linker
pHN8	<i>dam</i> ⁺ , <i>dcm</i> ⁺	<i>Bam</i> HI/ <i>Hpy188I</i>	<i>eryA</i> Linker ₁
pHN9	<i>dam</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁻	<i>Bam</i> HI/ <i>Clal</i>	Plasmid zur Integration des Fusionprodukt Linker-Modulanfang
pHN11	<i>dam</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁻	<i>BspEI</i> / <i>EagI</i>	<i>ped3</i> Modulende
pHN12	<i>dam</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁻	<i>Bsu36I</i> / <i>Clal</i>	<i>ped3</i> Modulanfang zur Integration <i>pedF</i> -Linker
pHN13	<i>dam</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁻	<i>Hpy188I</i> / <i>Clal</i>	<i>ped3</i> Modulanfang zur Integration <i>eryA</i> -Linker _{1,2}
pHN18	<i>dam</i> ⁺ , <i>dcm</i> ⁺	<i>Bam</i> HI/ <i>Hpy188I</i>	<i>eryA</i> Linker ₂

Die Abb. 6-1 verdeutlicht die erforderlich gewesenenen DNA-Methylierungen anhand des linear dargestellten Cosmids pPS9D2 und des linear dargestellten Plasmids pHN8. Gezeigt ist, dass ein effektives Schneiden des Cosmids pPS9D2 nur möglich war, wenn die gekennzeichneten Schnittstellen nicht methyliert waren. Bei dem Plasmid pHN8 war ein effektives Schneiden nur im Falle von methylierter DNA möglich, da die nötige *Bam*HI-Schnittstelle sonst durch ein zu häufiges Schneiden des Enzyms *Hpy188I* entfernt worden wäre.

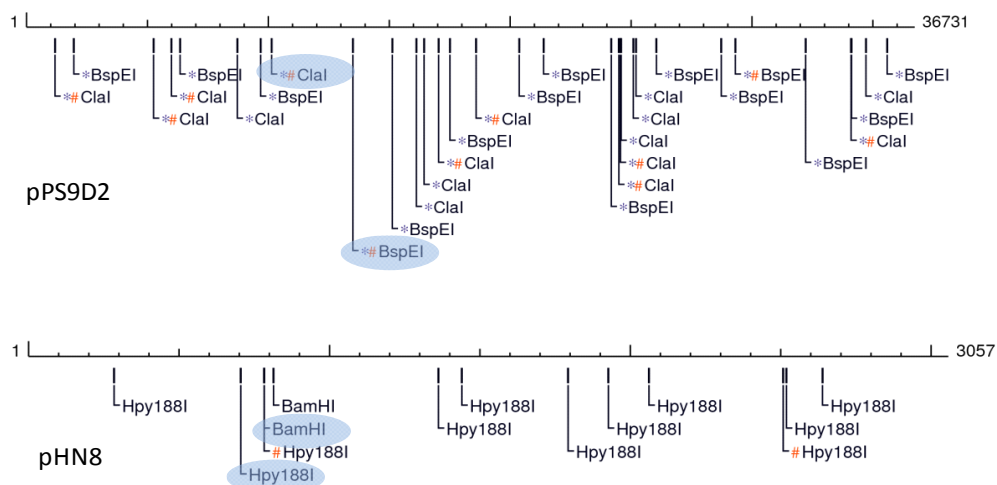


Abb. 6-1: Schematische Darstellung des Restriktionsmusters von pPS9D2 und pHN8 durch den NEB-Cutter 2.0.²⁷⁵

Die zu verwendenden Schnittstellen sind blau hinterlegt. Schnittstellen, die aufgrund von Methylierungen nicht geschnitten wurden sind mit # gekennzeichnet. Die Effekte durch CpG-Methylierungen (*-Kennzeichnung) sind in Prokaryoten zu vernachlässigen.

6.5.16 Sequenzierung

Um Mutationen in den klonierten Biosynthesegenen zu vermeiden wurden alle T/A-klonierten Plasmide sequenziert. Dadurch wurde sichergestellt, dass in der PCR erfolgte Synthesefehler der Polymerase bemerkt wurden und neu amplifiziert werden konnten. Eine Ausnahme stellte die Apramycin-Resistenz in pHN1000 dar, da hier die Funktion der Resistenz ausreichend war. In einigen Fällen wurden zusätzlich die Proteinexpressionsplasmide sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Tab. 6-21 zeigt, welche Sequenzierprimer für das jeweiligen Vektor verwendet wurden.

Tab. 6-21: Übersicht über die verwendeten Sequenzierprimer.

Vektor	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
pBluescript SK(+)	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
pGEM-T Easy	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
	SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA
pCR2.1 TOPO	M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGACC
	M13 Forward	TGTAAAACGACGGCCAGT
pHIS8	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
	pET Reverse	CTAGTTATTGCTCAGCGG
pASK-IBA 3/5	Forward	GAGTTATTTTACCACTCCCT
	Reverse	CGCAGTAGCGGTAAACG
pET52b(+)	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
	T7-Terminator	CCGCTGAGCAATAACTAGC
Champion pET-Sumo	Sumo Forward	AGATTCTTGTACGACGGTATTAG
	T7 Reverse	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

6.5.17 Klonierung von Proteinexpressionsplasmiden

Bei der Klonierung der Proteinexpressionsplasmide kam standardisiert folgendes Prinzip zum Einsatz: Die Biosynthesegene wurden mit der PCR (6.5.1) amplifiziert, zur Lagerung, Sequenzierung und ständigen Verfügbarkeit über eine T/A-Klonierung (6.5.14) in einen bakteriellen Vektor gebracht und letztendlich über Restriktion (6.5.6) und Ligation (6.5.11) vom T/A-Vektor in den Expressionsvektor transferiert. Dabei wurden die unter 6.5.17.1 dargestellten Lagerungsplasmide (Tab. 6-22) und die in 9.1.2 zusammengefassten Proteinexpressionsplasmide (Tab. 6-23) generiert.

Eine Ausnahme zu dem oben genanntem standardisiertem Klonierungsverfahren stellte die Klonierung mit dem Vektor pET-Sumo dar. Hier führte die Insertion des Biosynthesegens über T/A-Klonierung direkt zum Proteinexpressionsplasmid.

Aufgrund der Größe des Modul *ped13* wurde, im Gegensatz zu der unter 6.5.17 beschriebenen Methode, eine modifizierte Strategie zur Klonierung verwendet. Hier wurde der Anfang und das Ende des Moduls mit der PCR amplifiziert. Der größere Mittelteil des Moduls wurde aus dem Cosmid pPS9D2 (vgl. 6.1.1) ausgeschnitten. Zusätzlich wurden unterschiedliche molekulare Linker am 5'-Ende

des Moduls angefügt. Im Ergebnis- und Diskussionsteil werden diese Klonierungen schematisch dargestellt und verdeutlichen die Vorgehensweise (5.1.1.1 und 5.1.1.2).

6.5.17.1 Entstandene Plasmide (T/A-Klonierung)

Im Folgenden sind die generierten Plasmide zur Lagerung, Sequenzierung und ständigen Verfügbarkeit der Biosynthesegene zusammengefasst (Tab. 6-22).

Tab. 6-22: Übersicht über die entstandenen Plasmide zur Lagerung, Sequenzierung und ständigen Verfügbarkeit der Biosynthesegene.

Bezeichnung	Vektor	Insert	Gen-flankierende Schnittstellen
pHN1	pGEM-T Easy	<i>pedI3</i> -Modulanfang	<i>Bam</i> HI/ <i>Cl</i> AI
pHN2	pCR2.1 Topo	<i>pedI3</i> -Modulende (ohne Stop-Codon)	<i>Bsp</i> EI/ <i>Eag</i> I
pHN3	pBluescript SK(+)	<i>pedI3</i> (ohne Stop-Codon)	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN7	pGEM-T Easy	<i>pedF</i> -Linker	<i>Bam</i> HI/ <i>Bsu</i> 36I
pHN8	pBluescript SK(+)	<i>eryA</i> -Linker ₁ *	<i>Bam</i> HI/ <i>Hpy</i> 188I
pHN9	pBluescript SK(+)	<i>pedI3</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN11	pGEM-T Easy	<i>pedI3</i> -Modulende (mit Stop-Codon)	<i>Bsp</i> EI/ <i>Eag</i> I
pHN12	pGEM-T Easy	<i>pedI3</i> -Modulanfang für Fusion mit <i>pedF</i> -Linker	<i>Bsu</i> 36I/ <i>Cl</i> AI
pHN13	pGEM-T Easy	<i>pedI3</i> -Modulanfang für Fusion mit <i>eryA</i> -Linker _{1,2}	<i>Hpy</i> 188I/ <i>Cl</i> AI
pHN14	pBluescript SK(+)	Fusion <i>pedF</i> -Linker/ <i>pedI3</i> (mit Stop-Codon)	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN15	pBluescript SK(+)	Fusion <i>eryA</i> -Linker ₁ / <i>pedI3</i> (mit Stop-Codon)	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN18	pBluescript SK(+)	<i>eryA</i> -Linker ₂ *	<i>Bam</i> HI/ <i>Hpy</i> 188I
pHN19	pBluescript SK(+)	Fusion <i>eryA</i> -Linker ₂ / <i>pedI3</i> (mit Stop-Codon)	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN22	pBluescript SK(+)	Fusion <i>pedF</i> -Linker/ <i>pedI3</i> (ohne Stop-Codon)	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN23	pBluescript SK(+)	Fusion <i>eryA</i> -Linker ₁ / <i>pedI3</i> (ohne Stop-Codon)	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN24	pBluescript SK(+)	Fusion <i>eryA</i> -Linker ₂ / <i>pedI3</i> (ohne Stop-Codon)	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN29	pBluescript SK(+)	<i>pedL</i>	<i>Sal</i> I/ <i>Sal</i> I
pHN30	pBluescript SK(+)	<i>pedL</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN37	pBluescript SK(+)	<i>pedC</i>	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I
pHN39	pBluescript SK(+)	<i>pedC</i>	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I
pHN41	pBluescript SK(+)	<i>pedC</i>	<i>Nco</i> I/ <i>Nco</i> I
pHN43	pBluescript SK(+)	<i>psyD</i> O-MT	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I
pHN45	pBluescript SK(+)	<i>psyD</i> O-MT	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I
pHN47	pBluescript SK(+)	<i>psyD</i> O-MT	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN49	pBluescript SK(+)	<i>psyC</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN51	pBluescript SK(+)	<i>psyC</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I
pHN53	pBluescript SK(+)	<i>psyK</i>	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I
pHN55	pBluescript SK(+)	<i>psyK</i>	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I
pHN57	pBluescript SK(+)	<i>psyK</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I
pHN59	pBluescript SK(+)	<i>psyA</i> -ACP ₃	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN61	pBluescript SK(+)	<i>psyA</i> -ACP ₃	<i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I
pHN63	pBluescript SK(+)	<i>psyA</i> -ACP ₃	<i>Eco</i> RI/ <i>Nco</i> I
pHN65	pBluescript SK(+)	<i>psyD</i> -ACP ₁	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I
pHN67	pBluescript SK(+)	<i>psyD</i> -ACP ₁	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I
pHN69	pBluescript SK(+)	<i>psyD</i> -ACP ₁	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I
pHN71	pBluescript SK(+)	<i>psyC</i>	<i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I
pHN73	pBluescript SK(+)	<i>psyC</i>	<i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I
pHN75	pBluescript SK(+)	<i>psyA</i> -ACP ₃	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III
pHN76	pBluescript SK(+)	<i>psyD</i> -ACP ₁	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III

* Der *eryA*-Linker1 und *eryA*-Linker2 sind zwei Varianten eines Linkers der Erythromycin-PKS. Generiert wurden diese durch Verwendung unterschiedlicher PCR-Primer (vgl. Tab. 6-11).

6.5.17.2 Entstandene Expressionsplasmide

Im Folgenden sind die erzeugten Proteinexpressionsplasmide zusammengefasst (Tab. 6-23).

Tab. 6-23: Übersicht über die generierten Expressionsplasmide zur Überexpression von Proteinen.

Bezeichnung	Exprimiertes Gen	Donorplasmid	Restriktionsenzyme		Rezipientenvektor	AS-kodierende Gengröße [Bp]
pHN10	<i>holo-pedI3</i>	pHN9	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I (T4-blunt)	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III (T4-blunt)	pHIS8- <i>svp</i>	4401
pHN16	Fusion <i>pedF</i> -Linker/ <i>holo-pedI3</i>	pHN14	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I (T4-blunt)	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III (T4-blunt)	pHIS8- <i>svp</i>	4362
pHN17	Fusion <i>eryA</i> -Linker ₁ / <i>holo-pedI3</i>	pHN15	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I (T4-blunt)	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III (T4-blunt)	pHIS8- <i>svp</i>	4314
pHN20	Fusion <i>eryA</i> -Linker ₂ / <i>holo-pedI3</i>	pHN19	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I (T4-blunt)	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III (T4-blunt)	pHIS8- <i>svp</i>	4332
pHN31	<i>pedL</i>	pHN29	<i>Sal</i> I/ <i>Sal</i> I	<i>Sal</i> I/ <i>Sal</i> I	pET52b(+)	918
pHN32	<i>pedL</i>	pHN30	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I	pHIS8	816
pHN33	<i>apo-pedI3</i>	pHN10			pHIS8	4401
pHN34	Fusion <i>pedF</i> -Linker/ <i>apo-pedI3</i>	pHN16	Entstehung der Plasmide pHN33,34,35,36 durch Entfernung des <i>svp</i> -Gens in pHN10,16,17,20 über Restriktion mit <i>Not</i> I und Religation.		pHIS8	4362
pHN35	Fusion <i>eryA</i> -Linker ₁ / <i>apo-pedI3</i>	pHN17			pHIS8	4314
pHN36	Fusion <i>eryA</i> -Linker ₂ / <i>apo-pedI3</i>	pHN20			pHIS8	4332
pHN38	<i>pedC</i>	pHN37	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	pASK3	1032
pHN40	<i>pedC</i>	pHN39	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	pASK5	1038
pHN42	<i>pedC</i>	pHN41	<i>Nco</i> I/ <i>Nco</i> I	<i>Nco</i> I/ <i>Nco</i> I	pHIS8	1059
pHN44	<i>psyD</i> O-MT	pHN43	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	pASK3	1020
pHN46	<i>psyD</i> O-MT	pHN45	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	pASK5	1026
pHN48	<i>psyD</i> O-MT	pHN47	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I	pHIS8	1053
pHN50	<i>psyC</i>	pHN49	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I	pHIS8	1092
pHN52	<i>psyC</i>	pHN51	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I	pET52b(+)	1176
pHN54	<i>psyK</i>	pHN53	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	pASK3	1131
pHN56	<i>psyK</i>	pHN55	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	pASK5	1137
pHN58	<i>psyK</i>	pHN57	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I	pHIS8	1164
pHN60	<i>apo-psyA</i> -ACP ₃ *	pHN59	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I	pHIS8	297
pHN62	<i>apo-psyA</i> -ACP ₃	pHN61	<i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I	<i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I	pASK3	306
pHN64	<i>apo-psyA</i> -ACP ₃	pHN63	<i>Eco</i> RI/ <i>Nco</i> I	<i>Eco</i> RI/ <i>Nco</i> I	pASK5	291
pHN66	<i>apo-psyD</i> -ACP ₁ *	pHN65	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I	<i>Bam</i> HI/ <i>Eag</i> I	pHIS8	318
pHN68	<i>apo-psyD</i> -ACP ₁	pHN67	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	pASK3	285
pHN70	<i>apo-psyD</i> -ACP ₁	pHN69	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	<i>Bsa</i> I/ <i>Bsa</i> I	pASK5	291

Fortsetzung Tab. 6-23

Bezeichnung	Exprimiertes Gen	Donorplasmid	Restriktionsenzyme	Rezipientenvektor	AS-kodierende Gengröße [Bp]	Bezeichnung
pHN72	<i>psyC</i>	pHN71	<i>EcoRI/PstI</i>	<i>EcoRI/PstI</i>	pASK3	1101
pHN74	<i>psyC</i>	pHN73	<i>EcoRI/PstI</i>	<i>EcoRI/PstI</i>	pASK5	1086
pHN77	<i>holo-psyA-ACP₃</i>	pHN75	<i>BamHI/HindIII</i>	<i>BamHI/HindIII</i>	pHIS8- <i>svp</i>	297
pHN78	<i>holo-psyD-ACP₁</i>	pHN76	<i>BamHI/HindIII</i>	<i>BamHI/HindIII</i>	pHIS8- <i>svp</i>	318
pHN79	<i>psyC</i>	Entfällt	Direkte T/A-Klonierung		pET-Sumo	1386

*Die Bezeichnung *psyA-ACP₃* bezieht sich auf die dritte ACP des Gens *psyA*. Analog hierzu bezeichnet *psyD-ACP₁* die erste ACP des Gens *psyD*.

6.5.17.3 Weitere in dieser Arbeit verwendete Expressionsplasmide

Mehrere Proteine in dieser Arbeit wurden durch Proteinexpressionsplasmide erhalten, die nicht im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind. Für einige weiterführende Experimente allerdings unerlässlich waren (Tab. 6-24).

Tab. 6-24: Übersicht über Expressionsplasmide, dessen exprimierte Proteine in dieser Arbeit Anwendung finden, jedoch nicht selbst konstruiert worden sind.

Plasmidbezeichnung	Kodiertes Gen	Ursprungsvektor	Referenz
pKZ178-1	<i>pedD</i>	pHIS8	Zimmermann, K. ⁹¹
pKZ161-1	<i>apo-pedN</i>	pHIS8	Zimmermann, K. ⁹¹
pKZ124-17	<i>holo-pedN</i>	pHIS8- <i>svp</i>	Zimmermann, K. ⁹¹
pKZ176-1	<i>apo-pedI</i> Doppel-ACP	pHIS8	Zimmermann, K. ⁹¹
pKZ123-19	<i>holo-pedI</i> Doppel-ACP	pHIS8- <i>svp</i>	Zimmermann, K. ⁹¹
pKZ193-1	<i>pedM</i>	pHIS8	Zimmermann, K. ⁹¹
pKZ194-1	<i>pedP</i>	pHIS8	Zimmermann, K. ⁹¹
pET29- <i>sfp</i>	<i>Sfp</i>	pET29- <i>sfp</i>	Yin <i>et al.</i> ²⁷⁶

6.5.18 Analytik der konstruierten T/A- und Proteinexpressionsplasmide

Alle konstruierten Plasmide wurden auf ihre Korrektheit durch Verwendung der Restriktionsanalyse überprüft. Dazu wurden mit dem Programm NEB Cutter 2.0²⁷⁵ mehrere Restriktionsenzyme gesucht, die sowohl an verschiedenen Stellen im Vektor als auch im Insert schneiden. Bei der Restriktion von klonierten Plasmide, dessen Insert beidseitig mit dem gleichen klebrigen Ende inseriert wurde, erfolgte mindestens ein Restriktionsschnitt, der unsymmetrisch im Insert schneidet. Dadurch konnte die Insertionsorientierung auf ihre Richtigkeit überprüft werden. Bei korrektem Bandenmuster nach der Gelelektrophorese wurde das Konstrukt für weitere Experimente eingesetzt.

In einigen Fällen wurde vor der beschriebenen Analyseverfahren eine Analytik mittels PCR oder Kolonie-PCR durchgeführt. Dies erfolgte bei Klonierungen, die viele falsche Varianten erwarten ließ, beispielsweise bei der 4 Punkt Ligation von *pedI3* in den Vektor pBluescript SK(+) (vgl. Abb. 5-1). Auf

diese Weise konnten schnell richtige Klone selektiert werden. Die verwendeten Primer sind in Tab. 6-25 aufgelistet.

Tab. 6-25: Verwendete Primer zur Analyse von Plasmidkonstrukten.

Zu überprüfendes Konstrukt	Sequenz (5'→3')	Optimale Annealing-Temperatur [°C]
Modul <i>ped</i> 3 _{1,2} in pBluescriptSK(+)	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAAT	60,1
	CCGGACGGGTGCAGATAGACAT	
Gene in pASK-IBA3 und pASK-IBA5	GAGTTATTTTACCACTCCCT	57,0
	CGCAGTAGCGGTAAACG	
Gene in pET-Sumo	AGATTCTTGTACGACGGTATTAG	56,3
	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	

Alle Lagerungsplasmide und ein Teil der Expressionsplasmide wurden zur Überprüfung der Sequenz der insertierten DNA-Fragmente sequenziert (6.5.16).

6.5.19 Klonierung über homologe Rekombination mit dem λ -red System

Zur Komplementierung, der in der heterologen Expression des Pederin-Clusters nicht transkribierten Gene *pedN*, *pedM* und *pedL* (vgl. 5.2), sollten Plasmide generiert werden, die diese Gene unter der Kontrolle des *pedC/pedD*-Promotor exprimieren. Da eine Klonierung der entsprechenden Plasmide zur heterologen Expression des Pederin-Clusters über herkömmliche Klonierung aufgrund fehlender geeigneter Restriktionsschnittstellen nicht möglich war, wurden die Fragmente mittels homologer Rekombination übertragen. Hierzu wurde ein RecET-System verwendet, das aus den Genen *exo*, *bet* und *gam* des λ -Phagen besteht. Diese sind auf dem Plasmid pKD46 (Abb. 6-2) codiert und stehen unter der Regulation des Arabinose induzierbarem PBAD-Promotors.²⁴⁷ Nach der Induktion des Promotors in *E. coli* BW25113 führen die exprimierten Proteine zu drastisch gesteigerten Rekombinationsraten.²⁶⁰ Das System ermöglicht somit, dass lineare, durch Elektroporation eingebrachte DNA-Fragmente, in einem Schritt durch Doppel-Crossover gezielt integriert werden können. Die Integrationsstelle wird durch kurze homologe Bereiche an den Enden der linearen DNA gesteuert.

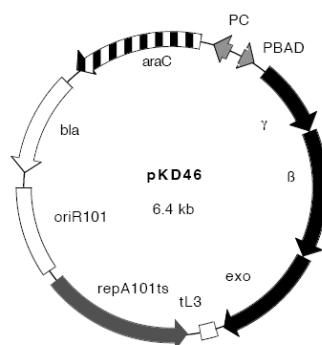


Abb. 6-2: Plasmidkarte des RecET codierenden Plasmids pKD46.²⁴⁷

Für die Amplifikation der Fragmente wurden lange Primer benötigt. Einerseits sollten sie spezifisch das Integrationsfragment amplifizieren und andererseits in 5`- und 3`-Richtung des zu klonierenden Fragmentes ca. 39 Bp homolog zur Integrationsstelle für den Doppel-Crossover anhängen. Die Primer, dessen Anlagerungstemperatur sowie das Temperaturprofil des Thermocycler sind unter 6.5.1.2, Tab. 6-12 und 6.5.1, Tab. 6-10 dargestellt.

6.5.19.1 Elektroporation von pHB136 und pHN1005 in *E. coli* BW25113 pKD46

Es wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* BW25113 pKD46 in SOC-Medium mit Amp¹⁰⁰ bei 30 °C angesetzt. 300 µL der Kultur wurden in 30 mL SOB-Medium und Amp¹⁰⁰ überimpft. Nachdem die Zellen eine OD von 0,4 bis 0,6 erreicht hatten, wurden sie elektrokompent gemacht (6.4.3.2). Die Plasmide pHB136 und pHN1005 wurden in die Zellen transformiert (6.4.3.3), auf Festmedium mit Amp¹⁰⁰ und Cm²⁵ ausplattiert und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die erhaltenen Transformanden wurden für einen weiteren Einsatz in Kryokulturen bei -80 °C gelagert (6.4.1).

6.5.19.2 PCR-targeting von pHB136 und pHN1005

Die unter 6.5.19.1 generierten *E. coli* BW 25113 pKD46 pHB136 und *E. coli* BW 25113 pKD46 pHN1005 wurden über Nacht bei 30 °C in SOC-Medium (Cm²⁵, Amp¹⁰⁰) angezogen. 2 mL der Kultur wurden in 200 mL SOB-Medium (Cm²⁵, Amp¹⁰⁰) überimpft. Es erfolgte die Zugabe von Arabinose in einer Endkonzentration von 10 mM, wodurch die Induktion der λ red-Gene erreicht wurde. Nach einer Inkubation bei 30 °C bis zu einer OD von 0,4 bis 0,6 im Schüttelinkubator wurden die Zellen elektrokompent gemacht (6.4.3.2). Anschließend erfolgte die Elektroporation (6.4.3.4) mit 2 µL linearer PCR-Produkte, die entsprechend 6.5.1 amplifiziert wurden. Die Selektion erfolgte auf LB-Agarplatten mit Apr⁵⁰ bei 37 °C über Nacht. Dabei verlieren die Bakterien zum größten Teil das temperatursensitive pKD46-Plasmid und enthalten idealer Weise nur die Zielplasmide pHN1014a, pHN1014b, pHN1015a und pHN1015b (vgl. Abb. 5-55). Die entstandenen Klone wurden mittels Kolonie-PCR auf die korrekte Integration gescreent. Eine weitere Kontrolle der erhaltenen positiven Klone erfolgte durch die unter 6.5.19.3 geschilderte Prozedur.

6.5.19.3 Plasmidüberprüfung

Da in der Klonierung durch die λ-red-medierte homologe Rekombination auch Klone entstanden, die nicht nur das gewünschte Plasmid pHN1014a, pHN1014b, pHN1015a und pHN1015b enthielten, sondern auch falsch rekombinierte Plasmide und übergebliebene, nicht rekombinierte Plasmide pHB136 und pHN1005, waren folgende Selektionschritte erforderlich. Die aufgrund der vorhandenen Resistenz positiven Klone wurden einer Plasmidisolierung (6.5.4) unterzogen. Die erhaltenen Plasmide wurden in *E. coli* XL1 blue transformiert (6.4.3.4) und erneut auf Selektivagar (Apr⁵⁰) plattiert. Die

daraus erhaltenen Kolonien wurden dann erneut durch eine Ausplattierung auf Apr⁵⁰- und Cm²⁵-Agar selektiert. Für die weiteren Versuche wurden ausschließlich Zellen verwendet, die auf der Apr⁵⁰-Platte Kolonien bildete. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Plasmide der Klone erfolgreich rekombiniert wurden und keine der Ursprungsplasmide, die als Resistenz Cm²⁵ tragen, vorhanden waren. Im Weiteren wurden die Plasmide durch Restriktionsanalyse entsprechend 6.5.18 untersucht und konnten daraufhin in der heterologen Expression des Pederin-Clusters eingesetzt werden.

6.5.19.4 Plasmide

Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die zu Beginn der Arbeit bereits vorhandenen Plasmide (Tab. 6-26), die durch herrkömmliche Klonierung generierten Plasmide (Tab. 6-27) und die durch homologe Rekombination hergestellten Plasmide (Tab. 6-28).

Tab. 6-26: Ausgangsplasmide der λ -red-Klonierung.

Plasmidbezeichnung	Funktion	relevante Gene*	Herkunft
pIJ773	PCR-Templat für Apr ^R	Apr ^R	Gust <i>et al.</i> ²⁶⁰
pHB143	Quelle <i>pedNML</i> über <i>BamHI/BglII</i>	<i>pedNML</i>	Jing He ²⁴⁴
pHB133	Ziel der λ -red Integration von <i>pedNML</i>	<i>svp, sfpB, pcpS</i>	Jing He ²⁴⁴
pHB136	Zielplasmid der λ -red Integration von Apr ^R - <i>pedC/pedD</i> -Promoter	<i>pedPDCBANMLOE, sfpB, pcpS</i>	Jing He ²⁴⁴

*Als relevante Gene sind die Gene genannt, die für Biosyntheseschritte des Pederin oder für die Selektion der Plasmide eine Bedeutung haben. Dazu gehören PPTasen, Gene des Pederin-Clusters oder Resistenzgene.

Tab. 6-27: Konstruierte Plasmide für die λ -red-Klonierung.

Plasmid-bezeichnung	Funktion	relevante Gene*	Verwendete Klonierung
pHN1000	Zielplasmid Apr ^R	<i>pedC/pedD</i> -Promotor	T/A-Klonierung
pHN1005	Zielplasmid der λ -red-Integration von Apr ^R - <i>pedC/pedD</i> -Promotor	<i>pedNML, sfpB, pcpS</i>	<i>BamHI/BglII</i>
pHN1010	Quelle Apr ^R über <i>PstI/PstI</i>	Apr ^R	T/A-Klonierung
pHN1011a	PCR-Templat zum Erhalt linearer DNA Fragmente für λ -red-Rekombination	<i>pedC/pedD</i> -Promotor, Apr ^R	<i>PstI/PstI</i>
pHN1011b	PCR-Templat zum Erhalt linearer DNA Fragmente für λ -red-Rekombination	<i>pedC/pedD</i> -Promotor, Apr ^R	<i>PstI/PstI</i>

*Als relevante Gene sind die Gene genannt, die für Biosyntheseschritte des Pederin oder für die Selektion der Plasmide eine Bedeutung haben. Dazu gehören PPTasen, Gene des Pederin-Clusters oder Resistenzgene.

Tab. 6-28: Plasmide zur heterologen Expression der kodierten Pederingene unter Kontrolle des *pedC/pedD*-Promotor.

Plasmidbezeichnung	relevante Gene*	Resistenz	Verwendete Klonierung
pHN1014a	<i>pedPDCBANMLOE, sfpB, pcpS</i>	Apr ^R	λ -red Rekombination
pHN1014b	<i>pedPDCBANMLOE sfpB, pcpS</i>	Apr ^R	λ -red Rekombination
pHN1015a	<i>pedNML, sfpB, pcpS</i>	Apr ^R	λ -red Rekombination
pHN1015b	<i>pedNML, sfpB, pcpS</i>	Apr ^R	λ -red Rekombination

*Als relevante Gene sind die Gene genannt, die für Biosyntheseschritte des Pederin eine Bedeutung haben. Dazu gehören PPTasen, Gene des Pederin-Clusters oder Resistenzgene.

Zusammenfassend wird im Ergebnis- und Diskussionsteil unter 5.2.1 die Klonierung detailliert beschrieben und schematisch in Abb. 5-55 dargestellt.

6.6 Proteinexpression, Proteinreinigung und Proteinanalytik

6.6.1 Alignments zur Festlegung des Leserahmens

Für alle zu exprimierenden intermodularen Domänen oder Module, die kein eigenes Start- und Stop-Codon besitzen, wurden über Alignments der Aminosäuresequenzen der Anfang und das Ende der intermodularen Domäne oder des Moduls festgelegt. Hierzu wurde das Programm Bioedit 7.0.9.0 verwendet. Die Grenzen wurden bestimmt für das Modul PedI3, für die Fusionen PedF-Linker mit PedI3 und EryA-Linker_{1,2} mit PedI3, die ACP-Domänen PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁ sowie die Domäne PsyD O-MT. Für das Alignment wurden Proteine anderer Cluster und nah verwandte Proteine verwendet (Tab. 6-29). Die verwendeten Sequenzen für das Alignment mit PsyD O-MT werden mit GI-Nummer anstatt einer Referenz angegeben.

Tab. 6-29: In den Alignments verwendete Proteine.

Proteine	Für das Alignment verwendete Proteine mit Referenz
PedI3	EryA ₃ ¹⁵² , Pika ₃ ¹⁵³ , Pika ₄ ¹⁵³ , EpoB ^{154,155}
PedF-Linker mit pedI3	EryA ₂ ¹⁵³ , Pika ₃ ¹⁵³
EryA-Linker _{1,2} mit pedI3	EryA ₂ ¹⁵³ , Pika ₃ ¹⁵³
PsyA-ACP ₃	PedN ⁹¹ , Doppel-ACP von PedI3 ⁹¹
PsyD-ACP ₁	PedN ⁹¹ , Doppel-ACP von PedI3 ⁹¹
PsyD O-MT	PedF(GI: 44662946), PedO(GI: 57117511), PedE (GI: 32436720), OnnI(GI: 56553471), OnnH (GI: 56553470), OnnG (GI: 56553469), OnnD (GI: 56553466), BryB(GI: 121624846), BryA(GI: 121624850), StiE (GI:19572322), StiD (GI:19572321), MtaF (GI:6635399), MtaE (GI:6635398), MelE (GI:38174853), JamN (GI:46486684), CurL (GI:50082960), CtaF (GI:56609596), CtaE (GI:56609595), BarF (GI:23452297)

6.6.2 Proteinexpression

Dieses Kapitel stellt die allgemeine Vorgehensweise bei der Proteinexpression dar. Die detaillierten Expressionsbedingungen für das jeweilige Protein sind dem Ergebnis- und Diskussionsteil zu entnehmen.

Für die Expression der zu analysierenden Biosynthesegene wurden die Stämme *E. coli* BL21 DE3 und *E. coli* Rosetta-gami 2 DE3 pLysS sowie *E. coli* ArcticExpress DE3 verwendet. 1 µL der jeweiligen Plasmidpräparation wurde in der Elektroporation (6.4.3.4) für die Transformation der Zellen verwendet und bei 37 °C über Nacht auf Agarplatten mit den geeigneten Antibiotika inkubiert. Von den entstandenen Kolonien wurden ca. 10 Kolonien in einer 5 mL Übernachtskultur in LB-Medium angezogen, die als Inokulum für die Expressionskultur diente. Je nach angestrebtem Volumen der Expressionskultur wurde das Volumen der Inokulationskultur variiert, sodass die Expressionskultur in

einem Verhältnis von 40:1 gegenüber der Inokulationskultur angeimpft werden konnte. Als Medium diente hier standardmäßig LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika. Eine Ausnahme stellt hier der Stamm *E. coli* ArcticExpress DE3 dar, da hier die Expressionskultur ohne eine Zugabe von Antibiotika stattfand. Änderungen hierzu sind gegebenenfalls direkt im Ergebnis- und Diskussionsteil zu den einzelnen Expressionen angegeben.

Die inokulierten Kolben wurden bei 37 °C und 200 min⁻¹ im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 2 angezogen. Bei der Erreichung der angegebenen Zelldichte wurde 1 mL der Kultur als uninduzierte Kontrolle abzentrifugiert (5000 g, 5 min) und für weitere Analysen eingefroren. Die folgende Proteinexpression fand bei Temperaturen zwischen 12 °C bis 37 °C statt. Falls geringere Temperaturen als 37 °C verwendet wurden, fand vor der Induktion der Proteinexpression eine Abkühlung im Schüttelinkubator auf die Proteinexpressionstemperatur statt. Falls die Expression bei 37 °C erfolgte, wurde direkt induziert. Im Falle des T7-Promotors wurde mit 1 M IPTG-Lösung induziert und im Falle des *tetA*-Promotor mit Anhydrotetracyclin-Lösung (2 mg x mL⁻¹ in Dimethylformamid). Die Endkonzentrationen der Induktions-Substanz, die Temperatur und der Expressionszeitraum zu den jeweiligen Kultivierungen sind im Ergebnis- und Diskussionsteil aufgeführt.

Nach der Proteinexpression werden die Zellen bei 5000 g und 4 °C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde aufgrund der intrazellularen Lokalisation der Proteine verworfen. Das Pellet wurde bis zum Zellaufschluß bei -20 °C gelagert.

6.6.3 Zellaufschluss

Das Zellpellet aus 6.6.2 wurde im entsprechenden Lysepuffer für die His-Tag (Tab. 6-30) bzw. Strep-Tag (Tab. 6-31) Aufreinigung resuspendiert und bei allen folgenden Schritten möglichst auf Eis oder bei 4 °C weiterbehandelt. Die Zellyse erfolgte bei kleinen Volumina bis 10 mL mittels Ultraschall und bei größeren Volumina mit der French Press. Abweichungen hierzu sind gegebenenfalls direkt zu den einzelnen Experimenten im Ergebnis- und Diskussionsteil angegeben.

6.6.3.1 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Für einen Ultraschall-medierten Zellaufschluss wurden die Organismen im jeweiligen Lysepuffer resuspendiert und im Ultraschallhomogenisator einem Leistungseintrag von 50 W und einer Frequenz von 40 Hz für 10 s ausgesetzt. Die Beschallung wurde je nach Zellzahl 5 bis 10 Mal wiederholt, wobei zwischen jeder Wiederholung für 10 s auf Eis gekühlt wurde. Daraufhin wurden die unlöslichen von den gelösten Bestandteilen durch Zentrifugation bei 15000 g für 30 min voneinander getrennt.

6.6.3.2 Zellaufschluss mittels French Press

Bei der Zellyse mit der French Press wurden die im jeweiligen Lysepuffer resuspendierten Zellen, in einem Hohlzylinder einem Druck von 800 bis 1000 bar ausgesetzt. Durch das Öffnen des Aufschlussventils wurden die Zellen aus dem Hohlkolben gepresst und dabei aufgeschlossen. Die im Lysepuffer gelösten Bestandteile wurden von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation bei 15000 x g für 30 min getrennt.

6.6.4 Proteinexpression unter Co-Expression verschiedener Chaperone

Bei einigen Proteinexpressionen wurden Chaperon-exprimierende Plasmide verwendet, um die Löslichkeit und Faltung der Zielproteine zu optimieren.^{115,116} Hierzu wurde 1 µL der Chaperon-Plasmide (Tab. 6-4) in elektrokompente *E. coli* BL21 DE3 transformiert (6.4.3.4), auf Selektivagar (Cm²⁵) ausplattiert und eine Übernackultur angesetzt. Die Zellen wurden erneut elektrokompent gemacht (6.4.3.2) und anschließend 1 µL des Zielprotein-exprimierenden Plasmids in die Zellen elektroporiert.

Die Proteinexpression und der Zellaufschluss folgte dabei den unter 6.6.2 und 6.6.3 beschriebenen allgemeinen Prinzipien der Proteinexpression. Der Unterschied lag hier in der Zugabe von 0,5 bis 4 mg x mL⁻¹ Arabinose (Endkonzentration) bei der Verwendung der Chaperone-Plasmide mit *araB*-Promotor bzw. 10 ng x mL⁻¹ Tetracyclin (Endkonzentration) bei Verwendung der Chaperon-Plasmide mit dem *Pzt1*-Promotor. Änderungen bezüglich der Endkonzentrationen, des verwendeten Mediums sowie der Kultivierungsbedingungen sind gegebenenfalls direkt im Ergebnis- und Diskussionsteil ausgewiesen.

6.6.5 Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen

Zur Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen wurde Ni-NTA Agarose verwendet. Als Zielprotein enthaltende Matrix diente der Überstand der aufgeschlossenen und abzentrifugierten Expressionskulturen (6.6.3). Zum Überstand wurde 250 µL bis 1000 µL der Ni-NTA-Agarose gegeben und auf Eis für 1 h bei 150 min⁻¹ inkubiert. Die Suspension wurde auf die Poly-Prep Säule gegeben, mit 2 mL Lysepuffer (Tab. 6-30) gespült und mit 2 mL Waschpuffer (Tab. 6-30) gewaschen. Die Elution erfolgte fraktioniert über eine ansteigende Imidazolkonzentration (30mM bis 250 mM) im Elutionspuffer (Tab. 6-30). Das Volumen der Elutionsfraktionen betrug zwischen 250 µL und 2 mL und wurde der zu erwartenden Proteinkonzentration und dem darauffolgenden Experiment angepasst. Den Fraktionen (Durchlauf, Spülen, Waschen und Elutionen) wurden 20 bis 50 µL Lösung entnommen und für die spätere Analytik durch eine SDS-PAGE (6.6.7) bei 4 °C gelagert.

Um der geringen Löslichkeit von Proteinen am isoelektrischen Punkt Rechnung zu tragen, wurden die Pufferbedingungen in wenigen Aufreinigungen modifiziert. Die Puffer wurden so gewählt, dass der

pH-Wert des Puffers immer mindestens 1 Einheit vom isoelektrischen Punkt entfernt lag. Da diese Vorgehensweise nur in wenigen Ausnahmen erfolgte werden die Änderungen direkt zu den einzelnen Experimenten im Ergebnis- und Diskussionsteil angegeben.

Tab. 6-30: Puffer zur Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen.

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	25 mM Tris 500 mM Natriumchlorid pH = 8,0 (HCl)
Waschpuffer	25 mM Tris 500 mM Natriumchlorid 30 mM Imidazol pH = 8,0 (HCl)
Elutionspuffer	25 mM Tris 500 mM Natriumchlorid 50 mM - 250mM Imidazol pH = 8,0 (HCl)

6.6.6 Aufreinigung von Strep-Tag-Fusionsproteinen

Zur Aufreinigung von Strep-Tag-Fusionsproteinen wurde Strep-Tactin Sepharose verwendet. 700 µL der Strep-Tactin Sepharose wurden auf eine Poly-Prep Säule gegeben und mit 1000 µL Waschpuffer equilibriert. Das Lysat aus 6.6.3 wurde auf die Säule gegeben, um die Zielproteine zu binden. Daraufhin wurde die Säule 5 x mit je 500 µL Waschpuffer (Tab. 6-31) fraktioniert gewaschen bevor die Elution 6 x mit je 250 µL Elutionspuffer (Tab. 6-31) ebenfalls fraktioniert erfolgte. Den einzelnen Fraktionen (Waschen und Elutionen) wurden 20 bis 50 µL Lösung entnommen und für die spätere Analytik durch eine SDS-PAGE (6.6.7) vorerst bei 4 °C gelagert.

Tab. 6-31: Puffer zur Aufreinigung von Strep-Tag-Fusionsproteinen.

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	100 mM Tris 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA* pH = 8,0 (HCl)
Waschpuffer	100 mM Tris 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA* pH = 8,0 (HCl)
Elutionspuffer	100 mM Tris 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA* 2,5 mM Desthiobiotin pH = 8,0 (HCl)

*Bei der Aufreinigung von PsyC wurde kein EDTA verwendet.

6.6.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analytik der Proteinexpressionen und Proteinreinigungen wurde die SDS-PAGE verwendet. Dazu wurden die Proteinproben aus 6.6.5 und 6.6.6 1:1 mit 2 x SDS Ladepuffer (100 mM Tris; 200 mM DTT;

4 % (w/v) SDS; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau; 20 % (v/v) Glycerin) versetzt und für 1 min bei 100 °C denaturiert. Um zu kontrollieren, ob unlösliches Protein im Zellpellet vorhanden war, wurde diese Probe aus den unlöslichen, abzentrifugierten Bestandteilen der Zellyse (6.6.3) analog zu der beschriebenen Vorgehensweise erhalten.

Die Trennung der Proteine wurde in einem vertikalen Multigel Elektrophoresesystem durchgeführt. Es kamen Gele in Konzentrationen von 12 bis 20 % (v/v) Polyacrylamid:Bisacrylamid zum Einsatz und wurden entsprechend Literatur hergestellt.²⁶⁵ Zuerst wurde das Trenngel angesetzt und zwischen zwei Glasplatten gegossen, die mit Klammern fixiert und durch ein Gummi dreiseitig abgedichtet waren. Damit an der Grenzschicht zum späteren Sammelgel eine horizontale, gerade Fläche entstand wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das 5 % (v/v) Polyacrylamid:Bisacrylamid Sammelgel²⁶⁵ auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt. Das fertige Gel wurde in einer Elektrophoresekammer befestigt und mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS) überschichtet. Die Proben wurden in die Taschen überführt. Bei der Verwendung von kleinen Taschen wurde ein Volumen von 10 bis 12 µL und bei der Verwendung von großen Taschen ein Volumen von 20 bis 30 µL der Probe eingefüllt. Der Einsatz eines großen bzw. kleinen Kammes richtete sich nach der zu erwartenden Proteinkonzentration in den Proben. Zur späteren Analyse kamen Proteinmarker zum Einsatz, die Proteine definierter Größe beinhalten. Verwendet wurden dabei der Roti-Mark-Standard (Firma Roth), wovon 3 µL aufgetragen wurde sowie der Broad-Range-Marker (Firma NEB), wovon 8,5 µL aufgetragen wurde.

Die Proteine wurden durch das Anlegen einer Spannung von 90 V für die Dauer bis das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau das Sammelgel durchlaufen hatte, vor dem Trenngel gesammelt. Danach wurde die Spannung auf 140 V erhöht, wodurch die Proteine im Trenngel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurden. Der Zeitraum, in dem das elektrische Feld aufrecht erhalten wurde, richtete sich nach der Größe des zu untersuchenden Proteins und konnte durch die Lauffront des Bromphenolblau kontrolliert werden. Nach Beendigung der Elektrophorese konnten die Proteinbanden durch spezifische Färbungen (6.6.8) sichtbar gemacht werden.

6.6.8 SDS-PAGE Färbungen

Bei der Anfärbung der Proteinbanden im Proteingel kamen zwei Färbemethoden zum Einsatz. Da die Coomassie-Färbung (6.6.8.1) im Gegensatz zur Silberfärbung (6.6.8.2) eine wesentlich einfachere Durchführung aufweist, wurde diese als Standardfärbung verwendet. Die Silberfärbung wurde aufgrund der höheren Sensitivität gegenüber der Coomassie-Färbung nur bei sehr geringen Konzentrationen des Zielproteins verwendet.

6.6.8.1 Coomassie-Färbung

Das Gel der SDS-PAGE wurde nach der elektrophoretischen Trennung in die Coomassie Färbelösung (10 % (v/v) Eisessig; 30 % (v/v) Methanol; 0,25 % (w/v) Brilliant-Blau R250) gegeben und für 30 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gefärbt. Als Alternative wurde in einigen Fällen die Färbung in der Mikrowelle vorgenommen. Dabei wurde die Färbelösung kurz aufgekocht und für weitere 5 min auf dem Schüttler platziert. Nach der Färbung wurde kurz mit destilliertem Wasser gespült und die Entfärber-Lösung (10 % (v/v) Eisessig; 30 % (v/v) Methanol) auf das Gel gegeben. Zur effektiven Entfärbung wurde unter zeitnahe Austausch der Entfärber-Lösung auf dem Schüttler entfärbt bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Zur Dokumentation schloss sich eine Trocknung in Cellophan-Folie mit 4 bis 6 Tropfen Glycerin an.

6.6.8.2 Silberfärbung

Das Gel wurde nach der Gelelektrophorese für 30 min in Fixierlösung (Tab. 6-32) auf einem Schüttler inkubiert. Die Fixierlösung wurde gegen Sensitivlösung (Tab. 6-32) getauscht und erneut für 30 min geschüttelt. Nach drei maligem Waschen mit destilliertem Wasser für je 5 min wurde das Gel in Färbelösung (Tab. 6-32) gegeben und darin für 20 min geschwenkt. Die Färbelösung wurde durch 4 maliges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt und die Banden durch Zugabe der Entwicklerlösung (Tab. 6-32) sichtbar gemacht. Sobald die Proteinbanden gut erkennbar waren, wurde die Stopplösung (Tab. 6-32) zugegeben und mindestens 10 min darin inkubiert. Es wurde erneut mit destilliertem Wasser gewaschen. Das fertige Gel konnte dann zur Dokumentation in einem Rahmen zwischen zwei Cellophanfolien unter Zugabe von 4 bis 6 Tropfen Glycerin getrocknet werden.

Tab. 6-32: Lösungen zum Färben von Proteingelen mit der Silberfärbung.

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

6.6.9 Generierung von Protein-spezifischen Daten

Um auf den Proteingelen die Proteinbanden den Zielproteinen zuordnen zu können wurde über das Programm Bioedit 7.0.9.0 die exprimierte Aminosäuresequenz der Expressionsplasmide bestimmt. Diese wurde dann in EditSeq 5.0 eingelesen und die folgende Analyse des Programmes ergab die Masse des jeweiligen Proteins und dessen isoelektrischen Punkt (pI) (Tab. 6-33).

Für die massenspektroskopische Untersuchung einiger Proteine wurde mit Hilfe einer Excel-Kalkulation von Dr. Marianne Engeser die exakte monoisotopische Masse der Proteine bestimmt (Tab. 6-33).

Tab. 6-33: Proteininformationen der exprimierten Proteine.

Protein	Expressions-plasmid	pI	Größe Protein [Da] Exakte Masse [Da]	Mit Co-Faktor [Da]
<i>holo</i> -PedI3	pHN10	5,85	161176,01	161854,67
			161075,10814	161753,26408
Fusion PedF-Linker/ <i>holo</i> -PedI3	pHN16	5,82	159905,57	160584,23
			159806,56911	160484,72505
Fusion EryA-Linker ₁ / <i>holo</i> -PedI3	pHN17	6,00	158400,07	159078,73
			158301,93865	158980,09460
Fusion EryA-Linker ₂ / <i>holo</i> -PedI3	pHN20	5,97	159059,76	159738,42
			158961,25128	159639,40722
PedL	pHN31	6,74	34431,27	
			34410,50558	
PedL	pHN32	7,86	30626,08	
			30607,67883	
<i>apo</i> -PedI3	pHN33	5,85	161176,01	
			161075,10814	
Fusion PedF-Linker/ <i>apo</i> -PedI3	pHN34	5,82	159905,57	
			159806,56911	
Fusion EryA-Linker ₁ / <i>apo</i> -PedI3	pHN35	6,00	158400,07	
			158301,93865	
Fusion EryA-Linker ₂ / <i>apo</i> -PedI3	pHN36	5,97	159059,76	
			158961,25128	
PedC	pHN38	6,32	39216,07	
			39191,79089	
PedC	pHN40	6,32	39344,20	
			39319,84946	
PedC	pHN42	6,77	40161,09	
			40136,28359	
PsyD O-MT	pHN44	4,82	38625,83	
			38602,37337	
PsyD O-MT	pHN46	4,82	38753,96	
			38730,43195	
PsyD O-MT	pHN48	5,60	39714,98	
			39690,91956	
PsyC	pHN50	6,07	41947,41	
			41921,91892	
PsyC	pHN52	5,87	45096,89	
			45069,42797	

Fortsetzung Tab. 6-33

Protein	Expressionsplasmid	pI	Größe Protein [Da] Exakte Masse [Da]	Mit Co-Faktor [Da]
PsyK	pHN54	6,35	42322,49 42296,40244	
PsyK	pHN56	6,35	42450,63 42424,46102	
PsyK	pHN58	6,98	43411,65 43384,94863	
<i>apo</i> -PsyA-ACP ₃	pHN60	6,14	10851,22 10845,42490	
<i>apo</i> -PsyA-ACP ₃	pHN62	4,11	11241,64 11235,56896	
<i>apo</i> -PsyA-ACP ₃	pHN64	4,01	10588,93 10583,26081	
<i>apo</i> -PsyD-ACP ₁	pHN66	6,51	11674,26 11667,83542	
<i>apo</i> -PsyD-ACP ₁	pHN68	4,97	10585,11 10579,28923	
<i>apo</i> -PsyD-ACP ₁	pHN70	4,97	10713,24 10707,34781	
PsyC	pHN72	5,22	42337,84 42312,06298	
PsyC	pHN74	5,22	41685,12 41659,75483	
<i>holo</i> -PsyA-ACP ₃	pHN77	6,14	10851,22 10845,42490	11190,55 11184,50288
<i>holo</i> -PsyD-ACP ₁	pHN78	6,51	11674,26 11667,83542	12013,59 12006,91340
PsyC	pHN79	5,50	53057,96 53025,44298	

6.6.10 Proteinkonzentrationsbestimmung

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentrationen kamen zwei Methoden zum Einsatz. Zum Einen die fotometrische Messung durch den modifizierten Bradford-Assay und zum Anderen über eine Absorptionsmessung der Proteinbanden auf einem SDS-PAGE Gel in einem Gel-Dokumentations-System. Letztere wurde verwendet, wenn die Elutionsfraktionen mit anderen Proteinen (z. B. Chaperonen) verunreinigt war und die fotometrische Messung daher keine korrekten Werte geliefert hätte.

6.6.10.1 Modifizierter Bradford-Assay²⁷⁷

Der Test beruht auf dem klassischen Bradford-Verfahren zur Proteinbestimmung. Die Methode basiert auf einer Komplexbildung zwischen dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G 250 und dem Protein, wobei sich die Farbe des Farbstoffs von rot nach blau ändert. Die proteingebundene, blaue Form besitzt ein Absorptionsmaximum bei 595 nm, während die ungebundene, rote Form bei 465 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Die Messung der Absorption bei 595 nm lieferte eine Standardkurve, die keine Linearität aufweist. Die Linearität ergibt sich, wenn jede Probe bei 590 und

bei 450 vermessen wird und der Quotient OD_{590nm} und OD_{450nm} gegen die Konzentration aufgetragen wird.

Hierzu wurden 2 ml 5 x Roti-Nanoquant (Fa. Roth) mit 8 ml destilliertem Wasser verdünnt. 80 μL dieser Arbeitslösung wurden mit 20 μL der Proteinlösung in Mikroküvetten gut vermischt und eine Bestimmung der Absorption bei 590 und 450 nm vorgenommen. Die Proteinmenge wurde anhand einer Kalibriergeraden bestimmt, die mit BSA als Standardprotein erstellt wurde (Abb. 6-3). Die Messung erfolgte gegen Wasser als Referenzwert. Für die Erstellung der BSA-Kalibriergeraden und der Probemessung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Proben wurden vor der Messung verdünnt, sodass die resultierenden Messwerte im linearen Bereich der Kalibriergeraden liegen.

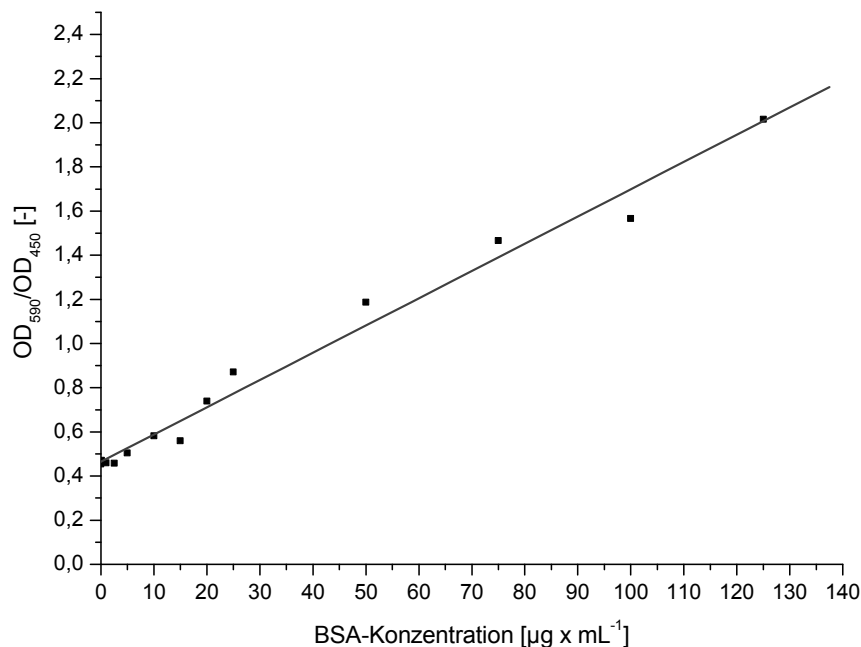


Abb. 6-3: BSA-Kalibriergerade zur Bestimmung unbekannter Proteinkonzentrationen.

Steigung: 0,01235; Achsenabschnitt: 0,46442; Korrelationskoeffizient: 0,99149.

Über lineare Regression ergab sich folgende Formel. Durch Einsetzen der Messwerte bei den beiden Wellenlängen errechnete sich die Proteinkonzentration in $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$.

$$c_{\text{Protein}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{\left(\frac{OD_{590nm}}{OD_{450nm}} \right) - 0,46442}{0,01235}$$

6.6.10.2 Proteinbestimmung durch SDS-PAGE-Absorptionsmessungen

Bei der Proteinbestimmung im Geldokumentationssystem wurde die Proteinkonzentration über eine Absorptionsmessung der Proteinbanden auf den SDS-PAGE Gelen verifiziert. Hierzu wurden SDS-PAGE Gele angefertigt, die neben den unbekannt Proben BSA-Proteinbanden bekannter

Konzentration enthielten. Die Software des Geldokumentationssystems wandelte die Absorptionsmessungen in Peaks um. Aus den Flächen unter den Peaks konnte dann über eine Kalibrierkurve der bekannten BSA-Proben die Konzentration der unbekanntenen Proben errechnet werden (Abb. 6-4).

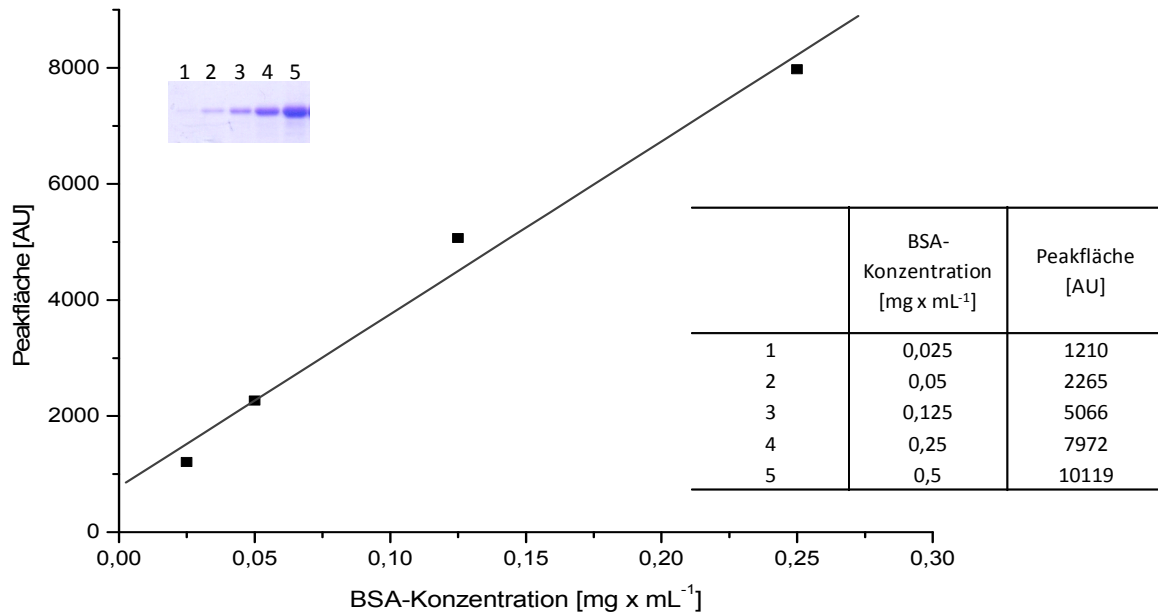


Abb. 6-4: Kalibriergerade zur Bestimmung unbekannter Proteinproben mittels einer Absorptionsmessung über das Geldokumentationssystem.

Steigung: 34089,23077; **Korrelationskoeffizient:** 0,99127. Die Werte dienen als Beispiel für diesen einzelnen Fall, da aufgrund der unterschiedlichen Färbungsintensität für jedes Proteingel eine Gel spezifische Kalibriergerade erstellt wurde.

Es wurde für jedes Gel eine neue Kalibriergerade erstellt, da die Messwerte abhängig von der Intensität der Färbung waren. Zusätzlich wurde für die Kalibriergeraden nur BSA-Konzentrationen von bis zu 0,25 mg x mL⁻¹ verwendet, da höhere Werte außerhalb des linearen Bereichs lagen.

6.6.11 Trennung von Zielprotein und Chaperon

Einige Proteinexpressionen wurden zum Erhalt von löslichem Protein unter Co-Expression von Chaperon-Proteinen durchgeführt. Nach der Aufreinigung (6.6.5) der Zielproteine waren im Eluat Verunreinigungen durch die Chaperone vorhanden. Folgende Methoden beschreiben die Versuche zur Aufreinigung von Zielprotein und Chaperon aus dem Eluat durch kultivierungstechnische Methoden, Benutzung der FPLC und Modifikationen bei der affinitätschromatographischen Aufreinigung. Die Experimente erfolgten ausschließlich mit His-Tag Proteinen und wurden einerseits durch *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 exprimiertes Fusionsprotein PedF-Linker/PedI3 und andererseits durch *E. coli* BL21 DE3 pKJE7 und *E. coli* BL21 DE3 pGro7 exprimiertes Protein PsyC getestet. Die Methoden 6.6.11.1 bis 6.6.11.4 wurden am PedF-Linker/PedI3 angewandt und die FPLC-Experimente (6.6.11.5) an PsyC erprobt.

6.6.11.1 Trennung durch Zugabe von Mg-Adenosintriphosphat während der Aufreinigung

Die nach dem Zellaufschluss (6.6.3) erhaltenen Überstände wurden mit 10 mM Endkonzentration Mg-ATP versetzt und es wurden 500 μL Ni-NTA-Agarose zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 1 h auf Eis bei 150 min^{-1} . Die Aufreinigung über die Poly-Prep Säule wurde analog zu 6.6.5 durchgeführt.

6.6.11.2 Trennung durch Zugabe von Casein während der Aufreinigung

Da Casein ein optimaler Bindungspartner für die Chaperon-Proteine ist, wurde es zu den Zellaufschlüssen (6.6.3) in einer Endkonzentration von $5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ zugegeben. Die Bindung der His-Tag-Zielproteine zur Aufreinigung erfolgte durch Zugabe von 500 μL Ni-NTA-Agarose und einer Inkubation von 1 h auf Eis bei 150 min^{-1} . Die Aufreinigung über die Poly-Prep Säule wurde analog zu 6.6.5 durchgeführt.

6.6.11.3 Trennung durch Blockierung der Proteinbiosynthese während der Kultivierung²³²

Die 2 Schritt Expression beruhte darauf, dass die Proteinexpression zuerst wie unter 6.6.4 beschrieben durchgeführt wurde und dann in einer zweiten Kultivierung, ohne Zielproteininduktion und unter Blockierung der Proteinbiosynthese, vorhandene Proteinaggregate aufgelöst wurden. Hierzu wurde die Kultur entsprechend 6.6.4 angeimpft, angezogen, induziert und exprimiert. Danach erfolgte die Trennung der Zellen vom Medium durch Zentrifugation bei 5000 g für 5 min bei der jeweiligen Expressionstemperatur. Es erfolgte eine Resuspension der Zellen in frischem Medium ohne Induktionssubstanz. Dabei wurde das gleiche Volumen der Expressionskultur verwendet und eine Endkonzentration von $200 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ Chloramphenicol zum Blockieren der Proteinbiosynthese zugegeben. Die Kultur wurde erneut für 2 h bei der jeweiligen Expressionstemperatur im Schüttelinkubator bei 200 min^{-1} inkubiert. Die folgende Zellernte und die Aufreinigung des Zielproteins wurde analog zu 6.6.3 und 6.6.5 durchgeführt.

6.6.11.4 Kombination der Methoden aus 6.6.11.1, 6.6.11.2 und 6.6.11.3

Die beschriebenen Methoden zur Reinigung von Zielprotein und Chaperone fanden auch kombiniert ihre Anwendung. Bei der Aufreinigung wurde getestet, ob die Zugabe von Casein und Mg-ATP in Kombination sinnvoll ist. Dabei wurden 10 mM Mg-ATP und $5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ Casein (Endkonzentration), wie unter 6.6.11.1 und 6.6.11.2 beschrieben, zugegeben. Auch die 2 Schritt Kultivierung wurde mit der Zugabe von Mg-ATP und Casein kombiniert. Dazu wurde die Proteinexpression entsprechend 6.6.11.3 durchgeführt und die Zugabe von Mg-ATP und Casein erfolgte wie unter 6.6.11.1 und 6.6.11.2 beschrieben.

6.6.11.5 Trennung durch Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)

Die Trennung von Zielprotein und Chaperone wurde ebenfalls unter Nutzung der FPLC versucht. Hierzu wurden einerseits die Ionenaustauschchromatographie und andererseits die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) eingesetzt.

6.6.11.5.1 Ionenaustauschchromatographie

Das Eluat der Proteinreinigung (6.6.5) wurde zuerst über eine Entsalzungssäule „HiPrep 26/10 Desalting“ (Fa. Amersham) von dem Elutionspuffer der Affinitätschromatographie (Tab. 6-30) in einen Niedrigsalzpuffer (Tab. 6-34) umgepuffert. Dabei wurde die Protein-enthaltende Fraktion gesammelt und in der Ionenaustauschchromatographie eingesetzt. Die Säule wurde 10 min mit dem Niedrigsalzpuffer equilibriert bevor die Proteinlösung auf die Anionentauschersäule (Fa. Bio Rad, Säule: Uno Q6) geladen wurde und über einen Gradienten von 50 mM NaCl (Niedrigsalzpuffer, Tab. 6-34) zu 10000 mM NaCl (Hochsalzpuffer, Tab. 6-34) über eine Zeit von 20 bzw. 30 min eluiert wurde. Die genauen Zeiten des Gradienten sind in den einzelnen Chromatogrammen im Ergebnis- und Diskussionsteil ersichtlich. Dabei wurde eine Fließgeschwindigkeit von $1,5 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$ verwendet. Verwendete Puffer wurden vor der Verwendung filtriert um ein Verblocken der Säule zu vermeiden.

Tab. 6-34: Puffer der Ionenaustauschchromatographie.

Puffer	Zusammensetzung
Niedrigsalzpuffer	25 mM Tris
	50 mM NaCl
	3 mM MgCl ₂
	pH = 7,8 (HCl)
Hochsalzpuffer	25 mM Tris
	10000 mM NaCl
	3 mM MgCl ₂
	pH = 7,8 (HCl)

6.6.11.5.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Für die HIC-Chromatographie musste die Probe in einem Hochsalzpuffer vorliegen, um hydrophobe Interaktionen zwischen Protein und Säulenmatrix hervorzurufen. Daher wurde hier keine Umpufferung vorgenommen, sondern die Elutionsfraktion aus 6.6.5 1:20 in dem Hochsalzpuffer II der HIC (Tab. 6-35) verdünnt. In der Chromatographie wurde das HiTrap HIC Selection Kit (Fa. GE Healthcare) verwendet. Dieses enthält unterschiedliche Säulen, dessen Sepharose 4 unterschiedliche hydrophobe Liganden besitzt (Phenyl-Sepharose, Butyl-Sepharose, Butyl-S-Sepharose und Octyl-Sepharose). Die jeweilige Säule wurde in Hochsalzpuffer II (Tab. 6-35) für 20 min equilibriert, bevor die verdünnte Proteinlösung auf die Säule gegeben wurde. Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 2000 mM (NH₄)₂SO₄ (Hochsalzpuffer II, Tab. 6-35) auf 0 mM (NH₄)₂SO₄ (Niedrigsalzpuffer II, Tab. 6-35) innerhalb von 20 bis 30 min. In einigen Fällen wurde ein Gradient von

2000 mM NaCl auf 50 mM NaCl (Hochsalzpuffer I und Niedrigsalzpuffer I, Tab. 6-35) verwendet. Dabei wurden die anderen Parameter nicht verändert. Die genauen Zeiten des Gradienten sind direkt in den einzelnen Chromatogrammen im Ergebnis- und Diskussionsteil ersichtlich. Es wurde eine Fließgeschwindigkeit von $1 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$ verwendet. Verwendete Puffer wurden vor der Verwendung filtriert um ein Verblocken der Säule zu vermeiden.

Tab. 6-35: Puffer der HIC-Chromatographie.

Puffer	Zusammensetzung
Niedrigsalzpuffer I	25 mM Tris
	50 mM NaCl
	3 mM MgCl_2
	pH = 7,8 (HCl)
Hochsalzpuffer I	25 mM Tris
	2000 mM NaCl
	3 mM MgCl_2
	pH = 7,8 (HCl)
Niedrigsalzpuffer II	25 mM Tris
	3 mM MgCl_2
	pH = 7,8 (HCl)
Hochsalzpuffer II	25 mM Tris
	2000 mM
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	3 mM MgCl_2 pH = 7,8 (HCl)

6.6.12 Massenspektroskopische Untersuchung von Proteinen

Zu einigen exprimierten Proteinen wurden massenspektroskopische Daten generiert. Einerseits wurden diese Daten erstellt um einen „Fingerprint“ des Proteins zur genauen Identifikation zu erhalten und andererseits um die posttranslationale Modifikation der ACPs durch Anbindung des Phosphopantetheinarms nachzuweisen. Hierzu wurden die Messungen mittels MALDI-TOF-TOF-MS (6.6.12.2), LC-MS (6.6.12.3) und ESI-FT-ICR-MS (6.6.12.4) durchgeführt.

6.6.12.1 Probenvorbereitung

Die Proteinproben wurden für einen „Fingerprint“ des Proteins durch den tryptischen Verdau (6.6.12.1.1) vorbereitet. Vor einigen massenspektroskopischen Methoden wurde die Probe aufkonzentriert oder entsalzt (6.6.12.1.2).

6.6.12.1.1 Tryptischer Verdau aus SDS-PAGE-Gelen

Zur Vorbereitung des tryptischen Verdau wurde die Gelbande mit einem Skalpell ausgeschnitten und aufeinanderfolgend 2 Mal für 15 min mit destilliertem Wasser, 2 Mal für 15 min mit 50 % (v/v) Acetonitril und 1 Mal für 15 min mit Acetonitril gewaschen. Das verbleibende Acetonitril wurde abgenommen und 20 μL einer frisch angesetzten Trypsin-Lösung (6,4 μL Trypsin in 1 mL frisch angesetzten 40mM NH_4HCO_3 -Puffer) zugegeben. Das Gelstück quoll für 10 min und es wurden

nochmals 40 mM NH_4HCO_3 -Puffer zugegeben, sodass das Gelstück komplett mit Puffer bedeckt war. Der enzymatische Verdau wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das verbleibende Gelstück wurde mit 30 μL destilliertem Wasser überschichtet und für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereinigt und das verbleibende Gelstück mit 60 % (v/v) Acetonitril mit 0,1 % TFA erneut bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Überstand wurde mit den vorhandenen Überständen vereinigt. Das Gelstück wurde in einem letzten Schritt mit 30 μL Acetonitril und 0,1 % TFA überschichtet, für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt und der Überstand zu den bereits gesammelten Überständen gegeben. Die Überstände wurden in der Speedvac getrocknet und in 5 μL destilliertem Wasser mit 0,1 % TFA resuspendiert.

6.6.12.1.2 Aufkonzentrierung/Entsalzung mit Vivaspin Zentrifugalröhrchen

Die Aufkonzentrierung bzw. Entsalzung der Proteinproben erfolgte über Vivaspin Zentrifugalröhrchen. Diese enthalten eine vertikale Membran verschiedener spezifischer Molekulargewichtsausschlussgrößen (MWCO). Die jeweils gewählte MWCO war dabei maximal halb so groß wie die entsprechende Proteingröße. Die Proteinprobe wurde in das Vivaspin-Röhrchen überführt und bei 15000 g für 15 min zentrifugiert. Das Retentat wurde bei einer Aufkonzentrierung direkt für die folgenden Experimente verwendet. Bei einer Entsalzung der Probe wurde zum Retentat 100 μL destilliertes Wasser zugegeben und bei 15000 g für 15 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde 5-10 Mal wiederholt. Das entsalzte Retentat wurde in den Messungen eingesetzt.

6.6.12.2 MALDI-TOF-TOF-MS

Um einen „Fingerprint“ des Moduls Ped13 und dessen Linkerfusionsprodukte zu erhalten wurden die Proteinbanden der Proteine aus SDS-PAGE Gelen isoliert und einem tryptischen Verdau unterzogen (6.6.12.1.1). Die daraus erhaltenen Proteinfragmente wurden mittels MALDI-TOF-TOF-MS vermessen.

Auch für die Identifikation einer vorhandenen posttranslationalen Modifikation in Form des Phosphopantetheinarms wurde eine Messung mittels MALDI-TOF-TOF-MS verwendet. Hierzu wurde die Probe je nach Proteinkonzentration mit Vivaspin-Zentrifugalröhrchen (6.6.12.1.2) gegebenenfalls aufkonzentriert. Die konzentrierte Probe wurde mittels MALDI-TOF-TOF-MS analysiert, wobei es sich bei der verwendeten Matrix um HCCA (α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure) oder DHAP (2,5-Dihydroxyacetophenone) handelte. Die Probe wurde auf die Matrix gegeben, mit konzentriertem TFA gewaschen und anschließend vermessen.

6.6.12.3 LC-ESI-microOQ-TOF-MS

Die LC-MS-Analytik wurde verwendet, um die posttranslationale Modifikation durch die Anlagerung des Phosphopentetheinarms zu detektieren. Weitere Anwendungen waren die Untersuchung von Sekundärmetaboliten sowie die Produktanalyse von Enzymassays. Diese Methoden werden in 6.9.3 sowie 6.7.5 näher erläutert.

Zur Detektion des Phosphopantetheinarms der ACPs wurden 100 µl der Elutionsfraktionen der Proteine aufkonzentriert (6.6.12.1.2), auf einer C18-Säule getrennt und über ESI-microOQ-TOF-MS im Positivmodus detektiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Esi Compass 1.3 DataAnalysis Version 4.0.

Zur Trennung der Probenbestandteile wurde ein HPLC-Lauf verwendet, der bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 mL x min⁻¹ durchgeführt wurde. Alle Laufmittel wurden vor der Verwendung mit 0,1 % TFA versetzt. Die mobile Phase bestand in den ersten zehn Minuten aus 30 % Acetonitril und 70 % destilliertem Wasser, wurde dann von Minute 10 bis 40 in einem linearen Gradienten auf ein Verhältnis von 65 % Acetonitril und 35 % Wasser eingestellt und daraufhin von Minute 40 bis 50 konstant gehalten. Von Minute 50 bis 65 wurde erneut ein linearer Gradient verwendet bis ein Konzentrationsverhältnis von 35 % Acetonitril und 65 % Wasser erreicht wurde. Abschließend wurden für die letzten 5 min die Anfangsbedingungen von 30 % Acetonitril und 70 % Wasser verwendet.

6.6.12.4 ESI-FT-ICR-MS

Diese Methode wurde verwendet um die posttranslationale Modifikation des Phosphopentetheinarms zu detektieren. Vor der Messung fand eine Entsalzung der Probe statt (6.6.12.1.2). Das Volumen der entsalzten Probe war von der Proteinkonzentration abhängig und lag zwischen 100 und 200 µL. Das Retentat wurde 1:1 mit Acetonitril mit 0,2 % TFA versetzt und mit ESI-FT-ICR-MS im Positivmodus vermessen.

6.7 Enzymassays

Für die Untersuchungen der biosynthetischen Aktivität der Proteine wurden Enzymassays durchgeführt (6.7.1 bis 6.7.5).

6.7.1 AT-ACP-Assay

Für die Untersuchung der Substratübertragung durch ATs auf ACPs wurden Enzym-Assays mit radioaktiv markiertem Malonyl-CoA **6** [Malonyl-2-¹⁴C] und Acetyl-CoA **5** [Acetyl-1-¹⁴C-CoA] durchgeführt.

Für den Radioaktiv-Assay wurden die exprimierten und aufgereinigten ATs und ACPs aus 6.6.2 verwendet. Tab. 6-36 gibt den Reaktionsansatz wieder. Die Negativkontrollen wurden anstatt mit 5 μL AT mit 5 μL Lysepuffer (Tab. 6-30, Tab. 6-31) angesetzt.

Tab. 6-36: Ansatz der Radioaktiv-Assays mit Malonyl-CoA 6 [Malonyl-2- ^{14}C] und Acetyl-CoA 5 [Acetyl-1- ^{14}C -CoA].

Volumen	Substanz
4 μL	DTT (10 mM)
5 μL	AT
9 μL	ACP*
2 μL	Malonyl-CoA [Malonyl-2- ^{14}C] (0,01mCi x mL $^{-1}$) bzw.
1 μL	Acetyl-CoA [Acetyl-1- ^{14}C -CoA] (0,02 mCi x mL $^{-1}$)

*Das ACP wurde gegebenenfalls mittels Viva-Spin Zentrifugationsröhrchen ankonzentriert (6.6.12.1.2).

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt und durch die Zugabe des radioaktiven Substrates gestartet. Die Probe wurde auf Eis für 1 bis 15 min (genaue Angabe im Ergebnis- und Diskussionsteil) inkubiert bevor sie mit 2 x SDS-Ladepuffer (6.6.7) versetzt und bei 99 °C für 3 min inkubiert wurde. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte in einem 12 % Trenngel sowie 5 % Sammelgel (6.6.7) für PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukte und in einem 20 % Trenngel sowie 5 % Sammelgel für die ACPs PsyA-ACP₃ und PsyD-ACP₁. Die Proteintrennung wurde in der Elektrophoresekammer Multigel Long analog zu 6.6.8 durchgeführt, mit dem Unterschied einer Trennungsspannung von 160 V aufgrund der größeren Elektrophoresekammer. Die folgende Coomassie-Blau-Färbung wurde entsprechend 6.6.8.1 durchgeführt.

Die Detektion der radioaktiven Signale bei erfolgreicher Substratübertragung wurde durch 20 x 40 cm große Detektionsfilme ermöglicht. Um das Gel auf den Film zu legen, wurde es zuvor auf einem Vakuum-Trockner für 14 h bei 55 °C und darauffolgenden 5 h bei Raumtemperatur getrocknet. Der Detektionsfilm auf dem Gel wurde in einer Filmkassette für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufbewahrung während der Inkubationszeit fand in einem von äußerer Strahlung abgeschirmten Schrank statt. Änderungen bezüglich der Inkubation des Gels auf dem Detektionsfilm sind gegebenenfalls direkt im Ergebnis- und Diskussionsteil angegeben. Die Detektion, der vom Gel auf den Film übertragenen Strahlung erfolgte auf einem Image Reader mit Hilfe des Programms Bas Reader. Nach dem Einlesen des Films in den PC wurde der Film 15 min belichtet und konnte wiederverwendet werden. Eine Bearbeitung des Autoradiogramms erfolgte mit Hilfe des Programmes TINA 2.09d.

6.7.2 Kinetische Untersuchung der AT-ACP-Substratbeladung

Für die kinetischen Untersuchungen der Substratbeladung von Malonyl-CoA 6 durch die AT auf das ACP wurde ein gekoppelter Assay eingesetzt.^{171-174,278} Durch die Substratbeladungsreaktion lag freies CoA 12 im Reaktionsansatz (vgl. Abb. 5-25) vor, welches mit Hilfe des Katalysators

α -Ketoglutaratdehydrogenase in der Reaktion von α -Ketoglutar säure zu Succinyl-CoA umgesetzt wurde. Bei dieser Reaktion wurde NAD^+ zu NADH reduziert, welches durch eine kontinuierliche fotometrische Messung bei 340 nm detektiert werden konnte.

Zur Generierung der kinetischen Daten wurden Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen, Substratkonzentrationen und AT- bzw. ACP-Konzentrationen durchgeführt. Diese sind im Ergebnis- und Diskussionsteil direkt zu den einzelnen Experimenten ausgewiesen. Der verwendete Reaktionsansatz wurde in folgenden Konzentrationen (Tab. 6-37). in Mikroküvetten gemischt und fotometrisch vermessen.

Tab. 6-37: Zusammensetzung des AT-ACP-Assays zur kinetischen Untersuchung der Substratübertragungsreaktion..

Konzentration	Substanz
1 mM	EDTA
1 mM	MgCl_2
50 mM	Natriumphosphatpuffer pH = 7,2 (HCl/NaOH)
0,4 mM	Thiaminpyrrophosphat (TPP)
1 mM	Tris(2-carboxyethyl)phosphon-Hydrochlorid (TCEP)
2 mM	α -Ketoglutar säure
1,25 mM	NAD^+
x*	α -Ketoglutar säure-Dehydrogenase
x*	ACP
x*	AT
x*	Malonyl-CoA
ad 200 μl	ddH ₂ O

*siehe Ergebnis- und Diskussionsteil

Da die α -Ketoglutaratdehydrogenase in Glycerin vorlag wurde sie vor der Zugabe in den Assay 1:4 (w/w) mit destilliertem Wasser verdünnt. Die verwendeten Mengen wurden so gewählt, dass alle Messreihen für die jeweilige Kinetik aus den gleichen Stammlösungen erfolgen konnten. Zur Messung wurden alle Bestandteile, mit Ausnahme der Substrate in Mikroküvetten gemischt. Danach wurde die Reaktion durch die Zugabe der Substrate gestartet. Zur Analyse der Selbstbeladung von ACPs im Vergleich zur AT Beladung wurden Messungen mit und ohne AT durchgeführt. Die Negativkontrollen wurden entweder mit der jeweiligen *apo*-ACP, ohne Substrat oder komplett ohne Proteine durchgeführt.

Die Messung erfolgte in dem Fotometer Biomate 3, dessen Küvette über einen externen Kühlmittelkreislauf temperiert werden konnte. Die Datenaufnahme wurde über das Programm Visionlite vorgenommen. Dabei wurde über einen Zeitraum von 2 bis 30 min jede Sekunde ein Messwert generiert und aufgezeichnet, wobei die genaue Messzeit direkt im Ergebnis- und Diskussionsteil ausgewiesen ist. Es wurde für alle Messungen eine Dreifachbestimmung vorgenommen.

Die Extinktions-Rohdaten konnten über das Lambert-Beersche Gesetz in Konzentrationen umgewandelt werden. Lambert-Beersche Gesetz:

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \times c \times d$$

$\varepsilon_{NADH_{340nm}} = 6230 M^{-1} cm^{-1}$ (Absorptionskoeffizient); $d = 1 cm$ (Schichtdicke);
 $c =$ Konzentration

Daraufhin konnte durch lineare Regression die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ermittelt werden. Die kinetischen Daten (K_M und V_{max}) wurden mittels des Programms Origin 8.0 mit Hilfe der Hill-Funktion über die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bestimmt. Hill-Funktion:

$$v = V_{max} \frac{x^n}{k^n + x^n}$$

Für Einsubstratmodelle kann $n = 1$ gesetzt werden und die Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter V_{max} und K_M wird möglich.

6.7.3 α -Hydroxylierungsassay mit PsyC

Um die α -Hydroxylierungsaktivität von PsyC zu untersuchen, wurden Assays mit synthetisierten Substraten durchgeführt. Die verwendete Substanz (*R*)-3-Hydroxybuttersäure-acetamidoethylthioester **33** wurde von Julia Katzschmarek hergestellt.¹⁹¹ Da PSI-BLAST-Analysen von PsyC eine entfernte Verwandtschaft mit Phytanoyl-CoA- α -Hydroxylasen voraussagen, wurde der Assay in Anlehnung an die standardmäßig verwendete Reaktion mit gereinigtem Enzym durchgeführt (6.7.3.1).¹⁹⁵ Um einem möglichen Aktivitätsverlust während der Aufreinigung zu berücksichtigen, wurden zusätzlich Assays mit dem Lysat direkt nach dem Zellaufschluss durchgeführt (6.7.3.2) sowie Aktivitätsassays als Ganzzelltransformation (6.7.3.3) nach der Proteinexpression. Die Analytik der Assays erfolgte mit massenspektroskopischen Nachweismethoden (6.7.5).

6.7.3.1 Assay mit gereinigtem PsyC

Der Assay wurde in einem Gesamtvolumen von 1 mL mit den in Tab. 6-38 angegebenen Bestandteilen durchgeführt. Die verwendete Elutionsfraktion der PsyC-Aufreinigung (6.6.5) sowie dessen Protein und die eingesetzten Substratkonzentrationen sind direkt im Ergebnis- und Diskussionsteil ausgewiesen. Nach der Mischung des Reaktionsansatzes wurde bei 25 °C oder 30 °C für 1 h und 300 min⁻¹ inkubiert. Der Assay wurde bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt.

Tab. 6-38: Bestandteile des α -Hydroxylierungsassays.

Konzentration	Substanz
25 mM	Tris
0,25 mM	DTT
10 mM	ATP
5 mM	MgCl ₂
0,2 mM	CoASH
1 mM	α -Ketoglutarat
0,5 mM	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂
5 mM	Ascorbinsäure
200 - 300 μ M	(<i>R</i>)-3-Hydroxybuttersäureacetamidoethylthioester 33 ¹⁹¹
500 μ L	PsyC-Elutionsfraktion
ad 1 mL	ddH ₂ O

6.7.3.2 Assay mit dem Lysat des Zellaufschlusses

In dieser Assay-Variante wurde das nach dem Zellaufschluss (6.6.3) erhaltene Lysat direkt im Assay eingesetzt. Es wurde davon ausgegangen, dass alle Co-Faktoren im Lysat vorhanden waren. Daher wurde hier zu 900 μ L vom Lysat 100 μ L einer 300 μ M Substratlösung ((*R*)-3-Hydroxybuttersäureacetamidoethylthioester **33**) in Lysepuffer (Tab. 6-30) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 25 °C oder 30 °C und 300 min⁻¹ inkubiert.

6.7.3.3 Ganzzelltransformationsassay

In dem Ganzzelltransformationsassay wurden die ganzen Zellen als Biokatalysator eingesetzt. Die Prozedur wurde in Anlehnung an die Literatur durchgeführt.¹⁹⁸ Hierbei wurden die PsyC-exprimierenden Zellen nach der Kultivierung bei 5000 g für 5 min pelletiert und in 10 mL, mit 0,5 mM (*R*)-3-Hydroxybuttersäureacetamidoethylthioester **33** supplementiertem, Phosphatpuffer (2,6 mM NaH₂PO₄, 2,6 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl, 3 mM KCl (pH = 7,0)) resuspendiert. Die Inkubation erfolgte über 5 h bei 25 °C und 100 min⁻¹ in einem Schüttelinkubator.

6.7.4 Methoxylierungsassay mit PsyD O-MT

Die Methoxylierungsaktivität der PsyD O-MT wurde mit dem aufgereinigten Protein (6.7.4.1), dem Lysat direkt nach dem Zellaufschluss (6.7.4.2) und als Ganzzelltransformation (6.7.4.3) getestet. Die Methylierungsassays mit aufgereinigtem Protein wurden in Anlehnung an die Literatur durchgeführt.⁹¹ Die Analyse der Reaktion erfolgte entsprechend 6.7.5.

6.7.4.1 Assay mit gereinigtem PsyD O-MT

Der Assay wurde in einem Gesamtvolumen von 1 mL durchgeführt. Die Bestandteile im Assay sind in Tab. 6-39 aufgeführt. Die jeweilige Elutionsfraktion der PsyD O-MT-Aufreinigung sowie dessen Protein und die eingesetzten Substratkonzentration sind direkt im Ergebnis- und Diskussionsteil angegeben. Nach der Mischung des Reaktionsansatzes wurde bei 25 °C oder 30 °C für 1,5 h und

300 min⁻¹ inkubiert, wobei alle 30 min erneut 10 µL *S*-Adenosylmethionin zugegeben wurden. Der Assay wurde bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt.

Tab. 6-39: Bestandteile des Methoxylierungsassays.

Konzentration	Substanz
50-200 µL	Elutionsfraktion des Proteins
3 x 10 µL	<i>S</i> -Adenosylmethionin (SAM; 32mM)
200 - 300 µM	(<i>R</i>)-3-Hydroxybuttersäureacetamidoethylthioester 33
ad 1 mL	Hepes-Puffer pH = 7,5 (NaOH)

6.7.4.2 Assay mit dem Lysat des Zellaufschlusses

In dieser Assay-Variante wurde das nach dem Zellaufschluss (6.6.3) erhaltene Lysat direkt im Assay eingesetzt. Es wurde zu 400 µL Lysat 100 µL einer 300 µM Substratlösung ((*R*)-3-Hydroxybuttersäureacetamidoethylthioester **33**) in Lysepuffer (Tab. 6-30) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 1,5 h bei 25 °C oder 30 °C und 300 min⁻¹ inkubiert. Dabei wurde zum Anfang und während des Assays alle 30 min 10 µL 32 mM SAM-Lösung zugegeben.

6.7.4.3 Ganzzelltransformation

Die Methoxylierungsreaktion wurde in dieser Assay Variante mit ganzen Zellen als Biokatalysator durchgeführt. Die Methode wurde in Anlehnung an die Literatur durchgeführt.¹⁹⁸ Hierbei wurden die PsyD *O*-MT exprimierenden Zellen nach der Kultivierung bei 5000 g für 5 min pelletiert. Für die Reaktion wurde das Zellpellet in 10 mL, mit 0,5 mM (*R*)-3-Hydroxybuttersäureacetamidoethylthioester **33** supplementiertem, Natriumphosphatpuffer (2,6 mM NaH₂PO₄, 2,6 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl, 3 mM KCl (pH = 7,0)) resuspendiert. Die Inkubation erfolgte über 5 h bei 25 °C und 100 min⁻¹ in einem Schüttelinkubator. Eine Zugabe von SAM wurde hier nicht vorgenommen.

6.7.5 Analytik des α-Hydroxylierungsassay und des Methoxylierungsassay

Für die Analytik des Methoxylierungs- und α-Hydroxylierungsassay wurden das Edukt und gegebenenfalls das Produkt mit dem gleichen Volumen Ethylacetat im Vergleich zum Assay mehrfach extrahiert. Die Trennung der organischen von der wässrigen Phase erfolgte über eine Zentrifugation bei 10000 g für 10 min. Die organische Phase wurde, je nach Gesamtvolumen, in Reaktionsgefäße oder Spitzkolben überführt und in der Speedvac oder einem Rotationsverdampfer komplett abgedampft. Die verbliebene Substanz wurde in Methanol gelöst und mittels LC-MS analysiert. In der LC-MS wurden die extrahierten Bestandteile getrennt und mittels ESI-microQ-TOF-MS konnte die jeweilige Masse detektiert werden. Die Trennung der Substanzen erfolgte dabei bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 mL x min⁻¹. Die mobile Phase bestand in den ersten zwei Minuten aus 10 % Methanol und 90 % destilliertem Wasser, wurde dann von Minute 2 bis 32 auf ein Verhältnis

60 % Methanol und 40 % destilliertem Wasser eingestellt und wurde schließlich von Minute 32 bis 39 unter den Anfangsbedingungen 10 % Methanol und 90 % destilliertem Wasser beendet. Die verwendete Säule entsprach der unter 6.6.12.3 beschriebenen. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit dem Programm Esi Compass 1.3 DataAnalysis Version 4.0. Zur einfacheren Analyse wurden Massenspuren in die Chromatogramme gelegt, sodass nur die Massen von Interesse in Abhängigkeit der Retentionszeit angezeigt wurden.

6.8 Nachweis von Enzym-gebundenem Fe (II)

Für den Nachweis von an PsyC gebundenem Eisen war aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen ein möglichst sensitiver Test notwendig. Die Messungen erfolgten durch eine fotometrische Bestimmung gebildeter Fe (II)-Ferene Komplexe (6.8.1)^{200-202,204,279} und durch eine Bestimmung mittels ICP-OES (6.8.2).

6.8.1 Fotometrische Messung durch Komplexierung mit Ferene

Das Testprinzip beruhte darauf, dass das Protein-gebundene Eisen durch eine Säurebehandlung erhalten werden konnte und durch eine Reduktion des Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch Ascorbinsäure eine Komplexierung mit Ferene ermöglicht wurde. Die dadurch hervorgerufene blaue Färbung konnte fotometrisch zur Konzentrationsbestimmung verwendet werden. Zur Berechnung wurde eine Kalibriergerade mit Hilfe von Eisenstandards erstellt (Abb. 6-5).

Die Proteinproben aus 6.6.5 und Eisenstandards wurden in einem Volumen von 100 μL vorgelegt und mit 100 μL 0,1 % (v/v) HCl gut vermischt. Die Proben wurden bei 80 °C für 10 min inkubiert. Eine Chelatisierung wurde durch die Zugabe von 500 μL 7,5 % (w/v) Ammoniumacetat, 100 μL 4 % (w/v) Ascorbinsäure, 100 μL 2,5 % (w/v) SDS und 100 μL 1,5 % (w/v) Ferene erreicht, wobei zwischen der jeweiligen Zugabe der Substanz intensiv gevortext wurde. Die Proben wurden bei 9000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand in Küvetten bei $\text{OD}_{593\text{nm}}$ fotometrisch vermessen.

Durch lineare Regression der Kalibrierkurve (Abb. 6-5) konnten die unbekanntes Eisen-Konzentrationen ermittelt werden.

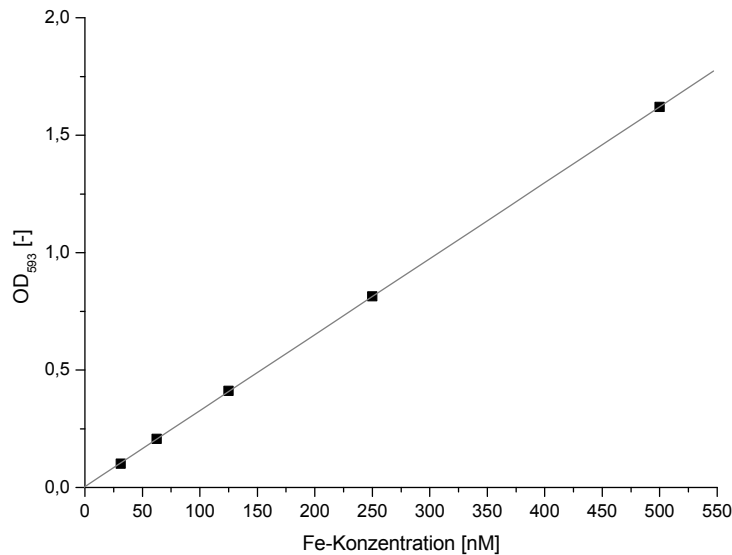


Abb. 6-5: Kalibriergerade zur Bestimmung unbekannter Eisenkonzentrationen mit dem Ferene Testsystem.

Steigung: 0,00323; Achsenabschnitt: 0,00383; Korrelationskoeffizient: 0,99999.

6.8.2 Messung mittels ICP-OES

Vor der Messung wurden die exprimierten und aufgereinigten Elutionsfraktionen von PsyC (6.6.5) für die Messung vorbereitet. 1,5 mL der Proben wurden eingewogen und mit 2,5 mL Wasser verdünnt, um genügend Volumen für die Messung zur Verfügung zu haben.

Für die Quantifizierung wurden Kalibrierstandards verwendet. Um diese an die Probenmatrix der PsyC-Proben anzupassen wurden diese aus 1,5 mL Elutionsfraktion von PsyD O-MT (5.1.6.2) hergestellt. PsyD O-MT sollte kein gebundenes Eisen enthalten und eignet sich daher für diese Aufgabe. Außerdem wurde die Kultivierung und Aufreinigung von PsyC und PsyD O-MT unter identischen Bedingungen durchgeführt. Aus der Probenvorbereitung der Kalibrierstandards resultierten zwei Hochstandards, die $0,243 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ bzw. $0,105 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ PsyD-O-MT enthielten. Zu diesen Proben wurden 2,5 mL einer Standardlösung zugegeben. Nach der Verdünnung der Proben mit der Standardlösung enthielten die Hochstandards folgende Elementkonzentrationen (Tab. 6-40).

Tab. 6-40: Elementkonzentrationen in den Hochstandards der ICP-OES-Messungen.

Element	ppm
Ca	0,5386
Fe	0,1931
K	63,5596
Mg	1,5969
Na	9,5751
Ni	0,5423
Zn	0,1918

Zusätzlich zu den Hochstandards wurde ein unterer Kalibrierstandard in gleicher Weise der Hochstandards hergestellt. Jedoch wurde anstatt der Standardlösung 2,5 mL Wasser zugegeben. Für

diesen unteren Kalibrierstandard wurde eine Fe-Konzentration von Null definiert. Dadurch konnten unspezifisch vorhandene Fe-Verunreinigungen in Lösungen automatisch berücksichtigt werden.

Die Messung erfolgte mit dem IRIS Advantage Duo, einem optischem Emissionsspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) der Firma Thermo. Es wurden die stärksten Emissionslinien von Eisen, Fe 2382 und Fe 2599, axial gemessen. Für die Betrachtung der anderen gemessenen Elemente wurden ebenfalls starke Emissionslinien gewählt. Es wurden 3 Wiederholungsmessungen der jeweiligen Probe durchgeführt.

Um die Messbarkeit von Protein-Elutionsfraktionen zu bestätigen wurden zwei Testproben vermessen. Hierzu wurde 1,493 mL der PsyD O-MT -Elutionsfraktion ($0,243 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$) mit 1,005 mL 41,16 ppb-Fe-Lösung und 1,494 mL Wasser verdünnt. Bei der zweiten Probe wurden 1,536 mL der PsyD O-MT-Elutionsfraktion ($0,105 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$) mit 0,995 mL einer 121,95 ppb-Fe-Lösung und 1,495 mL Wasser verdünnt. Die folgende Tabelle zeigt, dass Fe in den zugegebenen Mengen wiedergefunden werden konnte und die Messung der Elutionsfraktionen möglich war (Tab. 6-41).

Tab. 6-41: Fe-Gehalt der Testproben und mittels ICP-OES gemessener Fe-Gehalt.

Probe	Fe-Gehalt [ppm]	Gemessener Fe-Gehalt [ppm]
1	0,0104	0,014
2	0,0301	0,028

6.9 Extraktion und Analytik der heterologen Pederin-Expression

Bei der heterologen Expression des Pederin-Clusters wurden die Expressionskulturen extrahiert (6.9.1) und die Extrakte mittels DC (6.9.2) und LC-MS (6.9.3) auf vorhandenes Pederin **20** und dessen Biosyntheseintermediate untersucht. Die verwendeten Kultivierungsbedingungen sind im Ergebnis- und Diskussionsteil unter 5.2.3 zu finden.

6.9.1 Extraktion der *Pseudomonas* und *Acinetobacter*-Kulturen

Für die Pederin **20**-Extraktion wurde die Fermentationsbrühe nach der Kultivierung hauptsächlich direkt extrahiert. In einigen Fällen wurden die Zellen vom Medium durch Zentrifugation (5000 g, 10 min, 4 °C) getrennt und einzeln aufgearbeitet. Die Fermentationsbrühe bzw. Medium wurden 1:1 mit Ethylacetat versetzt und in einem Scheidetrichter 1 bis 3 Mal extrahiert. Bei der Verwendung von Zellpellets wurden 50 mL Reaktionsgefäße anstatt Scheidetrichter verwendet, die Zellpellets mit 30 mL Ethylacetat resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall bei einem Leistungseintrag von 50 W und einer Frequenz von 40 Hz für 1 min aufgeschlossen. Die Phasentrennung erfolgte bei Zellpellets durch Zentrifugation bei 10000 g für 5 min und bei den Ansätzen der Fermentationsbrühe bzw. Medium im Scheidetrichter. Die erhaltenen Extrakte wurden an einem Rotationsverdampfer

komplett eingengt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für Dünnschichtchromatographische und HPLC-MS Analysemethoden gelagert.

6.9.2 Dünnschichtchromatographische Analytik der Extrakte

Die DC wurde zur Analytik der Extrakte (6.9.1) auf vorhandene heterologe Expression von Pederin **20** genutzt. Dazu fanden Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten mit einer Schichtdicke von 0,2 mm (Fa. Merck) Verwendung. Als mobile Phase diente reines Ethylacetat, worin auch die verbliebenen Substanzen der Extraktion gelöst wurden. Die DC-getrennten Substanzen wurden durch eine Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz-Färbung (5 mL Eisessig, 10 mL Anisaldehyd, 15 mL konz. Schwefelsäure) sichtbar gemacht. Dazu wurde die getrocknete DC-Platte in die Färbereagenz getaucht und durch eine Trocknung mit Hilfe eines Heißluftföns sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle diente gereinigtes Pederin **20**⁹¹ und hatte unter den gegebenen Bedingungen einen Rf-Wert von 0,38.

6.9.3 LC-MS-Analytik der Extrakte

Um auch geringste Mengen Pederin **20** detektieren zu können, wurde von den Extrakten Messungen mittels LC-MS durchgeführt. Hierzu wurden die Substanzen der Extrakte aus 6.9.1 in 75 μL Acetonitril mit 0,5 % TFA aufgenommen, mittels HPLC bei einer Fließgeschwindigkeit von $0,4\text{ mL} \times \text{min}^{-1}$ über eine C18-Säule (6.6.12.3) getrennt und mittels ESI-microQ-TOF-MS im Positivmodus detektiert. Zur Trennung der Substanzen wurde in der HPLC folgender Gradient verwendet. Die mobile Phase bestand für 2,5 min aus 90 % Wasser und 10 % Acetonitril, wurde kontinuierlich von Minute 2,5 bis 20 auf 25 % Wasser und 75 % Acetonitril erhöht und wurde unter diesen Bedingungen für 2 min konstant gehalten. Danach wurde von Minute 28 bis 30 mit 100 % Acetonitril gespült und abschließend die Ausgangsbedingungen für 10 min eingestellt (90 % Wasser und 10 % Acetonitril). Da Pederin **20** keine UV-Aktivität aufweist und die reinen Massedaten aufgrund der Komplexität der Extrakte schwierig auszuwerten waren, wurde in dem Programm Esi Compass 1.3 DataAnalysis Version 4.0 eine Massenspur in das Chromatogramm gelegt, sodass nur die Pederinmasse oder Pederin-ähnliche Massen in Abhängigkeit von der Retentionszeit angezeigt wurden. Die gleiche Vorgehensweise wurde für die Pederin-Biosyntheseintermediate verwendet.

6.10 Verwendete Chemikalien

Gewöhnliche Chemikalien sowie Lösungsmittel wie Aceton, Acetonitril, Chloroform, Dichlormethan, Isopropanol, Ethylacetat, Methanol etc. wurden von den Firmen Fluka/Riedel-de-Haën (Seelze), Merck (Dramstadt), Fisher Scientific (Schwerte), Sigma-Aldrich (Seelze) und J.T. Baker/Mallinckrodt Baker (Deventer, NL) mit dem Reinheitsgrad p.A. verwendet. In HPLC-Anwendungen wurden HPLC-grade Lösungsmittel 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
Anhydrotetracycline	IBA, Göttingen
Antarctic Phosphatase + 10x Puffer	NEB, Frankfurt/Main
Bovin Serum Albumin (BSA-Lösung 10 mg x mL ⁻¹)	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
Champion pET-Sumo Expression System	Invitrogen, Karlsruhe
Chitinharz	Invitrogen, Karlsruhe
Chloramphenicol	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxythiamin-5'-triphosphat (dTTP)	Invitrogen, Karlsruhe
p-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-Dithiothreit (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)
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	KMF, Lohmar
Expand High Fidelity ^{PLUS} PCR System	Roche, Grenzach-Wyhlen
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

Chemikalie	Firma, Sitz
Kaliumacetat	ABCR; Karlsruhe
Kaliumcarbonat	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Acros Organics, Geel (B)
Kanamycin-Sulfat	Roth, Karlsruhe
α -Ketoglutarsäure	Roth, Karlsruhe
α -Ketoglutarsäure-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
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
Nicotinamidadeninucleotid (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
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR purification kit	Qiagen, Hilden
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
Strep-Tag Starter Kit	IBA, Göttingen
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Seelze
T4 DNA Ligase + 10x Puffer	NEB, Frankfurt/Main
<i>Taq</i> DNA Polymerase + 10x Puffer	Jena Bioscience, Jena
Tetracyclin-Hydrochlorid	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

Chemikalie	Firma, Sitz
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

6.11 Verwendete Geräte und Materialien

Gerät / Material	Firma, Sitz
Agarosegelelektrophorese-Kammer + Spannungsquelle Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Analysenwaage CP225D	Sartorius, Göttingen
Autoklav V65	Systec, Wettenberg
Cellophan-Folien + Geltrocknungsrahmen	Roth, Karlsruhe
Celluloseacetat-Folie OTB (25x130 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
DC-Alufolie 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
French Press FA-078A-E	Thermo, Langenselbold
Geldokumentation Gene Genius	Syngene, Cambridge (UK)
Halb-Mikroküvette (1,6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
HPLC-Säule C18 Nucleodur 100, 125x2 mm, 5 µm	Machery-Nagel, Düren
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
Fotometer (Biofotometer)	Eppendorf, Hamburg
Fotometer BioMate 3 mit Kühleinheit FL300	Thermo Electron, Cambridge (UK)
Pipetten Pipetman P2 - P10 ml	Julabo Labortechnik, Seelbach
Poly-Prep Säule (leer)	Gilson, Middleton (USA)
Probenfläschchen für Autosampler (HPLC-Gefäße mit Deckel und Septum)	Bio-Rad, München
ProteanII xi cell (Gelelektrophoresesystem vertikal)	Roth, Karlsruhe
	Bio-Rad, München

Gerät / Material	Firma, Sitz
Rotationsverdampfer VV2000	Heidolph, Kelheim
Schüttler Rotamax 120	Heidolph, Kelheim
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

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⁺

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-microQ-MS:

- HPLC-Anlage Agilent 1200 Series
- microQ-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

ICP-OES:

- IRIS Advantage Duo, Fa. Thermo

FPLC:

- Amersham Äkta FPLC
 - Frac 900
 - Pump P-920
 - Monitor UPC-900
-

7 Abkürzungsverzeichnis

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 x mL ⁻¹
APS	Ammoniumperoxodisulfat
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 x mL ⁻¹
CoA / CoASH	Coenzym A
CP	Carrierprotein
CR	Crotonase
Cys	Cystein
Da	Dalton (= g/mol)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DH	Dehydratase oder Dehydrogenase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	1,4-Dithiothreit
dTTP	Desoxythymintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure (ethylene diamine tetracetic acid)
ER	Enoylreduktase
<i>ery</i>	Erythromycin A-Gencluster bzw. Gen des Erythromycin A-Genclusters
Ery	Protein, exprimiert aus dem Erythromycin A-Gen
ESI	Elektrosprayionisation
ESI-FT-ICR	Elektrosprayionisations-Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAS	Fettsäuresynthase (fatty acid synthase)
Ferene	3-(2-pyridyl)-5,6-bis(2-(5-furylsulfonicacid))-1,2,4-triazine Dinatriumsalz x H ₂ O
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
HIC	Hydrophobe Interaktions Chromatographie
His	Histidin
HMG-CoA oder HMGS	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A
H ₂ O _{dest.}	destilliertes (<i>hier</i> : deionisiertes) Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICP-OES	Optisches Emissionsspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma
Ile	Isoleucin
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 $50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$
KS	Ketosynthese (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
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
<i>onn</i>	Gen des Onnamid-Genclusters
Onn	Protein, exprimiert aus Onnamid-Gen
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
PCP	Peptidylcarrierprotein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>ped</i>	Gen des Pederin-Genclusters
Ped	Protein, exprimiert aus Pederingen
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPTase	Phosphopantetheinyltransferase
<i>psy</i>	Gen des Psymberin-Gencluster
Psy	Protein, exprimiert aus Psymberingen
rbs	ribosomale Bindestelle
RT	Raumtemperatur
RNase A	Ribonuklease A
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulphate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
SNAC	N-Acetylcysteamin
Str^{50}	Streptomycin in der Endkonzentration $50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphon
TE	Thioesterase
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
$\text{Tet}^{12,5}$	Tetracyclin in der Endkonzentration $12,5 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$
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

8 Literatur

1. Shen B: Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* **2003**, 7:285-295.
 2. Hertweck C: Die biosynthetische Grundlage der Polyketid-Vielfalt. *Angew Chem* **2009**, 121:4782.
 3. Staunton J, Weissman KJ: Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* **2001**, 18:380-416.
 4. O'Hagan D: The Polyketide Metabolites. pp. 86. Ellis Horwood, Chichester; 1991:86.
 5. Sudek S, Lopanik NB, Waggoner LE, Hildebrand M, Anderson C, Liu H, Patel A, Sherman DH, Haygood MG: 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* **2006**, 70:67-74.
 6. Cannon M, Burns K: Modes of action of erythromycin and thiostrepton as inhibitors of protein synthesis. *FEBS Lett* **1971**, 18:1-5.
 7. Arcamone F: Doxorubicin: anticancer antibiotics. **1981**.
 8. Goto T, Kino T, Hatanaka H, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H: Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant P* **1987**, 19:4-8.
 9. Tanaka H: Structure of FK 506: a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. *J Am Chem Soc* **1987**, 109:5031.
 10. Fung JJ: FK506 in solid organ transplantation. *Ther Drug Monit* **1995**, 17:592.
 11. Birch AJ: Biosynthesis of polyketides and related compounds. *Science* **1967**, 156:202-206.
 12. Hopwood DA: Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chem Rev* **1997**, 97:2465-2498.
 13. Horinouchi S: Combinatorial biosynthesis of non-bacterial and unnatural flavonoids, stilbenoids and curcuminoids by microorganisms. *J Antibiot (Tokyo)* **2008**, 61:709-728.
 14. Leadlay PF: Combinatorial approaches to polyketide biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* **1997**, 1:162-168.
 15. Weissman KJ, Leadlay PF: Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nat Rev Microbiol* **2005**, 3:925-936.
 16. Wilkinson B, Micklefield J: Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways. *Nat Chem Biol* **2007**, 3:379-386.
 17. Zhang W, Tang Y: Combinatorial biosynthesis of natural products. *J Med Chem* **2008**, 51:2629-2633.
 18. Liou GF, Khosla C: Building-block selectivity of polyketide synthases. *Curr Opin Chem Biol* **2003**, 7:279-284.
 19. Lai JR, Koglin A, Walsh CT: Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Biochemistry* **2006**, 45:14869-14879.
 20. Cane DE, Walsh CT: The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **1999**, 6:319-325.
 21. Fischbach MA, Walsh CT: Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem Rev* **2006**, 106:3468-3496.
 22. Walsh CT: Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science* **2004**, 303:1805-1810.
 23. Weissman KJ, Smith CJ, Hanefeld U, Aggarwal R, Bycroft M, Staunton J, Leadlay PF: The Thioesterase of the Erythromycin-Producing Polyketide Synthase: Influence of Acyl Chain Structure on the Mode of Release of Substrate Analogues from the Acyl Enzyme Intermediates. *Angew Chem Int Ed Engl* **1998**, 37:1437-1440.
 24. Rawlings BJ: Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A--erythromycin biosynthesis). *Nat Prod Rep* **2001**, 18:190-227.
-

25. Flugel RS, Hwangbo Y, Lambalot RH, Cronan JE, Jr., Walsh CT: *Holo*-(acyl carrier protein) synthase and phosphopantetheinyl transfer in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **2000**, 275:959-968.
 26. Lambalot RH, Walsh CT: Cloning, overproduction, and characterization of the *Escherichia coli* *holo*-acyl carrier protein synthase. *J Biol Chem* **1995**, 270:24658-24661.
 27. Lambalot RH, Walsh CT: *Holo*-[acyl-carrier-protein] synthase of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **1997**, 279:254-262.
 28. Katsuyama Y, Matsuzawa M, Funa N, Horinouchi S: *In vitro* synthesis of curcuminoids by type III polyketide synthase from *Oryza sativa*. *J Biol Chem* **2007**, 282:37702-37709.
 29. Ramirez-Ahumada Mdel C, Timmermann BN, Gang DR: Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. *Phytochemistry* **2006**, 67:2017-2029.
 30. Monroe EA, Van Dolah FM: The toxic dinoflagellate *Karenia brevis* encodes novel type I-like polyketide synthases containing discrete catalytic domains. *Protist* **2008**, 159:471-482.
 31. Snyder RV, Gibbs PD, Palacios A, Abiy L, Dickey R, Lopez JV, Rein KS: Polyketide synthase genes from marine dinoflagellates. *Mar Biotechnol (NY)* **2003**, 5:1-12.
 32. Zhu G, LaGier MJ, Stejskal F, Millership JJ, Cai X, Keithly JS: *Cryptosporidium parvum*: the first protist known to encode a putative polyketide synthase. *Gene* **2002**, 298:79-89.
 33. Cox RJ, Simpson TJ: Fungal type I polyketide synthases. *Methods Enzymol* **2009**, 459:49-78.
 34. Cox RJ: Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Org Biomol Chem* **2007**, 5:2010-2026.
 35. Straight PD, Fischbach MA, Walsh CT, Rudner DZ, Kolter R: A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104:305-310.
 36. Cane DE, Walsh CT, Khosla C: Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **1998**, 282:63-68.
 37. Cheng YQ, Tang GL, Shen B: Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100:3149-3154.
 38. Piel J: A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99:14002-14007.
 39. Brachmann AO, Joyce SA, Jenke-Kodama H, Schwar G, Clarke DJ, Bode HB: A type II polyketide synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Chembiochem* **2007**, 8:1721-1728.
 40. Sandmann A, Dickschat J, Jenke-Kodama H, Kunze B, Dittmann E, Muller R: A Type II polyketide synthase from the gram-negative Bacterium *Stigmatella aurantiaca* is involved in Aurachin alkaloid biosynthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, 46:2712-2716.
 41. Moore BS, Hopke JN: Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *Chembiochem* **2001**, 2:35-38.
 42. Pfeifer V, Nicholson GJ, Ries J, Recktenwald J, Schefer AB, Shawky RM, Schroder J, Wohlleben W, Pelzer S: A polyketide synthase in glycopeptide biosynthesis: the biosynthesis of the non-proteinogenic amino acid (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine. *J Biol Chem* **2001**, 276:38370-38377.
 43. Seshime Y, Juvvadi PR, Fujii I, Kitamoto K: Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 331:253-260.
 44. Scotti C, Piatti M, Cuzzoni A, Perani P, Tognoni A, Grandi G, Galizzi A, Albertini AM: A *Bacillus subtilis* large ORF coding for a polypeptide highly similar to polyketide synthases. *Gene* **1993**, 130:65-71.
 45. Chen XH, Vater J, Piel J, Franke P, Scholz R, Schneider K, Koumoutsis A, Hitzeroth G, Grammel N, Strittmatter AW, Gottschalk G, Sussmuth RD, Borriss R: Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J Bacteriol* **2006**, 188:4024-4036.
-

46. Butcher RA, Schroeder FC, Fischbach MA, Straight PD, Kolter R, Walsh CT, Clardy J: The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104:1506-1509.
 47. Bumpus SB, Magarvey NA, Kelleher NL, Walsh CT, Calderone CT: Polyunsaturated fatty-acid-like *trans*-enoyl reductases utilized in polyketide biosynthesis. *J Am Chem Soc* **2008**, 130:11614-11616.
 48. Piel J, Hui D, Fusetani N, Matsunaga S: Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environ Microbiol* **2004**, 6:921-927.
 49. Jenke-Kodama H, Borner T, Dittmann E: Natural biocombinatorics in the polyketide synthase genes of the actinobacterium *Streptomyces avermitilis*. *PLoS Comput Biol* **2006**, 2:e132.
 50. 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* **2008**, 26:225-233.
 51. Edwards DJ, Marquez BL, Nogle LM, McPhail K, Goeger DE, Roberts MA, Gerwick WH: Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Chem Biol* **2004**, 11:817-833.
 52. Gu L, Jia J, Liu H, Hakansson K, Gerwick WH, Sherman DH: Metabolic coupling of dehydration and decarboxylation in the curacin A pathway: functional identification of a mechanistically diverse enzyme pair. *J Am Chem Soc* **2006**, 128:9014-9015.
 53. Calderone CT, Kowtoniuk WE, Kelleher NL, Walsh CT, Dorrestein PC: 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* **2006**, 103:8977-8982.
 54. Finking R, Marahiel MA: Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu Rev Microbiol* **2004**, 58:453-488.
 55. Felnagle EA, Jackson EE, Chan YA, Podevels AM, Berti AD, McMahon MD, Thomas MG: Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Mol Pharm* **2008**, 5:191-211.
 56. Sieber SA, Marahiel MA: Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev* **2005**, 105:715-738.
 57. Hubbard BK, Walsh CT: Vancomycin assembly: nature's way. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, 42:730-765.
 58. Schwarzer D, Marahiel MA: Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* **2001**, 88:93-101.
 59. Nikolaus A, Heinz W, Hans Z, Ellen R, Axel Z, Wilfried AK, Volker S: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 253. Mitteilung. Hormaomycin, ein neues Peptid-lacton mit morphogener Aktivität auf *Streptomyces*. *Helv Chim Acta* **1989**, 72:426-437.
 60. Weinig S, Hecht HJ, Mahmud T, Muller R: Melithiazol biosynthesis: further insights into myxobacterial PKS/NRPS systems and evidence for a new subclass of methyl transferases. *Chem Biol* **2003**, 10:939-952.
 61. Fisch KM, Gurgui C, Heycke N, van der Sar SA, Anderson SA, Webb VL, Taudien S, Platzer M, Rubio BK, Robinson SJ, Crews P, Piel J: Polyketide assembly lines of uncultivated sponge symbionts from structure-based gene targeting. *Nat Chem Biol* **2009**, 5:494-501.
 62. Julien B, Shah S: Heterologous expression of epothilone biosynthetic genes in *Myxococcus xanthus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46:2772-2778.
 63. Narquizian R, Kocienski PJ: The pederin family of antitumor agents: structures, synthesis and biological activity. *Ernst Schering Res Found Workshop* **2000**:25-56.
 64. Cichewicz RH, Valeriote FA, Crews P: Psymberin, a potent sponge-derived cytotoxin from *Psammocinia* distantly related to the pederin family. *Org Lett* **2004**, 6:1951-1954.
 65. 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* **2004**, 101:16222-16227.
-

66. Burren NS, Clement JJ: Antitumor activity and mechanism of action of the novel marine natural products mycalamide-A and -B and onnamide. *Cancer Res* **1989**, 49:2935-2940.
 67. Perry NB: Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale*. *J Am Chem Soc* **1988**, 110:4850.
 68. Kellner RLL: Allocation of pederin during lifetime of *Paederus* rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae): Evidence for polymorphism of hemolymph toxin. *J Chem Ecol* **1995**, 21:1719.
 69. Kellner RLL: Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. *Oecologia* **1996**, 107:293.
 70. Piel J, Butzke D, Fusetani N, Hui D, Platzer M, Wen G, Matsunaga S: Exploring the chemistry of uncultivated bacterial symbionts: antitumor polyketides of the pederin family. *J Nat Prod* **2005**, 68:472-479.
 71. Pavan M, Bo G: Ricerche sulla differenziabilità, natura e attività del principio tossico di *Paederus fuscipes* Curt. (*Col. Staph.*). *Mem soc entomol ital* **1952**, 31:67-82.
 72. Hentschel U, Hopke J, Horn M, Friedrich AB, Wagner M, Hacker J, Moore BS: Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol* **2002**, 68:4431-4440.
 73. Vacelet J: Associations between sponges and bacteria. *J Exp Mar Biol Ecol* **1977**, 30:301.
 74. 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**, 73:2144-2155.
 75. Hrvatin S, Piel J: Rapid isolation of rare clones from highly complex DNA libraries by PCR analysis of liquid gel pools. *J Microbiol Methods* **2007**, 68:434-436.
 76. Brega A, Falaschi A, De Carli L, Pavan M: Studies on the mechanism of action of pederine. *J Cell Biol* **1968**, 36:485-496.
 77. Jiang X, Garcia-Fortanet J, De Brabander JK: Synthesis and complete stereochemical assignment of psymberin/irciniastatin A. *J Am Chem Soc* **2005**, 127:11254-11255.
 78. Pettit GR, Xu JP, Chapuis JC, Pettit RK, Tackett LP, Doubek DL, Hooper JN, Schmidt JM: Antineoplastic agents. 520. Isolation and structure of irciniastatins A and B from the Indo-Pacific marine sponge *Ircinia ramosa*. *J Med Chem* **2004**, 47:1149-1152.
 79. Lee KH, 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* **2005**, 96:357-364.
 80. 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* **2004**, 5:93-98.
 81. Piel J, Hofer 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* **2004**, 186:1280-1286.
 82. Kellner RL: Molecular identification of an endosymbiotic bacterium associated with pederin biosynthesis in *Paederus sabaeus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Insect Biochem Mol Biol* **2002**, 32:389-395.
 83. Kellner RL: Suppression of pederin biosynthesis through antibiotic elimination of endosymbionts in *Paederus sabaeus*. *J Insect Physiol* **2001**, 47:475-483.
 84. Rupert LLK: Horizontal transmission of biosynthetic capabilities for pederin in *Paederus melanurus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Chemoecology* **2001**, 11:127-130.
 85. Gnanaraj P, Venugopal V, Mozhi MK, Pandurangan CN: 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* **2007**, 57:297-300.
 86. Sendur N, Savk E, Karaman G: *Paederus* dermatitis: a report of 46 cases in Aydin, Turkey. *Dermatology* **1999**, 199:353-355.
 87. Norton SA, Lyons C: Blister beetles and the ten plagues. *Lancet* **2002**, 359:1950.
 88. Jewett JC, Rawal VH: Total synthesis of pederin. *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, 46:6502-6504.
-

89. Takemura T, Nishii Y, Takahashi S, Kobayashi J, Nakata T: Total synthesis of pederin, a potent insect toxin: the efficient synthesis of the right half, (+)-benzoylpedamide. *Tetrahedron* **2002**, 58:6359-6365.
 90. Nakata T, Nagao S, Oishi T: Total synthesis of (+)-pederin. 2. Stereocontrolled synthesis of (+)-benzoylselenopederic acid and total synthesis of (+)-pederin. *Tetrahedron Lett* **1985**, 26:6465-6468.
 91. Zimmermann K: Expression und Untersuchung von Enzymen der Pederin-Biosynthese aus einem nicht kultivierten Symbionten. *Dissertation*. Universität Bonn, **2008**.
 92. Zimmermann K, Engeser M, Blunt JW, Munro MH, Piel J: Pederin-Type Pathways of Uncultivated Bacterial Symbionts: Analysis of O-Methyltransferases and Generation of a Biosynthetic Hybrid. *J Am Chem Soc* **2009**.
 93. Katz L, Donadio S: Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu Rev Microbiol* **1993**, 47:875-912.
 94. Jiang X, Williams N, De Brabander JK: Synthesis of psymberin analogues: probing a functional correlation with the pederin/mycalamide family of natural products. *Org Lett* **2007**, 9:227-230.
 95. Calderone CT, Iwig DF, Dorrestein PC, Kelleher NL, Walsh CT: Incorporation of nonmethyl branches by isoprenoid-like logic: multiple beta-alkylation events in the biosynthesis of myxovirescin A1. *Chem Biol* **2007**, 14:835-846.
 96. Lopanik NB, Shields JA, Buchholz TJ, Rath CM, Hothersall J, Haygood MG, Hakansson K, Thomas CM, Sherman DH: *In vivo* and *in vitro* trans-acylation by BryP, the putative bryostatins pathway acyltransferase derived from an uncultured marine symbiont. *Chem Biol* **2008**, 15:1175-1186.
 97. Gu L, Geders TW, Wang B, Gerwick WH, Hakansson K, Smith JL, Sherman DH: GNAT-like strategy for polyketide chain initiation. *Science* **2007**, 318:970-974.
 98. Hausinger RP: Fell/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **2004**, 39:21-68.
 99. Muller I, Weinig S, Steinmetz H, Kunze B, Veluthoor S, Mahmud T, Muller R: A unique mechanism for methyl ester formation via an amide intermediate found in myxobacteria. *Chembiochem* **2006**, 7:1197-1205.
 100. Silakowski B, Schairer HU, Ehret H, Kunze B, Weinig S, Nordsiek G, Brandt P, Blocker H, Hofle G, Beyer S, Muller R: New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J Biol Chem* **1999**, 274:37391-37399.
 101. Beyer S, Kunze B, Silakowski B, Muller R: Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1445:185-195.
 102. Friehs KH: Maßnahmen zur Verbesserung der Produktion von rekombinanten Proteinen und Plasmid-DNS. *Habilitationsschrift*. Universität Bielefeld, Technische Fakultät, AG Fermentationstechnik; **1999**.
 103. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J: Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* **2004**, 22:346-353.
 104. Hannig G, Makrides SC: Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **1998**, 16:54-60.
 105. Moriyama EN, Powell JR: Gene length and codon usage bias in *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **1998**, 26:3188-3193.
 106. Noguchi T, Takahashi H: A novel expression system for production of a labile protein in *Escherichia coli* by infection with cytosin-substituting T4 phage. *Agric Biol Chem* **1991**, 55:2507-2513.
 107. Mintz GR: An irreversible serine protease-inhibitor. *Biopharm Manuf* **1993**, 6:34-38.
 108. Quiles E, Perbal MC, Egly J: Purification of proteins. Part 2: Control of proteolytic activity. *Biofutur* **1991**, 98:1-11.
-

109. Moulton J: The current state of the art in protein structure prediction. *Curr Opin Biotechnol* **1996**, 7:422-427.
 110. Karplus M: The Levinthal paradox: yesterday and today. *Fold Des* **1997**, 2:69-75.
 111. Martin J, Hartl FU: Chaperone-assisted protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **1997**, 7:41-52.
 112. Vivien E, Megessier S, Pieretti I, Cociancich S, Frutos R, Gabriel DW, Rott PC, Royer M: *Xanthomonas albilineans* HtpG is required for biosynthesis of the antibiotic and phytotoxin albicidin. *FEMS Microbiol Lett* **2005**, 251:81-89.
 113. Peiru S, Menzella HG, Rodriguez E, Carney J, Gramajo H: Production of the potent antibacterial polyketide erythromycin C in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **2005**, 71:2539-2547.
 114. Pfeifer BA, Khosla C: Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiol Mol Biol Rev* **2001**, 65:106-118.
 115. Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T: Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **1998**, 64:1694-1699.
 116. Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T: Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **2000**, 66:884-889.
 117. Thomas JG, Baneyx F: Divergent Effects of Chaperone Overexpression and Ethanol Supplementation on Inclusion Body Formation in Recombinant *Escherichia coli*. *Protein Express Purif* **1997**, 11:289-296.
 118. Thomas JG, Ayling A, Baneyx F: Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol* **1997**, 66:197-238.
 119. Chen X, Reddanna P, Reddy GR, Kidd R, Hildenbrandt G, Reddy CC: Expression, Purification, and Characterization of a Recombinant 5-Lipoxygenase from Potato Tuber. *Biochem Bioph Res Co* **1998**, 243:438-443.
 120. Wenzel SC, Gross F, Zhang Y, Fu J, Stewart AF, Muller R: Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in pseudomonads via red/ET recombineering. *Chem Biol* **2005**, 12:349-356.
 121. Chen AY, Schnarr NA, Kim CY, Cane DE, Khosla C: Extender unit and acyl carrier protein specificity of ketosynthase domains of the 6-deoxyerythronolide B synthase. *J Am Chem Soc* **2006**, 128:3067-3074.
 122. Blight MA, Chervaux C, Holland IB: Protein secretion pathway in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **1994**, 5:468-474.
 123. Blight MA, Holland IB: Heterologous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator. *Trends Biotechnol* **1994**, 12:450-455.
 124. Nakano MM, 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* **1992**, 232:313-321.
 125. Sanchez C, Du L, Edwards DJ, Toney MD, 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* **2001**, 8:725-738.
 126. Pfeifer BA, Admiraal SJ, Gramajo H, Cane DE, Khosla C: Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science* **2001**, 291:1790-1792.
 127. Tang L, Shah S, Chung L, Carney J, Katz L, Khosla C, Julien B: Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science* **2000**, 287:640-642.
 128. Newman DJ: Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *J Med Chem* **2008**, 51:2589-2599.
 129. Koehn FE, Carter GT: The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, 4:206-220.
-

130. Clardy J, Fischbach MA, Walsh CT: New antibiotics from bacterial natural products. *Nat Biotechnol* **2006**, 24:1541-1550.
 131. Baltz RH: Antibiotic discovery from actinomycetes; will a renaissance follow the decline and fall? *SIM News* **2005**, 55:186-196.
 132. Baltz RH: Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *J Ind Microbiol Biotechnol* **2006**, 33:507-513.
 133. Haefner B: Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today* **2003**, 8:536-544.
 134. Piel J: Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. *Curr Med Chem* **2006**, 13:39-50.
 135. Partida-Martinez LP, de Looss CF, 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* **2007**, 73:793-797.
 136. Partida-Martinez LP, Hertweck C: A gene cluster encoding rhizoxin biosynthesis in "*Burkholderia rhizoxina*", the bacterial endosymbiont of the fungus *Rhizopus microsporus*. *Chembiochem* **2007**, 8:41-45.
 137. Menzella HG, Reeves CD: Combinatorial biosynthesis for drug development. *Curr Opin Microbiol* **2007**, 10:238-245.
 138. Shen B: Accessing Natural Products by Combinatorial Biosynthesis. *Sci STKE* **2004**, 2004:14.
 139. Staunton J, Wilkinson B: Combinatorial biosynthesis of polyketides and nonribosomal peptides. *Curr Opin Chem Biol* **2001**, 5:159-164.
 140. Weissman KJ, Leadlay PF: Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nat Rev Micro* **2005**, 3:925-936.
 141. 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* **1999**, 96:1846-1851.
 142. Cropp TA, Wilson DJ, Reynolds KA: Identification of a cyclohexylcarbonyl CoA biosynthetic gene cluster and application in the production of doramectin. *Nat Biotechnol* **2000**, 18:980-983.
 143. Hill AM, Thompson BL: Novel soraphens from precursor directed biosynthesis. *Chem Commun (Camb)* **2003**:1360-1361.
 144. Rix U, Fischer C, Remsing LL, Rohr J: Modification of *post*-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep* **2002**, 19:542-580.
 145. Ziehl M, He J, Dahse H-M, Hertweck C: Mutasyntese von Aureonitril, einem Aureothin-Derivat mit signifikant verbesserter zytostatischer Aktivität. *Angew Chem* **2005**, 117:1226-1230.
 146. Hale KJ, Hummersone MG, Manaviazar S, Frigerio M: The chemistry and biology of the bryostatin antitumour macrolides. *Nat Prod Rep* **2002**, 19:413-453.
 147. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM: Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* **2003**, 66:1022-1037.
 148. Kraljevic S, Stambrook PJ, Pavelic K: Accelerating drug discovery. *EMBO Rep* **2004**, 5:837-842.
 149. Cuevas C, Francesch A: Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Nat Prod Rep* **2009**, 26:322-337.
 150. Arndt H-D, Hackenberger C, Schwarzer D: Semisynthese. Chemie mit den Molekülen der Natur. *Chem unserer Zeit* **2010**, 44:130-137.
 151. Cheng Q, Xiang L, Izumikawa M, Meluzzi D, Moore BS: Enzymatic total synthesis of enterocin polyketides. *Nat Chem Biol* **2007**, 3:557-558.
 152. Kim CY, Alekseyev VY, Chen AY, Tang Y, Cane DE, Khosla C: Reconstituting modular activity from separated domains of 6-deoxyerythronolide B synthase. *Biochemistry* **2004**, 43:13892-13898.
 153. Aldrich CC, Beck BJ, Fecik RA, Sherman DH: Biochemical investigation of pikromycin biosynthesis employing native penta- and hexaketide chain elongation intermediates. *J Am Chem Soc* **2005**, 127:8441-8452.
-

154. Chen H, O'Connor S, Cane DE, Walsh CT: Epothilone biosynthesis: assembly of the methylthiazolylcarboxy starter unit on the EpoB subunit. *Chem Biol* **2001**, 8:899-912.
 155. Hicks LM, O'Connor SE, Mazur MT, Walsh CT, Kelleher NL: Mass spectrometric interrogation of thioester-bound intermediates in the initial stages of epothilone biosynthesis. *Chem Biol* **2004**, 11:327-335.
 156. Wu J, Zaleski TJ, Valenzano C, Khosla C, Cane DE: Polyketide double bond biosynthesis. Mechanistic analysis of the dehydratase-containing module 2 of the picromycin/methymycin polyketide synthase. *J Am Chem Soc* **2005**, 127:17393-17404.
 157. Gokhale RS, Tsuji SY, Cane DE, Khosla C: Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science* **1999**, 284:482-485.
 158. Gehring AM, Lambalot RH, Vogel KW, Drueckhammer DG, Walsh CT: Ability of *Streptomyces* spp. acyl carrier proteins and coenzyme A analogs to serve as substrates *in vitro* for *E. coli* *holo*-ACP synthase. *Chem Biol* **1997**, 4:17-24.
 159. Roobol-Boza M, Dolby V, Doverskog M, Barrefelt A, Lindqvist F, Oppermann UC, Kohler Van Alstine K, Tjerneld F: Membrane protein isolation by *in situ* solubilization, partitioning and affinity adsorption in aqueous two-phase systems. Purification of the human type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Chromatogr A* **2004**, 1043:217-223.
 160. Dorrestein PC, Kelleher NL: Dissecting non-ribosomal and polyketide biosynthetic machineries using electrospray ionization Fourier-Transform mass spectrometry. *Nat Prod Rep* **2006**, 23:893-918.
 161. Neville C, Murphy A, Kavanagh K, Doyle S: A 4'-phosphopantetheinyl transferase mediates non-ribosomal peptide synthetase activation in *Aspergillus fumigatus*. *ChemBiochem* **2005**, 6:679-685.
 162. Seidle HF, Couch RD, Parry RJ: Characterization of a nonspecific phosphopantetheinyl transferase from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* FF5. *Arch Biochem Biophys* **2006**, 446:167-174.
 163. Rehm H: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 5 edn. Heidelberg: Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag; **2006**.
 164. Cheng YQ, Tang GL, Shen B: Identification and localization of the gene cluster encoding biosynthesis of the antitumor macrolactam leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140. *J Bacteriol* **2002**, 184:7013-7024.
 165. Keatinge-Clay AT, Shelat AA, Savage DF, Tsai SC, Miercke LJ, O'Connell JD, Khosla C, Stroud RM: Catalysis, specificity, and ACP docking site of *Streptomyces coelicolor* malonyl-CoA:ACP transacylase. *Structure* **2003**, 11:147-154.
 166. Misra A, Sharma SK, Surolia N, Surolia A: Self-acylation properties of type II fatty acid biosynthesis acyl carrier protein. *Chem Biol* **2007**, 14:775-783.
 167. Moldenhauer J: *Biosynthetische Studien von trans-AT-Polyketidsynthesen*. Dissertation. Universität Bonn, **2009**.
 168. Liou GF, Lau J, Cane DE, Khosla C: Quantitative analysis of loading and extender acyltransferases of modular polyketide synthases. *Biochemistry* **2003**, 42:200-207.
 169. Smith S, Tsai SC: The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat Prod Rep* **2007**, 24:1041-1072.
 170. Hitchman TS, Crosby J, Byrom KJ, Cox RJ, Simpson TJ: Catalytic self-acylation of type II polyketide synthase acyl carrier proteins. *Chem Biol* **1998**, 5:35-47.
 171. Beltran-Alvarez P, Cox RJ, Crosby J, Simpson TJ: Dissecting the component reactions catalyzed by the actinorhodin minimal polyketide synthase. *Biochemistry* **2007**, 46:14672-14681.
 172. Khandekar SS, Gentry DR, Van Aller GS, Warren P, Xiang H, Silverman C, Doyle ML, Chambers PA, Konstantinidis AK, Brandt M, Daines RA, Lonsdale JT: Identification, substrate specificity, and inhibition of the *Streptococcus pneumoniae* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH). *J Biol Chem* **2001**, 276:30024-30030.
 173. 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* **2006**, 580:697-702.
-

174. Molnos J, Gardiner R, Dale GE, Lange R: A continuous coupled enzyme assay for bacterial malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase (FabD). *Anal Biochem* **2003**, 319:171-176.
 175. Bessam H, Mareck AM, Foucher B: *Neurospora crassa* alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: description, resolution of components and catalytic properties. *Biochim Biophys Acta* **1989**, 990:66-72.
 176. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF: Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* **2004**, 24:7779-7788.
 177. Tretter L, Adam-Vizi V: Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci* **2004**, 24:7771-7778.
 178. Aron ZD, Fortin PD, Calderone CT, Walsh CT: FenF: servicing the Mycosubtilin synthetase assembly line in *trans*. *ChemBioChem* **2007**, 8:613-616.
 179. Szafranska AE, Hitchman TS, Cox RJ, Crosby J, Simpson TJ: Kinetic and mechanistic analysis of the malonyl CoA:ACP transacylase from *Streptomyces coelicolor* indicates a single catalytically competent serine nucleophile at the active site. *Biochemistry* **2002**, 41:1421-1427.
 180. El-Sayed AK, Hothersall J, Cooper SM, Stephens E, Simpson TJ, Thomas CM: Characterization of the mupirocin biosynthesis gene cluster from *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Chem Biol* **2003**, 10:419-430.
 181. Haapalainen AM, Merilainen G, Wierenga RK: The thiolase superfamily: condensing enzymes with diverse reaction specificities. *Trends Biochem Sci* **2006**, 31:64-71.
 182. Wu N, Cane DE, Khosla C: Quantitative analysis of the relative contributions of donor acyl carrier proteins, acceptor ketosynthases, and linker regions to intermodular transfer of intermediates in hybrid polyketide synthases. *Biochemistry* **2002**, 41:5056-5066.
 183. Wu N, Kudo F, Cane DE, Khosla C: Analysis of the Molecular Recognition Features of Individual Modules Derived from the Erythromycin Polyketide Synthase. *J Am Chem Soc* **2000**, 122:4847-4852.
 184. Wu N, Tsuji SY, Cane DE, Khosla C: Assessing the balance between protein-protein interactions and enzyme-substrate interactions in the channeling of intermediates between polyketide synthase modules. *J Am Chem Soc* **2001**, 123:6465-6474.
 185. Beck BJ, Aldrich CC, Fecik RA, Reynolds KA, Sherman DH: Substrate recognition and channeling of monomodules from the pikromycin polyketide synthase. *J Am Chem Soc* **2003**, 125:12551-12557.
 186. Beck BJ, Aldrich CC, Fecik RA, Reynolds KA, Sherman DH: Iterative chain elongation by a pikromycin monomodular polyketide synthase. *J Am Chem Soc* **2003**, 125:4682-4683.
 187. Schnarr NA, Chen AY, Cane DE, Khosla C: Analysis of covalently bound polyketide intermediates on 6-deoxyerythronolide B synthase by tandem proteolysis-mass spectrometry. *Biochemistry* **2005**, 44:11836-11842.
 188. Tang GL, Cheng YQ, Shen B: Polyketide chain skipping mechanism in the biosynthesis of the hybrid nonribosomal peptide-polyketide antitumor antibiotic leinamycin in *Streptomyces atrolivaceus* S-140. *J Nat Prod* **2006**, 69:387-393.
 189. Moldenhauer J: Synthese von Polyketidvorstufen zum Studium der Pederinbiosynthese. *Diplomarbeit*. Universität Bonn, **2006**.
 190. Khosla C, Gokhale RS, Jacobsen JR, Cane DE: Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annu Rev Biochem* **1999**, 68:219-253.
 191. Katzschmarek J: Synthetisch-enzymatische Studien zur Psymberin-Biosynthese. *Diplomarbeit*. Universität Bonn, Kekulé Institut für Organische Chemie und Biochemie; **2009**.
 192. Saitoh H, Pu RT, Dasso M: SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier. *Trends Biochem Sci* **1997**, 22:374-376.
 193. Li SJ, Hochstrasser M: A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* **1999**, 398:246-251.
-

194. Mossessova E, Lima CD: Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell* **2000**, 5:865-876.
 195. Mihalik SJ, Rainville AM, Watkins PA: Phytanic acid alpha-oxidation in rat liver peroxisomes. Production of alpha-hydroxyphytanoyl-CoA and formate is enhanced by dioxygenase cofactors. *Eur J Biochem* **1995**, 232:545-551.
 196. Croes K, Foulon V, Casteels M, Van Veldhoven PP, Mannaerts GP: Phytanoyl-CoA hydroxylase: recognition of 3-methyl-branched acyl-coAs and requirement for GTP or ATP and Mg(2+) in addition to its known hydroxylation cofactors. *J Lipid Res* **2000**, 41:629-636.
 197. Winkler R, Richter ME, Knupfer U, Merten D, Hertweck C: Regio- and chemoselective enzymatic N-oxygenation *in vivo*, *in vitro*, and in flow. *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, 45:8016-8018.
 198. Winkler R, Zocher G, Richter I, Friedrich T, Schulz GE, Hertweck C: A binuclear manganese cluster that catalyzes radical-mediated N-oxygenation. *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, 46:8605-8608.
 199. Montero-Moran GM, Li M, Rendon-Huerta E, Jourdan F, Lowe DJ, Stumpff-Kane AW, Feig M, Scazzocchio C, Hausinger RP: Purification and characterization of the FeII- and alpha-ketoglutarate-dependent xanthine hydroxylase from *Aspergillus nidulans*. *Biochemistry* **2007**, 46:5293-5304.
 200. Artiss JD: Study of continuous flow automation for serum iron on comparing several sensitive reagents. *Microchem J* **1983**, 28:275.
 201. Artiss JD, Vinogradov S, Zak B: Spectrophotometric study of several sensitive reagents for serum iron. *Clin Biochem* **1981**, 14:311-315.
 202. Hennessy DJ: Ferene-a new spectrophotometric reagent for iron. *Can J Chemistry* **1984**, 62:721.
 203. Higgins T: Novel chromogen for serum iron determinations. *Clin Chem* **1981**, 27:1619-1620.
 204. Çinkaya I: Substrat induzierte Radikalbildung in dem Eisen-Schwefel-Flavoenzym 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium aminobutyricum*. *Dissertation*. Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie; **2002**.
 205. Brazil BT, Ybarra J, Horowitz PM: Divalent cations can induce the exposure of GroEL hydrophobic surfaces and strengthen GroEL hydrophobic binding interactions. Novel effects of Zn²⁺ GroEL interactions. *J Biol Chem* **1998**, 273:3257-3263.
 206. Okuda H, Sakuhana C, Yamamoto R, Kawai R, Mizukami Y, Matsuda K: Effects of divalent cations on encapsulation and release in the GroEL-assisted folding. *Biometals* **2007**, 20:903-910.
 207. Sharma A, Quantrill NS: alpha-Ketoglutarate assay based on fluorescence quenching by NADH. *Biotechnol Prog* **1996**, 12:413-416.
 208. Korpela MT, Kurittu JS, Karvinen JT, Karp MT: A recombinant *Escherichia coli* sensor strain for the detection of tetracyclines. *Anal Chem* **1998**, 70:4457-4462.
 209. Skerra A: Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **1994**, 151:131-135.
 210. Arima J, Uesugi Y, Iwabuchi M, Hatanaka T: *Streptomyces* aminopeptidase P: biochemical characterization and insight into the roles of its N-terminal domain. *Protein Eng Des Sel* **2008**, 21:45-53.
 211. Mancini EJ, Assenberg R, Verma A, Walter TS, Tuma R, Grimes JM, Owens RJ, Stuart DI: Structure of the Murray Valley encephalitis virus RNA helicase at 1.9 Angstrom resolution. *Protein Sci* **2007**, 16:2294-2300.
 212. Zhang L, Nephew KP, Gallagher PJ: Regulation of death-associated protein kinase. Stabilization by HSP90 heterocomplexes. *J Biol Chem* **2007**, 282:11795-11804.
 213. Yamamoto Y, Ritz D, Planson AG, Jonsson TJ, Faulkner MJ, Boyd D, Beckwith J, Poole LB: Mutant AhpC peroxiredoxins suppress thiol-disulfide redox deficiencies and acquire deglutathionylating activity. *Mol Cell* **2008**, 29:36-45.
-

214. Beckwith J: What lies beyond uranus? Preconceptions, ignorance, serendipity and suppressors in the search for biology's secrets. *Genetics* **2007**, 176:733-740.
 215. Hochmuth T, Piel J: Polyketide synthases of bacterial symbionts in sponges--evolution-based applications in natural products research. *Phytochemistry* **2009**, 70:1841-1849.
 216. Baneyx F: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **1999**, 10:411-421.
 217. Baneyx F, Ayling A, Palumbo T, Thomas D, Georgiou G: Optimization of growth conditions for the production of proteolytically-sensitive proteins in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **1991**, 36:14-20.
 218. Baneyx F, Georgiou G: Construction and characterization of *Escherichia coli* strains deficient in multiple secreted proteases: protease III degrades high-molecular-weight substrates *in vivo*. *J Bacteriol* **1991**, 173:2696-2703.
 219. Baneyx F, Mujacic M: Cold-inducible promoters for heterologous protein expression. *Methods Mol Biol* **2003**, 205:1-18.
 220. Baneyx F, Mujacic M: Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **2004**, 22:1399-1408.
 221. Baneyx F, Palumbo JL: Improving heterologous protein folding via molecular chaperone and foldase co-expression. *Methods Mol Biol* **2003**, 205:171-197.
 222. Bassuk JA, Braun LP, Motamed K, Baneyx F, Sage EH: Renaturation of SPARC expressed in *Escherichia coli* requires isomerization of disulfide bonds for recovery of biological activity. *Int J Biochem Cell Biol* **1996**, 28:1031-1043.
 223. Mujacic M, Cooper KW, Baneyx F: Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene* **1999**, 238:325-332.
 224. Sorensen HP, Mortensen KK: Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **2005**, 115:113-128.
 225. Thomas JG, Baneyx F: Influence of a global deregulation of the heat-shock response on the expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Ann N Y Acad Sci* **1996**, 782:478-485.
 226. Vasina JA, Baneyx F: Recombinant protein expression at low temperatures under the transcriptional control of the major *Escherichia coli* cold shock promoter *cspA*. *Appl Environ Microbiol* **1996**, 62:1444-1447.
 227. Vasina JA, Baneyx F: Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* *cspA* and *tac* promoter systems. *Protein Expr Purif* **1997**, 9:211-218.
 228. Wan EW, Baneyx F: TolAIII co-overexpression facilitates the recovery of periplasmic recombinant proteins into the growth medium of *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **1998**, 14:13-22.
 229. Martin J, Horwich AL, Hartl FU: Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperonin Hsp60. *Science* **1992**, 258:995-998.
 230. Martin J, Langer T, Boteva R, Schramel A, Horwich AL, Hartl FU: Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate. *Nature* **1991**, 352:36-42.
 231. Pfanner N: Who chaperones nascent chains in bacteria? *Curr Biol* **1999**, 9:R720-724.
 232. de Marco A: Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Nat Protoc* **2007**, 2:2632-2639.
 233. Szabo A, Langer T, Schroder H, Flanagan J, Bukau B, Hartl FU: The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91:10345-10349.
 234. Dessauer CW, Bartlett SG: Identification of a chaperonin binding site in a chloroplast precursor protein. *J Biol Chem* **1994**, 269:19766-19776.
 235. Nam SH, Walsh MK: Affinity purification and characterization of the *Escherichia coli* molecular chaperones. *Protein Expr Purif* **2002**, 24:282-291.
-

236. Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU: Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **1992**, 356:683-689.
237. Palleros DR, Reid KL, Shi L, Welch WJ, Fink AL: ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K⁺ but not ATP hydrolysis. *Nature* **1993**, 365:664-666.
238. Barbe V, Vallenet D, Fonknechten N, Kreimeyer A, Oztas S, Labarre L, Cruveiller S, Robert C, Duprat S, Wincker P, Ornston LN, Weissenbach J, Marliere P, Cohen GN, Medigue C: Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res* **2004**, 32:5766-5779.
239. Carlson CA, Pierson LS, Rosen JJ, Ingraham JL: *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. *J Bacteriol* **1983**, 153:93-99.
240. Kok RG, Young DM, Ornston LN: Phenotypic expression of PCR-generated random mutations in a *Pseudomonas putida* gene after its introduction into an *Acinetobacter* chromosome by natural transformation. *Appl Environ Microbiol* **1999**, 65:1675-1680.
241. Sikorski J, Graupner S, Lorenz MG, Wackernagel W: Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in a non-sterile soil. *Microbiology* **1998**, 144 (Pt 2):569-576.
242. Young DM, Kok RG, Ornston LN: Phenotypic expression of polymerase chain reaction-generated random mutations in a foreign gene after its introduction into an *Acinetobacter* chromosome by natural transformation. *Methods Mol Biol* **2002**, 182:103-115.
243. Melnikov A, Youngman PJ: Random mutagenesis by recombinational capture of PCR products in *Bacillus subtilis* and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Nucleic Acids Res* **1999**, 27:1056-1062.
244. He J: Laborjournal. pp. 1-120. Bonn: Universität Bonn; 2005-2007:1-120.
245. Gust B, Chandra G, Jakimowicz D, Yuqing T, Bruton CJ, Chater KF: Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Adv Appl Microbiol* **2004**, 54:107-128.
246. Gust B, Kieser T, Chater KF: *REDIRECT technology: PCR-targeting system in Streptomyces coelicolor*; John Innes Centre: Norwich. **2002**:1-42.
247. Datsenko KA, Wanner BL: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97:6640-6645.
248. Landy M, Warren GH, et al.: Bacillomycin; an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proc Soc Exp Biol Med* **1948**, 67:539-541.
249. Moldenhauer J, Chen XH, 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* **2007**, 46:8195-8197.
250. Mantle PG, Macegeorge KM: The role of monic acid A in pseudomonic acid A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Microbiol Biotechnol* **1990**, 33:709-711.
251. Rangaswamy V, Jiralerspong S, Parry R, Bender CL: Biosynthesis of the *Pseudomonas* polyketide coronafacic acid requires monofunctional and multifunctional polyketide synthase proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, 95:15469-15474.
252. Internetquelle: gcu.schoedl.de/ (am 20.11.2009)
253. Sharp PM, Li WH: The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* **1987**, 15:1281-1295.
254. Zdanovsky AG, Zdanovskaia MV: Simple and efficient method for heterologous expression of clostridial proteins. *Appl Environ Microbiol* **2000**, 66:3166-3173.
255. Menzella HG, Reid R, Carney JR, Chandran SS, Reisinger SJ, Patel KG, Hopwood DA, Santi DV: Combinatorial polyketide biosynthesis by *de novo* design and rearrangement of modular polyketide synthase genes. *Nat Biotechnol* **2005**, 23:1171-1176.
256. Menzella HG, Reisinger SJ, Welch M, Kealey JT, Kennedy J, Reid R, Tran CQ, Santi DV: Redesign, synthesis and functional expression of the 6-deoxyerythronolide B polyketide synthase gene cluster. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2006**, 33:22-28.
257. Mutka SC, Carney JR, Liu Y, Kennedy J: Heterologous production of epothilone C and D in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **2006**, 45:1321-1330.
-

258. MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, MacNeil T: Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **1992**, 111:61-68.
259. Taylor RG, Walker DC, McInnes RR: *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* **1993**, 21:1677-1678.
260. Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF: PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100:1541-1546.
261. Vaneechoutte M, Young DM, Ornston LN, De Baere T, Nemeč A, Van Der Reijden T, Carr E, Tjernberg I, Dijkshoorn L: Naturally transformable *Acinetobacter* sp. strain ADP1 belongs to the newly described species *Acinetobacter baylyi*. *Appl Environ Microbiol* **2006**, 72:932-936.
262. Rosselló RA, García-Valdés E, Lalucat J, Ursing J: Genotypic and phenotypic diversity of *Pseudomonas stutzeri*. *Syst Appl Microbiol* **1991**, 14:150-157.
263. Berndt C, Meier P, Wackernagel W: DNA restriction is a barrier to natural transformation in *Pseudomonas stutzeri* JM300. *Microbiology* **2003**, 149:895-901.
264. Lacey J: Nomenclature of *Saccharopolyspora erythraea* Labeda 1987 and *Streptomyces erythraeus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948, and Proposals for the Alternative Epithet *Streptomyces labedae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **1987**, 37:458.
265. Sambrook J, Russell DW: Molecular cloning : a laboratory manual. 3rd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; **2001**.
266. Bertani G: Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **1951**, 62:293-300.
267. Yamamoto H, Maurer KH, Hutchinson CR: Transformation of *Streptomyces erythraeus*. *J Antibiot (Tokyo)* **1986**, 39:1304-1313.
268. Niederkrüger H: Produktivitätssteigerung durch einen zusätzlichen Sauerstoffeintrag mittels Wasserstoffperoxid bei der Kultivierung von Mikroorganismen. *Diplomarbeit*. Universität Bielefeld, Technische Fakultät; **2005**.
269. Tartoff KD, Hobbs CA: Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res Labs Focus* **1987**, 9:12.
270. Hanahan D: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **1983**, 166:557-580.
271. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE: Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res* **1990**, 18:6409-6412.
272. Baldino F, Jr., Chesselet MF, Lewis ME: High-resolution *in situ* hybridization histochemistry. *Methods Enzymol* **1989**, 168:761-777.
273. Mülhardt C: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Heidelberg: Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag; **2003**.
274. Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS: Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res* **1991**, 19:1154.
275. Internetquelle: tools.neb.com/NEBcutter2/ (am 05.11.2009)
276. Yin J, Lin AJ, Golan DE, Walsh CT: Site-specific protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase. *Nat Protoc* **2006**, 1:280-285.
277. Zor T, Selinger Z: Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* **1996**, 236:302-308.
278. Han L, Lobo S, Reynolds KA: Characterization of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from *Streptomyces glaucescens* and its role in initiation of fatty acid biosynthesis. *J Bacteriol* **1998**, 180:4481-4486.
279. Smith FE, Herbert J, Gaudin J, Hennessy DJ, Reid GR: Serum iron determination using ferene triazine. *Clin Biochem* **1984**, 17:306-310.
-

9 Anhang

9.1 Plasmidkarten

9.1.1 Plasmide zur Lagerung und Sequenzierung

Die folgenden Plasmidkarten zeigen die verwendeten Vektoren zur Lagerung und Sequenzierung von PCR-Fragmenten. Die Beschreibung der jeweiligen Vektoren erfolgen unter 6.1.2.

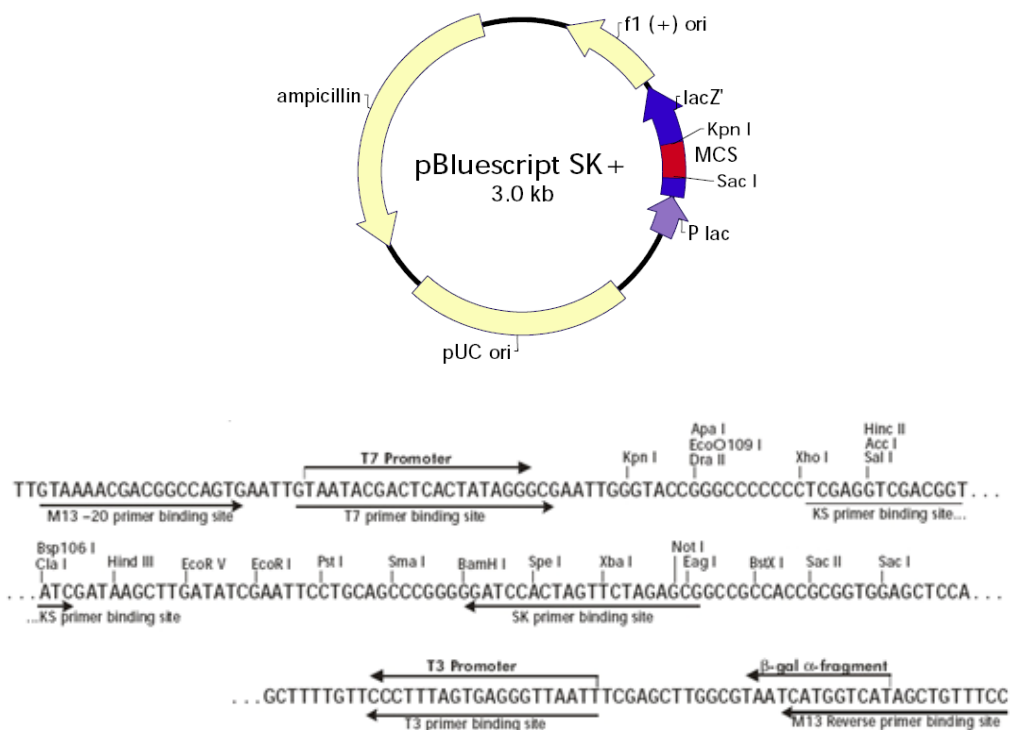


Abb. 9-1: Plasmidkarte und MCS von pBluescript SK(+).

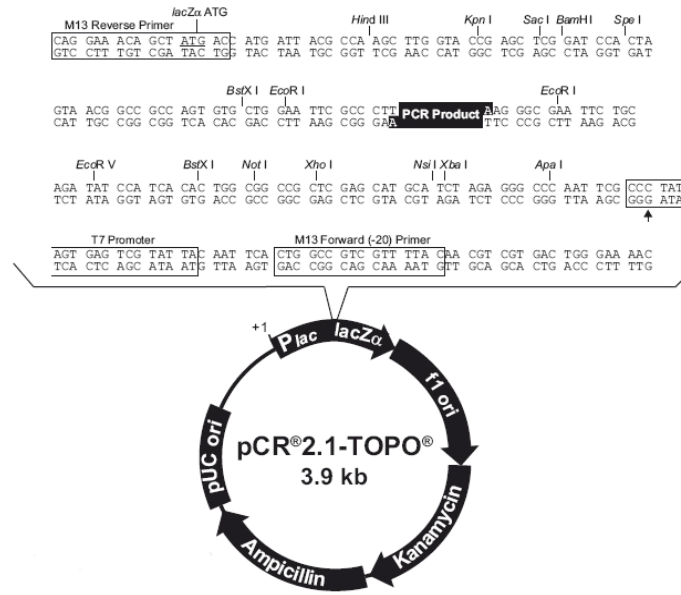


Abb. 9-2: Plasmidkarte und MCS von PCR2.1-Topo.

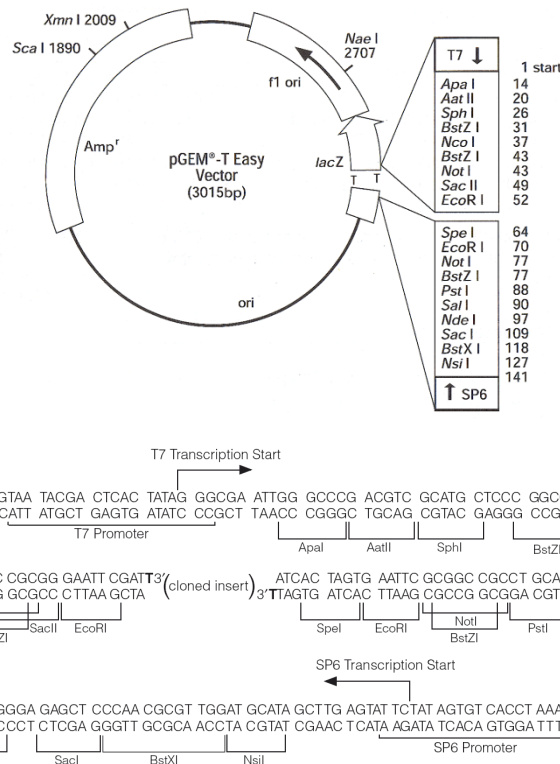


Abb. 9-3: Plasmidkarte mit MCS von pGEM-T Easy.

9.1.2 Vektoren zur Proteinexpression

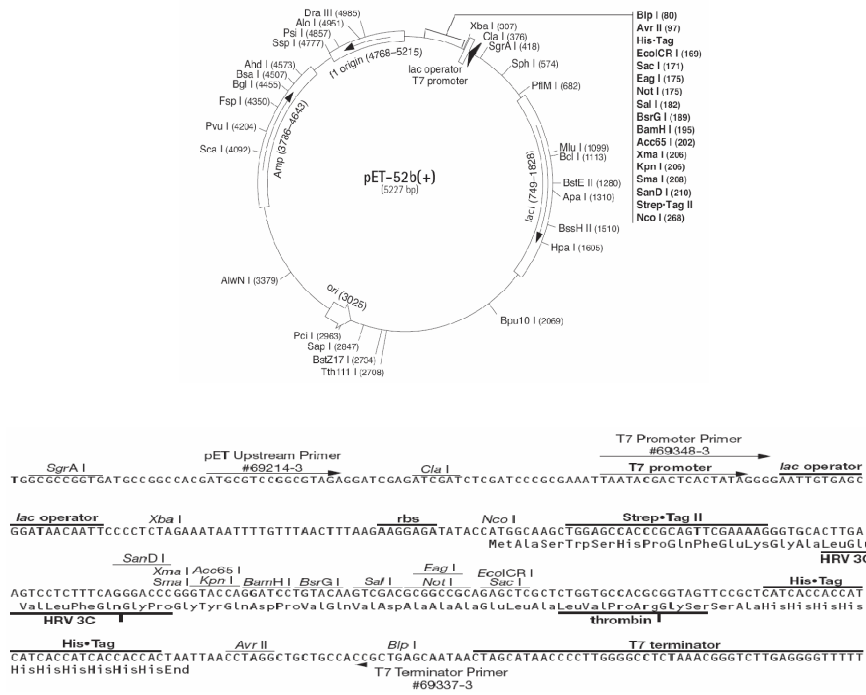


Abb. 9-4: Plasmidkarte und MCS von pET-52b(+).

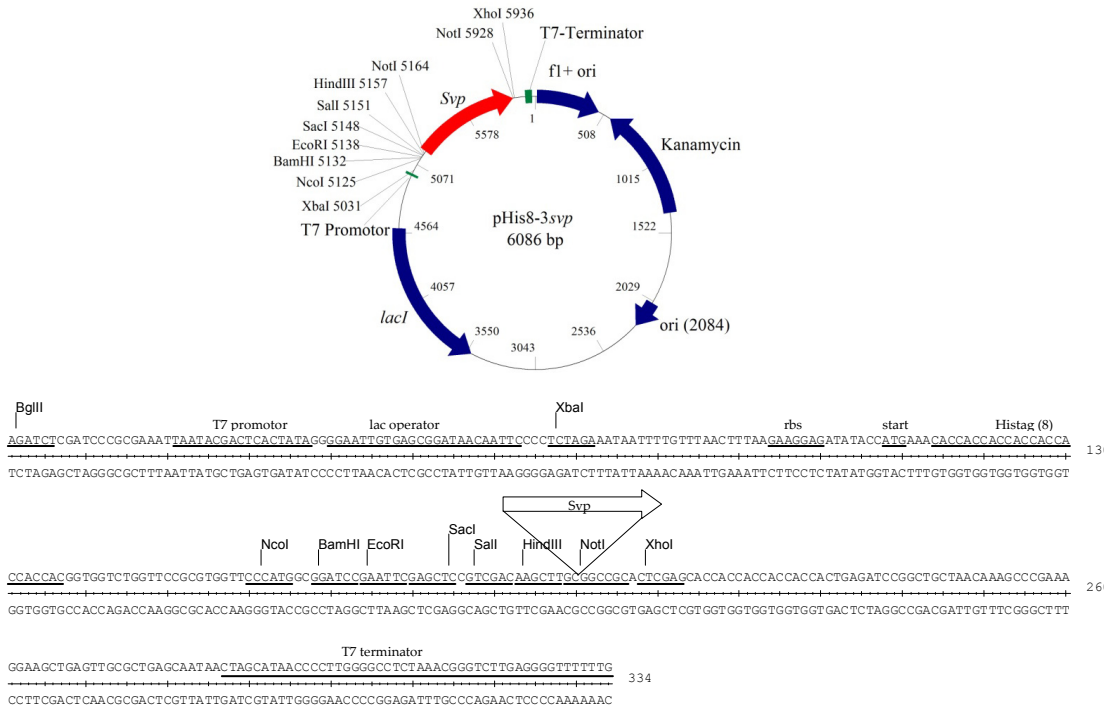
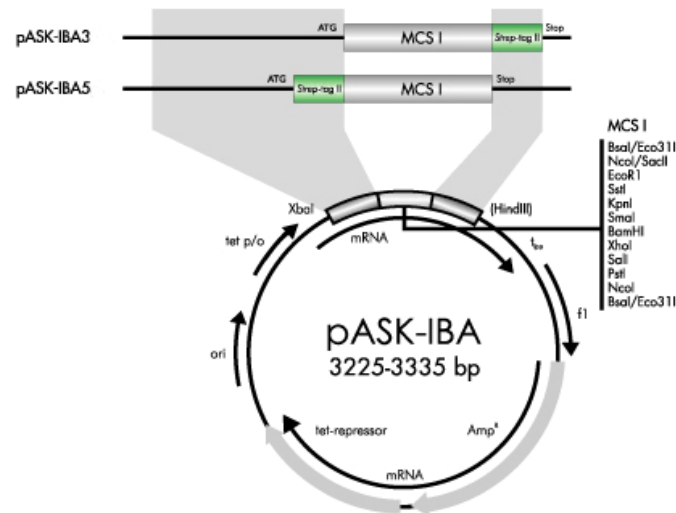


Abb. 9-5: Plasmidkarte und MCS für den Proteinexpressionsvektor pHis8-syp bzw. pHis8.

Das Gen für die PPTase Syp befindet sich in der NotI-Seite.⁹¹



(A) MCS von pASK-IBA3

```

1      CCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACCTCCCTA 77
                                     forward primer
78      TCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAAAATCTAGAAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATAC 157
                                     XbaI
      M G D R G P E F E L G T R G S L E V D L Q G D H G L
158     AaatgGGAGACCGGTCGCCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCTCGAGGTCGACCTGCAGGGGGACCATGGTCTC 237
      BsaI   BsmFI   SstI   KpnI   BamHI   SalI   PstI   BsmFI   BsaI
      PshAI   EcoRI           SmaI   XhoI           PshAI
      SacII
      link   Strep-tag
      S A W S H P Q F E K *
238     AgcgcTTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATAAAGCTTGACCTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATT 317
      Eco47III                               HindIII
318     TTTTGTCTGCGCTTACCCTACTGCGTACGGATCTCCACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGCT 397
                                     reverse primer
  
```

(B) MCS von pASK-IBA3

```

1      CCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACCTCCCTATC 79
                                     forward primer
80      AGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAAAATCTAGAAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAA 159
                                     XbaI
      D R G P E F E L G T R G S
      Strep-tag   link   R P R S R I R A R Y P G I
      M A S W S H P Q F E K   G A   E T A V P N S S S V P G D P
160     ATGGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAAGcgcCGAGACCCGCTCCCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCC 239
      NheI           BbeI   BsaI   BsmFI   SstI   KpnI   BamHI
      EheI           KasI   PshAI   EcoRI           SmaI   XhoI
      NarI           SacII
      L E V D L Q G D H G L *
      P R G R P A G G P W S L I S N *
      S R S T C R G T M V S D I *
240     CTCGAGTCGACCTGCAGGGGGACCATGGTCTCTgataTCTAAGCTTGACCTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATT 319
      SalI   PstI   BsmFI   BsaI   EcoRV   HindIII
      PshAI
      NcoI
320     GTGCGACATTTTTTTTGTCTGCGCTTACCCTACTGCGTACGGATCTCCACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAAGCGCG 399
                                     reverse primer
  
```

Abb. 9-6: Plasmidkarte und MCS für den Proteinexpressionsvektor pASK-IBA3 bzw. pASK-IBA5.

(A) MCS des Vektors pASK-IBA3 (B) MCS des Expressionsvektors pASK-IBA5.

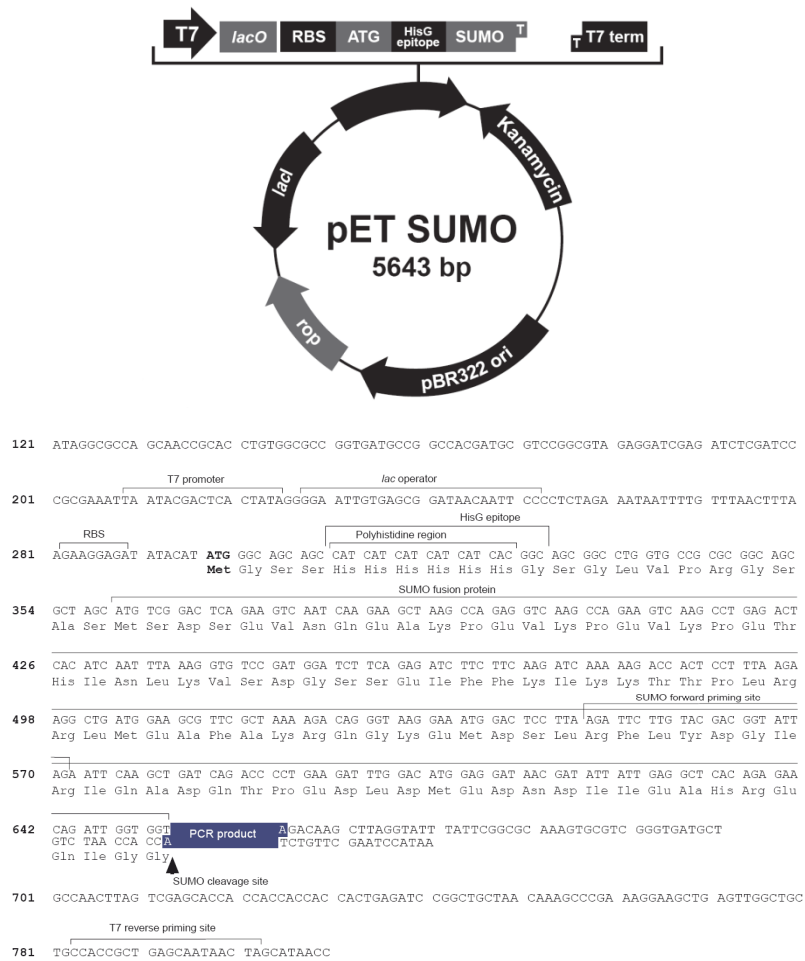


Abb. 9-7: Plasmidkarte und MCS für den Proteinexpressionsvektor pET SUMO.

9.1.3 Plasmide zur Co-Expression von Chaperonen

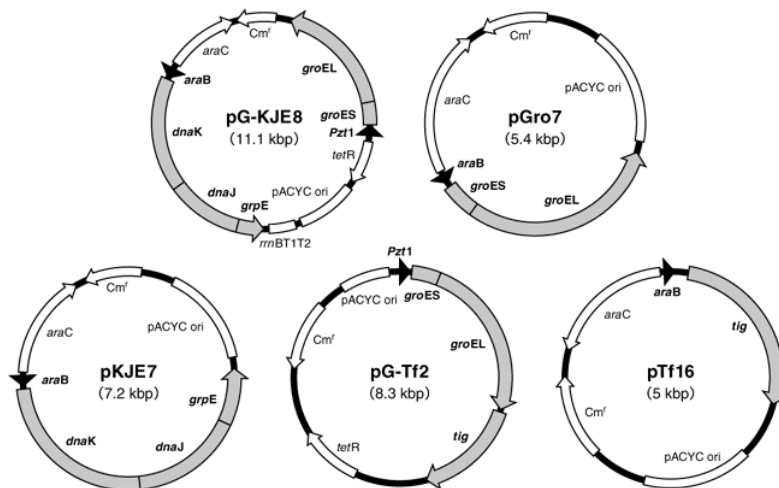


Abb. 9-8: Übersicht über die Plasmide zur Co-Expression verschiedener Chaperone.^{115,116}

Die einzelnen Plasmide tragen, in grau dargestellt, die verschiedenen Chaperone, den pACYC ori zur Replikation sowie eine Chloramphenicol Resistenz (Cm^r). Im Falle der Plasmide pGro7, pTf16 und pKJE7 wird das Arabinose induzierbare *araC/araB*-System zur Induktion der Chaperone verwendet. Die Chaperone des Plasmid pG-Tf2 erfolgte durch den Tetracycline induzierbaren Promoter Pzt1. Die Regulation der Chaperone von pG-KJE7 erfolgte teils durch das *araC/araB*-System und teils durch den Promoter Pzt1.

9.2 Massenspektren

9.2.1 MALDI-TOF-TOF-MS Spektren der Messungen von PedI3 und dessen Linkerfusionsprodukten in der *apo*- und *holo*-Form

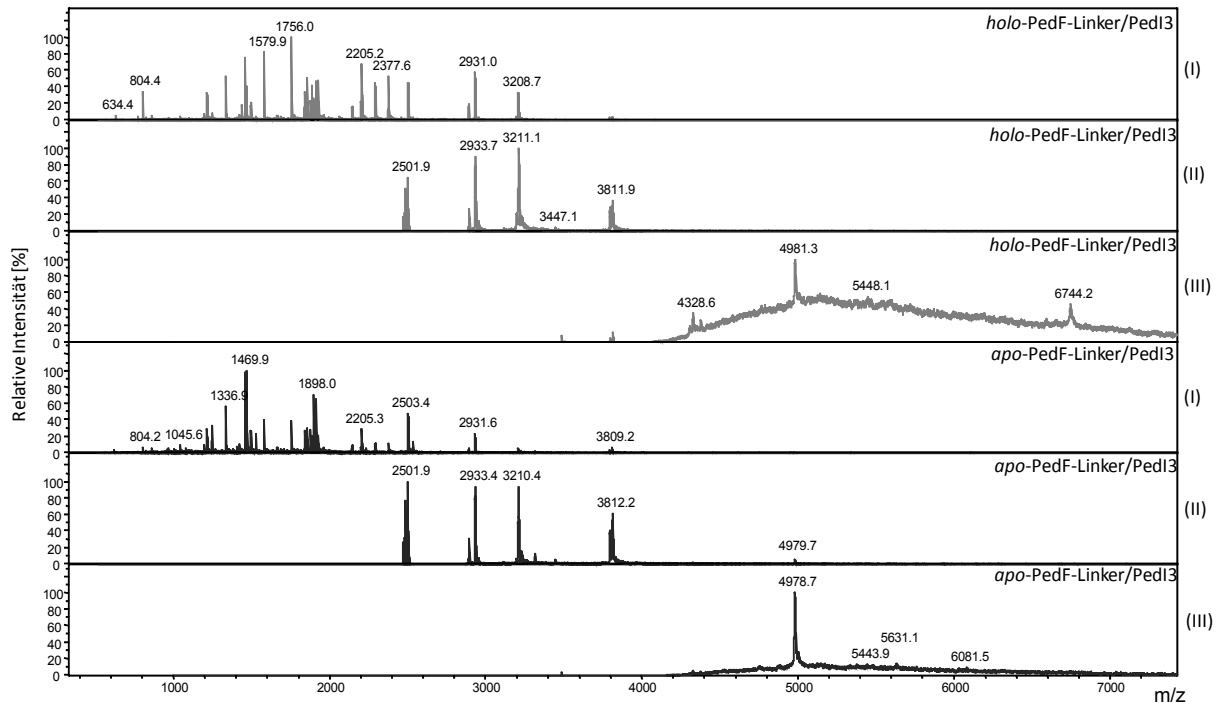


Abb. 9-9: Massenspektren der MALDI-TOF-TOF-MS Messungen von *holo*-PedF-Linker/PedI3 und *apo*-PedF-Linker/PedI3 bei verschiedenen Laserintensitäten (I - III), Matrix: HCCA.

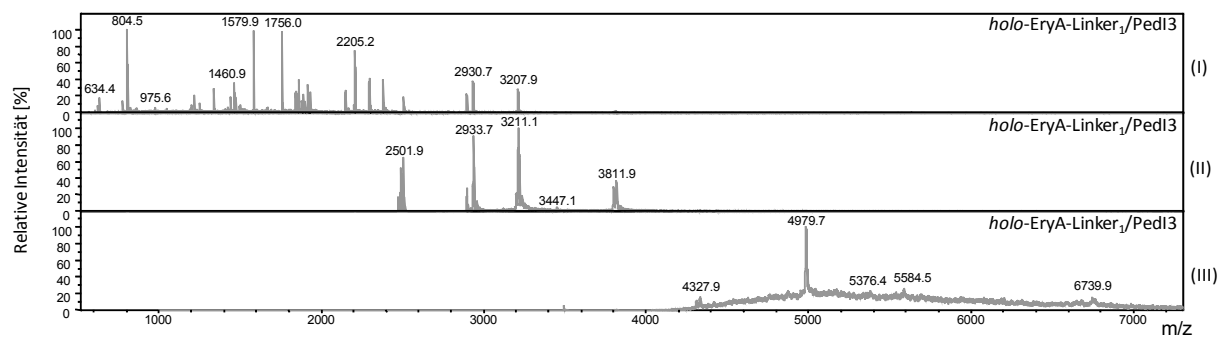


Abb. 9-10: Massenspektren der MALDI-TOF-TOF-MS Messungen von *holo*-EryA-Linker₁/PedI3 bei verschiedenen Laserintensitäten (I - III), Matrix: HCCA.

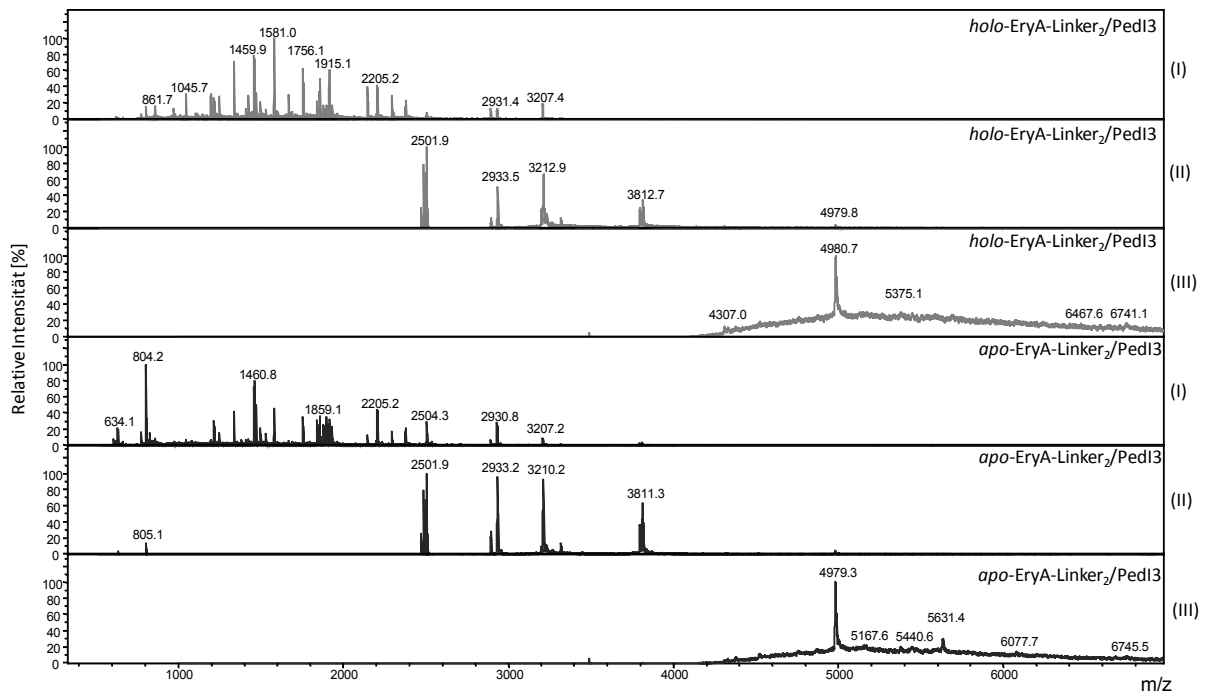


Abb. 9-11: Massenspektren der MALDI-TOF-TOF-MS Messungen von *holo*-EryA-Linker₂/PedI3 und *apo*-EryA-Linker₂/PedI3 bei verschiedenen Laserintensitäten (I - III). Matrix: HCCA.

9.3 FPLC-Läufe zur Trennung von Zielprotein und Chaperone

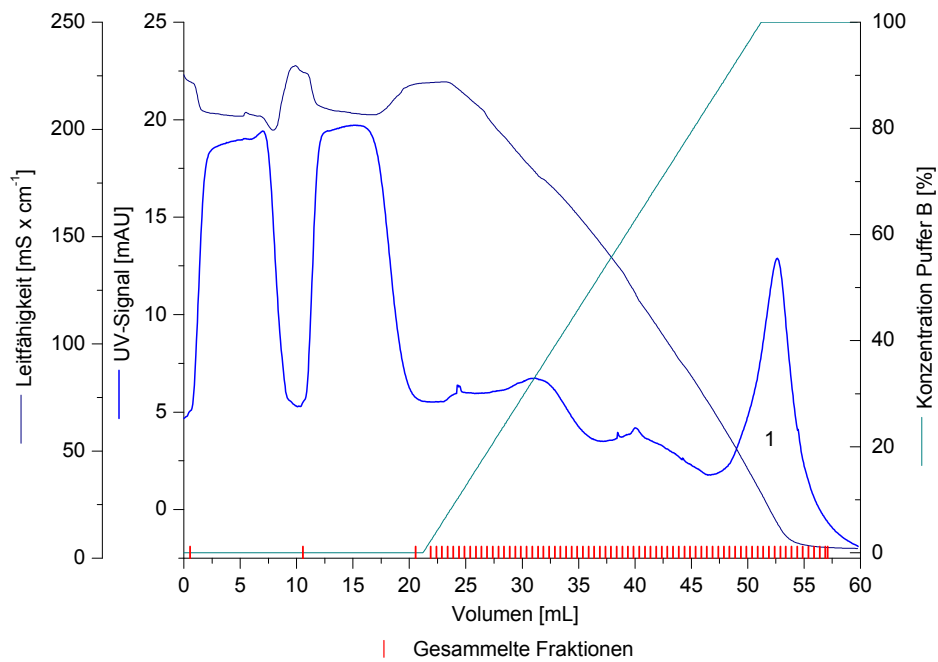


Abb. 9-12: Chromatogramm der HIC-Chromatographie (Säule: Octyl-Sepharose).

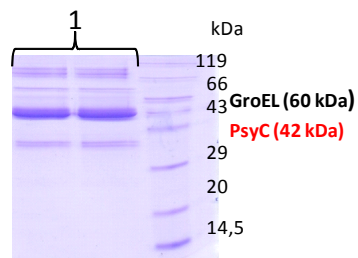


Abb. 9-13: SDS-PAGE der HIC-Chromatographie aus Abb. 9-12.

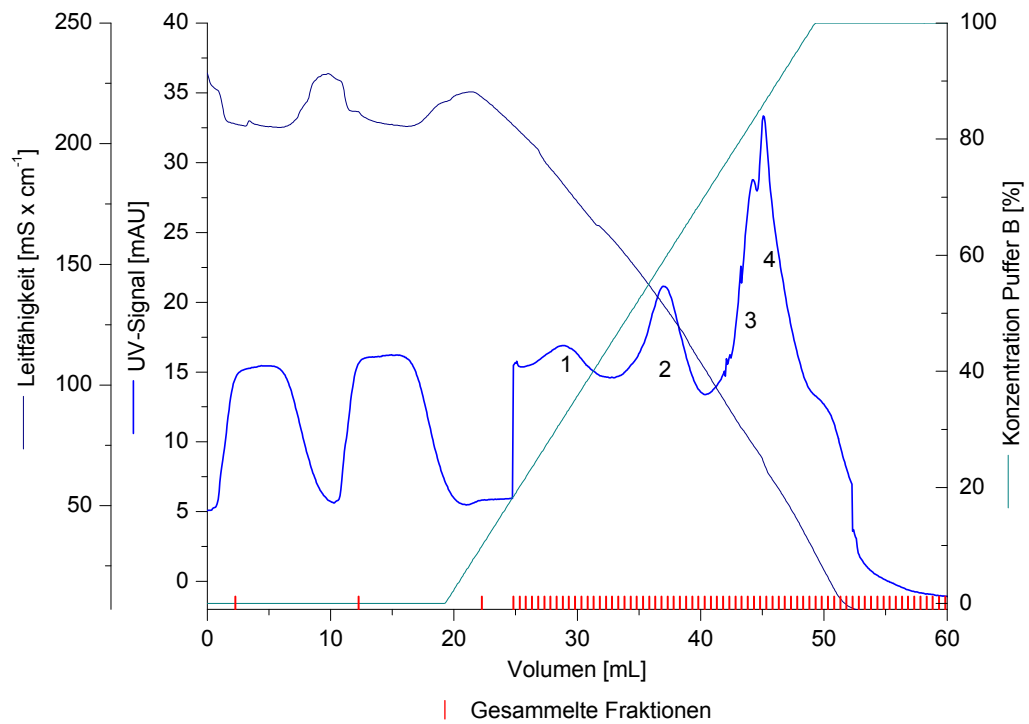


Abb. 9-14: Chromatogramm der HIC-Chromatographie (Säule: Butyl-Sepharose).

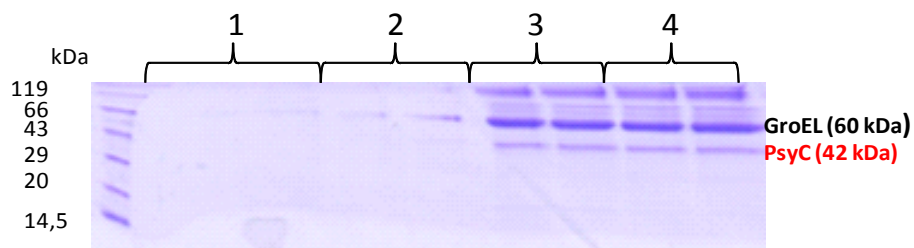


Abb. 9-15: SDS-PAGE der HIC-Chromatographie aus Abb. 9-14.

9.4 Alignment von PsyC

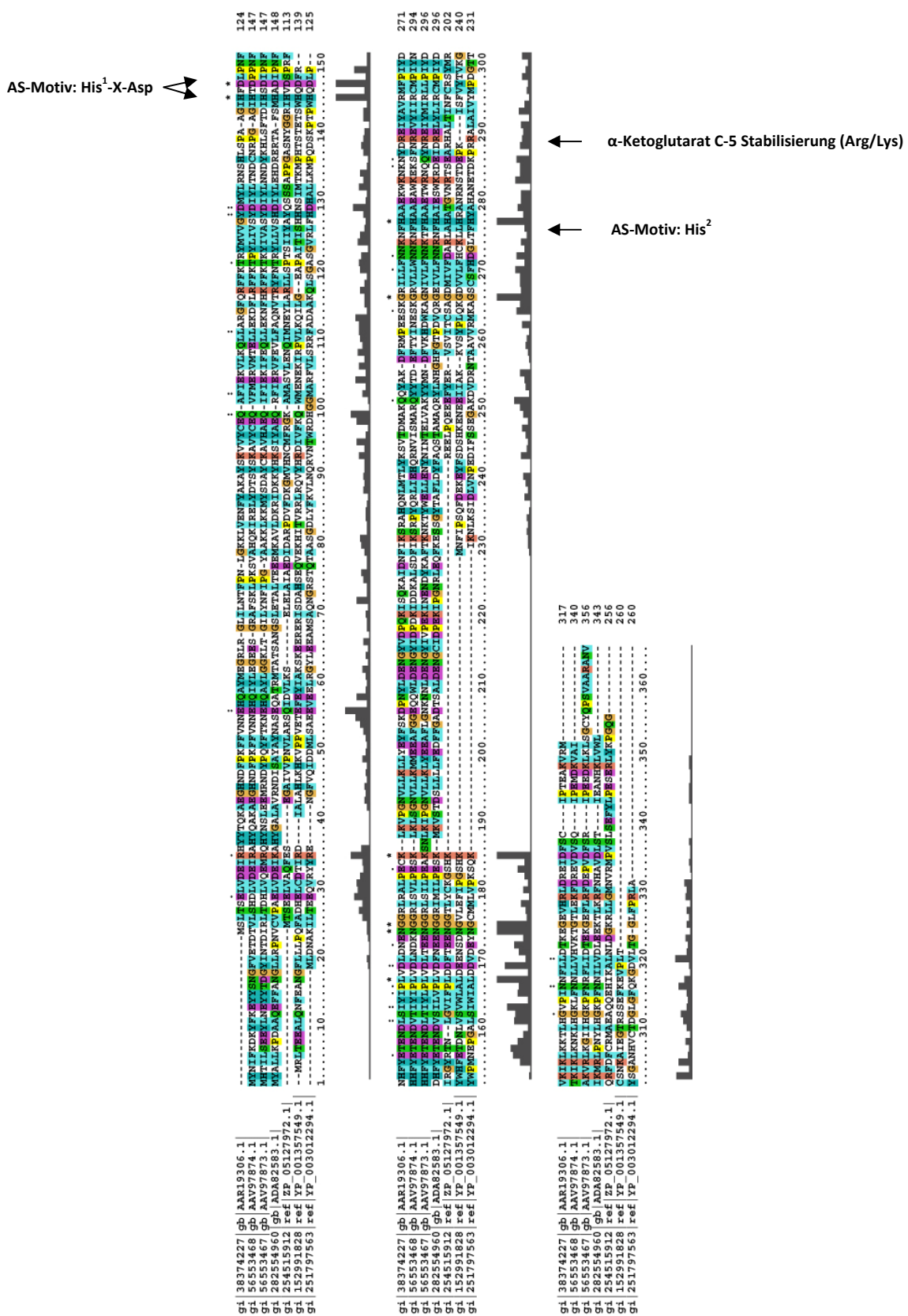


Abb. 9-16: Alignment der hypothetischen α-Hydroxylasen.

PsyC (GI:38374227), PedK (GI:56553468), OnnE (GI:56553467), OnnF (GI:282554960); Phytanoyl-CoA Dioxygenasen von *Paenibacillus sp. JDR-2* (GI:254515912), *gamma-Proteobacterium NOR5-3* (GI:152991828) und *Sulfuворum sp. NBC37-1* (GI:251797563).

10 Publikationen

Veröffentlichungen

Hochmuth T, Niederkrüger H, Gernert C, Siegel A, Taudien S, Platzer M, Crews P, Hentschel U, Piel J:
Linking symbiont and metabolic diversity in marine sponges: possible role for Poribacteria as
producers of methyl-branched fatty acids. (in Vorbereitung)

Vorträge

11/2005 H. Niederkrüger, J. Piel
Titel: Analyse neuartiger Templatmechanismen der Pederin -Polyketidsynthase
Doktorandenworkshop
Tagungszentrum Schleiden/Eifel, 03./04. November 2005

Poster

11/2005 J. Moldenhauer, H. Niederkrüger, K. Zimmermann, J. He, J. Piel
Titel: Erzeugung neuartiger Polyketide durch maßgeschneiderte Proteintemplate
Doktorandenworkshop
Tagungszentrum Schleiden/Eifel, 03./04. November 2005

10/2006 H. Niederkrüger, J. Moldenhauer, K. Zimmermann, J. He, J. Piel.
Titel: Generation of novel polyketides by customised protein templates
International Symposium "Complex Molecular Architectures on Surfaces"
Gustav Stresemann Institut, Bonn, 12. Oktober 2006

09/2007 H. Niederkrüger, J. Moldenhauer, K. Zimmermann, J. He, J. Piel
Titel: Generation of novel polyketides by customised protein templates
International Symposium "Templates in Chemistry and Beyond"
Hotel Maritim, Bonn, 13./14. September 2007

10/2008 H. Niederkrüger, K. Zimmermann, J. Piel.
Titel: Templat - integrierte und nichtintegrierte Polyketidenzyme -Schlüssel zum
Verständnis interessanter Biosynthesewege
Doktorandenworkshop
Seminaris Bad Honnef, 09./10. Oktober 2008

01/2009 J. Moldenhauer, H. Niederkrüger, K. Zimmermann, J. Piel.
Titel: Erzeugung neuartiger Polyketide durch maßgeschneiderte Proteintemplate
Begutachtung SFB 624
Bonn, 27./28. Januar 2009

11 Lebenslauf

Lebenslauf entsprechend den Regularien für die elektronische Veröffentlichung der Dissertation der
ULB Bonn gelöscht.

12 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.

Bonn, 26.07.2010

Holger Niederkrüger
