

Enzymatische und Chemische Studien zu *trans*-AT-Polyketidsynthesen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Annette Kampa

aus Oppeln

Bonn, 2013

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

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jörn Piel
2. Prof. Dr. Uwe Deppenmeier
3. Prof. Dr. Hans-Georg Sahl
4. Prof. Dr. Peter Dörmann

Tag der Promotion: 02.06.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Jörn Piel, der mir dieses spannende Dissertationsthema anvertraut hat. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Bereitschaft jederzeit Fragen zu beantworten und unterstützende Ratschläge zu geben.

Prof. Uwe Deppenmeier, Prof. Hans-Georg Sahl und Prof. Peter Dörmann danke ich für die Übernahme der weiteren Gutachten dieser Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Sonderforschungsbereich SFB624.

Ganz großer Dank geht auch an Dr. Tobias Gulder, der besonders nach dem Umzug der Arbeitsgruppe nach Zürich ein sehr hilfsbereiter "Ersatzdoktorvater" war und sich überdem die Zeit genommen hat diese Arbeit zu korregieren. Für Letzteres danke ich auch Ursula Steffens, Dr. Brandon Morinaka, Dr. Stephan Labsch und Dr. Nina Kausch.

Für unzählige HPLC-Messungen der verschiedensten Härtegrade und für viele hilfreiche Tips danke ich Andreas Schneider. Für die vielen MS-Messungen danke ich Dr. Marianne Engeser und ihrem Analytik-Team. Ebenfalls danke ich Dr. Roberta Teta der Arbeitsgruppe von Prof. Alfonso Mangoni aus Neapel, sowie Dr. Cristina Daolio und Dr. Markus Godejohann der Firma Bruker in Rheinstetten für die Messung von NMR-Proben.

Für die Zurverfügungstellung ihres Biofermenters danke ich Prof. Gabriele König und in diesem Zusammenhang auch Prof. Harald Gross für seine Tips zur Cyanobakterienkultivierung.

Ganz großer Dank geht auch an Prof. Neil Oldham der Universität Nottingham, für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die in vielerlei Hinsicht sehr lehrreiche Zeit (sowohl MS-, als auch Englischkenntnisse betreffend). Besonderer Dank geht dabei an Matthew Jenner für die Zusammenarbeit an unserem gemeinsamen KS-Projekt. Darüber hinaus danke ich ihm, aber auch Dr. José Afonso, Dr. Kleitos Sokratous, Richard Elms und einigen anderen Leuten aus dem Biochemieinstitut für eine sehr lustige Zeit, die ich bestimmt nie vergessen werde.

Weiterer Dank gilt Prof. Ólafur Andrésón und Andrey Gagunashvili von der Universität Reykjavík für die Zusammenarbeit beim Nosperinprojekt.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. Cristian Gurgui und Dr. Brandon Morinaka, die mir beide bei sehr vielen Problemstellungen im Labor geholfen haben.

Danksagung

Dr. Mihaela Gurgui gilt mein Dank für die Toxizitätsmessungen.

Mein Dank geht auch an alle Mitarbeiter der beiden Arbeitskreise Piel und Gulder für ein sehr gutes Arbeitsklima und auch für die vielen netten Aktivitäten außerhalb des Labors.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Lieblingskollegin Ursel (Ursula Steffens) für ihre Unterstützung (nicht nur in Schokoladenform) und ihre Freundschaft.

Fritzi Schäfers, Brandon Morinaka, Max Crüsemann, René Richarz, Frank Eggert, Xiaofeng Cai, Reiko Ueoka, Cristian Gurgui, Christoph Kohlhaas und Michael Freeman danke ich für sehr viele schöne Erlebnisse auch außerhalb des Labors.

Auch Herrn Roland Fuchs gilt mein Dank, der dafür gesorgt hat, dass neben meinem naturwissenschaftlichen Wissen auch meine literarische und kulturelle Bildung nicht zu kurz kommt.

Natürlich danke ich auch meiner Familie und meinen Freunden ganz besonders, die mich während der ganzen Zeit immer unterstützt haben. Ohne Euch, wäre alles nichts!

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
1. Abbildungsverzeichnis	5
2. Tabellenverzeichnis	8
3. Abkürzungsverzeichnis	10
4. Zusammenfassung	14
5. Abstract	17
6. Einleitung.....	21
6.1 Polyketide	21
6.2 Biosynthese von Polyketiden.....	23
6.3 Typen der Polyketidsynthasen	26
6.4 <i>Trans</i> -AT-PKS.....	28
6.5 PKS/NRPS-Hybride.....	32
6.6 Polyketide aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	34
6.6.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	34
6.6.2 Bacillaen	36
6.6.3 Bacillaenbiosynthese.....	37
6.7 Pederin und verwandte Substanzen	40
6.8 Cyanobakterien	43
6.9 Genome mining	46
7. Zielsetzung	49
8. Ergebnisse und Diskussion.....	51
8.1 Teil I: Charakterisierung eines neuen Naturstoffs der Pederinfamilie.....	51
8.1.1 Entdeckung von <i>trans</i> -AT-PKS-Genen im Metagenom der Flechte <i>Peltigera membranacea</i>	51
8.1.2 Strukturvorhersage.....	53
8.1.3 Isolation des vorausgesagten Polyketids.....	57
8.1.4 NMR- und MS-Analyse des Nosperins	63

8.1.5	Verbreitung des <i>nsp</i> -Locus in Cyanobakterien	72
8.1.6	Toxizitätstest.....	74
8.1.7	Zusammenfassende Diskussion.....	76
8.2	Teil II: KS-Spezifität von <i>trans</i> -AT-PKS-Systemen.....	81
8.2.1	KS-Spezifitätstest <i>in vivo</i>	81
8.2.2	Generierung einer Deletionsmutante.....	83
8.2.3	Fermentation und Fütterungsexperimente <i>in vivo</i>	88
8.2.4	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	92
8.2.5	Aufnahme der SNAC-Intermediate in die Zelle	94
8.2.6	<i>In vitro</i> -Studien zur KS-Substratspezifität	95
8.2.7	Klonierung der KS-Sequenzen in einen <i>E. coli</i> Expressionsstamm	96
8.2.8	KS-Expression	99
8.2.9	<i>In vitro</i> -Umsetzung der SNAC-Derivate.....	102
8.2.10	<i>In vitro</i> -Assays zur Substratspezifitätsanalyse der KS1	103
8.2.11	<i>In vitro</i> -Assays zur Substratspezifitätsanalyse der KS2.....	107
8.2.12	<i>In vitro</i> -Assays zur Substratspezifitätsanalyse der KS4	109
8.2.13	<i>In vitro</i> -Assays zur Substratspezifitätsanalyse der KS5.....	110
8.2.14	<i>In vitro</i> -Assays zur Substratspezifitätsanalyse der KS6.....	113
8.2.15	Neuklonierung der KS4 und KS6 in einen <i>E. coli</i> Expressionsstamm	115
8.2.16	Zusammenfassung und Ausblick.....	117
9.	Material und Methoden	121
9.1	Verwendete Primer.....	121
9.2	Verwendete Vektoren und Organismen.....	123
9.2.1	Vektoren.....	123
9.2.2	Organismen	124
9.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	124
9.3.1	Standard-PCR.....	124
9.3.2	Kolonie-PCR	126
9.3.3	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	126
9.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	127

9.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	128
9.6	TA-Klonierung von PCR-Fragmenten.....	128
9.7	Ligation von PCR-Produkten mit einem TA-Vektor.....	129
9.8	Sequenzierung.....	130
9.9	Transformation.....	130
9.9.1	Herstellung elektrokompetenter Zellen.....	130
9.9.2	Transformation in elektrokompetente <i>E. coli</i> Zellen.....	131
9.9.3	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	131
9.9.4	Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> Zellen.....	132
9.9.5	Transformation in <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	133
9.10	Blau-Weiß-Selektion.....	135
9.11	Minipräparation von Plasmiden.....	136
9.12	Restriktionsverdau.....	137
9.13	Bakterienkultivierung.....	137
9.13.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	137
9.13.2	Kultivierung von <i>Bacillus</i>	138
9.13.3	Kultivierung von <i>Nostoc</i>	139
9.13.4	Kryokulturen.....	139
9.14	Isolierung genomischer DNA von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	139
9.15	Isolierung von mRNA.....	140
9.16	Extraktions- und Analysemethoden.....	140
9.16.1	Extraktion von Bacillaen.....	140
9.16.2	Extraktion von Nosperin.....	141
9.16.3	HPLC-Analyse der Fermentationsprodukte von <i>Bacillus</i>	142
9.16.4	Analyse der Fraktionen des Flechtenextrakts.....	143
9.16.5	HPLC-SPE-NMR der <i>Nostoc</i> -Extrakte.....	143
9.17	Zytotoxizitätstest.....	144
9.18	Proteine.....	145
9.18.1	Proteinexpression.....	145
9.18.2	Zellaufschluss mittels Sonifikation.....	145

9.18.3	Proteinaufreinigung	146
9.18.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	147
9.18.5	Comassie-Färbung.....	149
9.18.6	Proteinaufkonzentrierung und Konzentrationsbestimmung.....	150
9.18.7	Acylierung der KS-Domänen.....	150
9.18.8	Vorbereitung der KS-Proben für die MS-Analyse	150
9.18.9	Massenspektrometrische Analyse der KS-Proben.....	151
9.19	Medien, Chemikalien und Geräte.....	151
9.19.1.	Medien	151
9.19.2	Verwendete Chemikalien	153
9.19.3	Geräte und Materialien.....	156
10.	Literatur	160
11.	Anhang.....	173
12.	Publikationen	181
13.	Selbstständigkeitserklärung	183

1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Beispiele medizinisch relevanter Polyketide	22
Abb. 2: Auswahl an verschiedenen Starter- und Elongationseinheiten	23
Abb. 3: A Struktur von Coenzym A (15). B Aktivierung der <i>apo</i> -ACP zur <i>holo</i> -ACP	25
Abb. 4: Kettenelongation der Polyketide	25
Abb. 5: Optionale Kettenverlängerung	26
Abb. 6: ECO-02301 (16) aus <i>Streptomyces aizunensis</i>	27
Abb. 7: <i>cis</i> -AT-PKS und <i>trans</i> -AT-PKS	29
Abb. 8: Biosynthese des Pederins (17). ³⁴	29
Abb. 9: Produkte von <i>trans</i> -AT-PKS	30
Abb. 10: Phylogenie der KS-Domänen von <i>cis</i> -AT-PKS. ³⁷	31
Abb. 11: Phylogenie der <i>trans</i> -AT PKS	32
Abb. 12: Beispiele für PKS/NRPS-Hybrid-Produkte	33
Abb. 13: Von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> produzierte Polyketide	35
Abb. 14: Bacillaen-Gencluster von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	37
Abb. 15: Biosyntheseweg des Bacillaens.	38
Abb. 16: Formation einer Bacillaen β -Kohlenstoffverzweigung.	39
Abb. 17: <i>Paederus fuscipes</i> (Bildautor: Christoph Benisch - Bildquelle: www.kerbtier.de) ...	40
Abb. 18: Vertreter pederinartiger Polyketide und ihre Quellen	42
Abb. 19: Microcystin aus <i>Microcystis aeruginosa</i>	43
Abb. 20: Vertreter von Polyketiden aus Cyanobakterien	45
Abb. 21: Lobenquerschnitt der Flechte <i>Peltigera membranacea</i>	46
Abb. 22: Verwandtschaft des Nosperin-Genclusters mit den Pederin- und Onnamid-Genclustern	52
Abb. 23: Vorhersage des Produktes des <i>nsp</i> -Genclusters aufgrund phylogenetischer Analysen der KS-Domänen und dem Vergleich der Modularchitektur mit ähnlichen Biosynthesewegen.	55
Abb. 24: HPLC-Analyse der mit MeOH extrahierten und anschließend gesäulten polaren Fraktion der Flechte <i>Peltigera membranacea</i>	58
Abb. 25: ¹ H-NMR-Spektrum einer aus der Flechte isolierten Substanz	59
Abb. 26: Beispiel einer ¹³ C-Isotopenmarkierung eines unbekanntes Metaboliten.	61
Abb. 27: ¹ H-NMR-Spektrum des vielversprechenden Kandidaten	62
Abb. 28: ¹³ C-NMR-Spektrum des vielversprechenden Kandidaten	62
Abb. 29: A HPLC-Chromatogram bei 220 nm (blaue Linie) des MeOH-Extrakts einer <i>Nostoc</i> sp. N6 Kultur. B Massenspektrum des Nosperin Peaks bei 30.3 min	63

Abb. 30: Gewählte Nummerierung der Kohlenstoffe und Wasserstoff tragender Heteroatome des Nosperins	64
Abb. 31: Relevante ¹ H- ¹ H COSY- (dick markierte Linien) und HMBC-Korrelationen (Pfeile) des Nosperins (45).	66
Abb. 32: MS/MS Spaltfragmente des Nosperins (45).	67
Abb. 33: Analyse der MS/MS Spaltfragmente des Nosperins (45).	67
Abb. 34: Stereochemische Charakterisierung des Nosperin mittels NMR- und bioinformatischer Analyse.	71
Abb. 35: Vergleich zwischen der nur durch bioinformatische Analyse vorhergesagten und der durch NMR-, MS- und bioinformatischer Analyse ermittelten Struktur des Nosperins (45).	72
Abb. 36: Toxizitätstest der Flechten- und Cyanobakterienextrakte an Krebszellen (A) und Neuroblasten (B)	75
Abb. 37: Die Biosynthese des Nosperins (45) wurde aus der Architektur der PKS Proteine NspA, NspC und NspD postuliert.	77
Abb. 38: Der Verteidigung dienende <i>trans</i> -AT-Polyketide in Symbiosen.	78
Abb. 39: Deletion im Bacillaen Biosynthesecluster.	82
Abb. 40: Strategie zur Erzeugung einer Deletionsmutante mit einem Initiationsdomänenknockout.	83
Abb. 41: Strategie zur Generierung des Vektors für die homologe Rekombination.	84
Abb. 42: Amplifikation einer homologen Rekombinationsstelle mittels verschiedener Primerkombinationen und einem Temperaturgradienten.	84
Abb. 43: Restriktionsverdau des isolierten Vektors.	85
Abb. 44: Restriktionsverdau der isolierten Plasmide.	86
Abb. 45: Linearisierung des Vektors pAK2.	86
Abb. 46: Kolonie-PCR der transformierten Klone.	87
Abb. 47: Phänotyp der Kolonien mit integrierten pAK2 Vektor.	87
Abb. 48: HPLC-Analyse des Extrakts von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42.	89
Abb. 49: HPLC-Analyse des Extrakts der Deletionsmutante AK2.	89
Abb. 50: Wachstumskurve von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> über einen Zeitraum von etwa 30h	90
Abb. 51: SNAC-Thioester des natürlichen Intermediats der KS2	91
Abb. 52: SNAC-Thioester der Startereinheit der Bacillaenbiosynthese	91
Abb. 53: Isolierte mRNA aus dem Wildtyp (FZB42) von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> und der Deletionsmutante (AK2).	92
Abb. 54: Reinheitskontrolle der isolierten mRNA aus dem Wildtyp von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (FZB42) und der Deletionsmutante (AK2).	93

Abb. 55: RT-PCR mit der isolierten mRNA des Wildtyps <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (FZB42) und der Deletionsmutante (AK2).	94
Abb. 56: Bacillaen-Biosynthese.	95
Abb. 57: Amplifikation der Sequenzen von KS2, 4, 5 und 6.	96
Abb. 58: Amplifikation der Sequenzen von (A) KS1 und (B) KS2.	97
Abb. 59: Restriktionsverdau der isolierten Vektoren von Transformationsklonen.	99
Abb. 60: Expression der ersten fünf aktiven KS des Bacillaen Genclusters.	101
Abb. 61: SNAC-Thioester zur Prüfung der KS1 Spezifität.	103
Abb. 62: Acylierung der Bae KS1 mit einem SNAC-Thioester.	104
Abb. 63: Kinetische Analyse der Umsatzrate der KS1 diverser SNAC-Thioester.	105
Abb. 64: SNAC-Thioester zur Prüfung der KS2 Spezifität.	107
Abb. 65: Kinetische Analyse der Umsatzrate der KS2 diverser SNAC-Thioester.	108
Abb. 66: SNAC-Thioester zur Prüfung der KS4 Spezifität.	110
Abb. 67: SNAC-Thioester zur Prüfung der KS5 Spezifität.	111
Abb. 68: Kinetische Analyse der Umsatzrate der KS5 diverser SNAC-Thioester.	111
Abb. 69: Kinetische Analyse der Umsatzrate der mutierten KS5 von diversen SNAC-Thioestern.	112
Abb. 70: 1,3-Addition als Konkurrenzreaktion zur Acylierung.	114
Abb. 71: Austausch der verwendeten Substrate zur Vermeidung der 1,3-Addition.	115
Abb. 72: Amplifikation der KS4- und KS6-Sequenzen mit veränderten Linkerregionlängen.	116
Abb. 73: Amplifikation der KS4 AA-Sequenz.	116
Abb. 74: Verwendete DNA-Marker.	128
Abb. 75: Verwendeter Proteinmarker für die SDS-PAGE.	149
Abb. 76: Kladogramm der <i>nsp</i> KS1 und KS2 enthaltenden Klade.	173
Abb. 77: Kladogramm der <i>nsp</i> KS3, 4 und 7 enthaltenden Klade.	174
Abb. 78: Kladogramm der <i>nsp</i> KS5, 6, 8 und 9 enthaltenden Klade.	175
Abb. 79: COSY-NMR-Spektrum des in der Flechte gefundenen MGDG.	176
Abb. 80: gHSQC-NMR-Spektrum des in der Flechte gefundenen MGDG.	177
Abb. 81: Mit HPLC-SPE-NMR gemessenes COSY-Spektrum des Nosperins.	178
Abb. 82: Mit HPLC-SPE-NMR gemessenes HMBC-Spektrum des Nosperins.	178
Abb. 83: Mit HPLC-SPE-NMR gemessenes HSQC-Spektrum des Nosperins.	179
Abb. 84: Massenspektrum der KS4-Domäne.	179
Abb. 85: Massenspektrum der KS6-Domäne.	180

2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Analyse der in der Nsp-PKS vorliegenden KS-Domänen.....	53
Tab. 2: NMR spektroskopische Daten des Nosperins.....	64
Tab. 3: Analyse der in der <i>nsp</i> -PKS vorliegenden KR-Domänen	69
Tab. 4: Analyse der in den <i>nsp</i> -PKS vorhandenen A-Domänen	70
Tab. 5: Verwendete Restriktionsezyme und erwartete Bandengrößen für die Vektoren mit den KS-Gensequenzinserts.....	98
Tab. 6: Verwendete Primer in dieser Arbeit. Restriktionsstellen unterstrichen und Stop-Codons fett.....	121
Tab. 7: Verwendete Vektoren.....	123
Tab. 8: Konstruierte Vektoren.....	123
Tab. 9: Verwendete und konstruierte Organismen.....	124
Tab. 10: Standard-PCR-Ansatz	124
Tab. 11: Temperaturprogramm für die PCR	125
Tab. 12: RT-PCR-Ansatz.....	126
Tab. 13: Temperaturprogramm für die RT-PCR.....	127
Tab. 14: Ansatz für die Ligation eines TA-Vektors und PCR-Produktes.....	129
Tab. 15: Verwendete Sequenzierprimer	130
Tab. 16: Zusammensetzung von TFB I.....	131
Tab. 17: Zusammensetzung von TFBII.....	132
Tab. 18: Zusammensetzung des GCHE-Puffers.....	133
Tab. 19: Zusammensetzung des GC-Puffers.....	133
Tab. 20: Zusammensetzung des Transformations-Puffers	133
Tab. 21: Zusammensetzung des 10 x PC-Puffers (pH 7).....	134
Tab. 22: Zusammensetzung des SMM-Puffers (pH 7)	134
Tab. 23: Zusammensetzung der drei verwendeten Puffer-Lösungen.....	136
Tab. 24: Ansatz für eine analytische Restriktion	137
Tab. 25: Zusammensetzung des STE-Puffers	139
Tab. 26: Zusammensetzung Lyse-Puffer (pH 7.65)	145
Tab. 27: Zusammensetzung des 2 x SDS-PAGE Ladepuffer (Probenpuffer).....	147
Tab. 28: Zusammensetzung des Sammelgels (4.4%).....	147
Tab. 29: Zusammensetzung des Trenngels (12%)	148
Tab. 30: Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers	148
Tab. 31: Zusammensetzung der Coomassie Färbelösung.....	149
Tab. 32: LB-Medium (Luria Bertani) ¹⁷⁰	151

Tab. 33: TB-Medium (Terrific broth) ¹⁷¹	152
Tab. 34: Landy-Medium ¹⁷²	152
Tab. 35: 2 x YT Medium (Kieser) ¹⁷³	153
Tab. 36: Verwendete Chemikalien.....	153
Tab. 37: Verwendete Geräte und Materialien	156

3. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenylierungsdomäne
ACN	Acetonitril
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AL	Acyl-CoA-Ligase
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Acyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Bae/bae</i>	Proteine/Gene der Bacillaen PKS
bp	Basenpaare
BSA	Rinderalbumin (Bovine serum albumin)
C	Kondensationsdomäne
cDNA	copy-DNA
CoA	Coenzym A
COSY	Correlated Spectroscopy
CR	Crotonase
<i>Crp/crp</i>	Proteine/Gene der Cryptophycin PKS
DAD	Photodiodenarraydetektor
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC (TLC)	Dünnschichtchromatographie (thin layer chromatography)
DH	Dehydratase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)

dNTP	Desoxynukleotid
DTT	1,4-Dithiothreit
dTTP	Desoxythymintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECH	Enoyl-CoA Dehydratase
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethyleneglycol-Tetraessigsäure
ER	Enoylreduktase
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
EtOAc/EtAc	Ethylacetat
FAS	Fettsäuresynthase
FCS	fetales Kalbserum (fetal calf serum)
FPLC	Fast protein liquid chromatography
gHSQC	gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence
GNAT	GCN5-verwandte N-Acetyltransferase
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
His-Tag	Histidin-Tag
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMGS	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase
HPLC	High-performance liquid chromatography
HPLC-SPE-NMR	High performance liquid chromatography–solid phase extraction–nuclear magnetic resonance
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
IS	Insertionsequenz
<i>J</i>	Kopplungskonstante

Abkürzungsverzeichnis

Kb	Kilo-Basenpaare
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
KS ⁰	Inaktive Ketosynthase
LB	Luria Bertani
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
MEM	Modified Eagle Medium
MeOH	Methanol
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
MT	Methyltransferase
<i>Myc/myc</i>	Proteine/Gene der Microcysteine PKS
NADH	Reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotids
NaOH	Natriumhydroxid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
<i>Nos/nos</i>	Proteine/Gene der Nosteopeptolid PKS
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthase
<i>Nsp/nsp</i>	Proteine/Gene der Nosperin PKS
oa TOF	orthogonal-acceleration Time-of-flight
OD	optische Dichte
<i>Onn/onn</i>	Proteine/Gene der Onnamid PKS
OxR	Oxidoreduktase
P450	Cytochrom P450
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
<i>Ped/ped</i>	Proteine/Gene der Pederin PKS

Abkürzungsverzeichnis

PK	Polyketid
PKS	Polyketidsynthase
Ppant	Phosphopantethein
ppm	parts per million
PPTase	Phosphopantetheinyl-Transferase
RBS	Ribosomenbindestelle
<i>Rhi/rhi</i>	Proteine/Gene der Rhizoxin PKS
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease A
SAM	S-Adenosyl-methionin
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>Sfp/sfp</i>	Proteine/Gene der PPTase PKS
SNAC	N-Acetylcysteamin
sp.	species
SpecR	Spectinomycinresistenz
spp.	subspecies
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	Terrific Broth
TE	Thioesterase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
tRNA	transfer-RNA

4. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Untersuchung von *trans*-Acyltransferase-Polyketidsynthese (*trans*-AT-PKS)-Systemen. Diese noch relativ wenig erforschte Klasse von Polyketidsynthasen (PKS) zeichnet sich durch die *in trans* agierenden AT aus und wird somit von den *cis*-AT-PKS unterschieden, deren AT in den Multienzymkomplex integriert sind. Sowohl die hohe Diversität als auch die häufig vorhandene Bioaktivität der Metabolite dieser PKS-Klasse macht sie besonders interessant in Hinblick auf mögliche Anwendungen in der Pharmaindustrie. Viele dieser Naturstoffe könnten jedoch eine höhere Wirksamkeit z.B. gegen Krebs entfalten, wenn Modifikationen an ihnen vorgenommen werden würden. Das ist Aufgabe der kombinatorischen Biosynthese. Dabei wird gezielt in die Domänenarchitektur der PKS eingegriffen um den Naturstoff umzustrukturieren. Bei diesen Eingriffen sind jedoch Regeln zu beachten, damit die Biosynthese auch weiterhin reibungslos funktioniert. Diese Regeln sind aber nicht vollständig bekannt und viele Fragestellungen dazu offen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue Erkenntnisse über diese bisher sehr wenig erforschte Klasse von Enzymen und über ihre Produkte gewonnen werden. Der Kenntnisstand bezüglich einer möglichen biotechnologischen Anwendung dieser Enzyme ist entsprechend des Forschungsstands ebenfalls gering. Die Arbeit sollte auch dazu beitragen das Verständnis in dieser Hinsicht zu erweitern. Dabei wurde in zwei unabhängigen Projekten mit unterschiedlichen *trans*-AT-PKS-Systemen gearbeitet.

Das *trans*-AT-PKS-System mit dem im ersten Projekt gearbeitet worden ist, ähnelte regionsweise dem Gencluster des Pederins (**17**) und anderer pederinartiger Metabolite. Die Pederinfamilie ist eine Gruppe von Naturstoffen, die ein Strukturfragment teilt, das unter anderem ein Pyransystem und eine Enamidgruppe mit einschließt (Abb. 18). Interessant ist diese Gruppe vor allem, weil ihre Mitglieder stets in symbiotischen Assoziationen zumeist von bislang unbekanntem Mikroorganismen produziert werden und dem Wirt in ihrer oftmals toxischen Wirkung zum Vorteil gegenüber Fressfeinden verhelfen. Alle PKS dieser Gruppe gehören den *trans*-AT-PKS an und lassen sich erstaunlicherweise in sehr diversen Organismen und Lebensräumen wiederfinden. Dies unterstützt die Hypothese eines horizontalen Gentransfers von Genen des Pederintyps. Der erst kürzlich durch die Arbeitsgruppe von Prof. Ólafur Andrésson der Universität Reykjavik in Island entdeckte, der Pederinfamilie angehörende Gencluster wurde aus dem Metagenom der Flechte *Peltigera membranacea* isoliert und sequenziert. Die Sequenz wurde von Prof. Jörn Piel für eine Vorhersage der Struktur des Produkts genutzt. Auf Basis dieser Vorhersage war es Ziel dieser Arbeit, die Substanz zu detektieren, zu isolieren und mittels einer kompletten

Strukturanalyse die Übereinstimmung von realer Struktur und Vorhersage zu überprüfen. Von der Aufklärung der Korrelation zwischen Domänenabfolge und Struktur wurden neue Erkenntnisse über die Funktionsweise von *trans*-AT-PKS erhofft. Auch Fragestellungen die Evolution der Gencluster der Pederinfamilie und die ökologische Rolle ihrer Metabolite betreffend, sollten geklärt werden. Der pederinartige Naturstoff, dessen Sequenz bekannt war, sollte zunächst aus der Flechte *Peltigera membranacea* extrahiert werden. Zu diesem Zwecke wurde getrocknetes Flechtenmaterial mehrfach extrahiert und die erhaltenen Rohextrakte chromatographisch aufgereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels massenspektrometrischer Untersuchungen, Dünnschichtchromatographie und Cytotoxizitätstest nach der durch den Gencluster kodierten Substanz durchsucht. Da diese Suche ohne Erfolg blieb, wurde eine Kultur des mit dem Mykobionten symbiotisch lebenden und den Gencluster tragenden Cyanobakteriums *Nostoc* N6 im großen Maßstab angelegt. Der Kultur wurde ^{13}C -markiertes Hydrogencarbonat hinzugefüttert. Mit der Kombination der ^{13}C -Isotopenmarkierung und der Verwendung von LC-SPE-NMR (liquid chromatography–solid phase extraction–nuclear magnetic resonance) konnten trotz geringster Mengen des Substrats neben den ^1H - und ^{13}C -Spektren auch die 2D-Spektren H, H-Cosy, HMBC und HSQC aufgenommen werden. Die Datenanalyse führte zur vollständigen Strukturaufklärung der Substanz, die fortan Nosperin genannt wurde. Dieses erweitert nicht nur die Liste bekannter pederinartiger *trans*-AT-PKS-Metabolite, sondern auch die biosynthetischen Enzyme der *trans*-AT-PKS. Zudem ist eine weitere Symbiose bekannt, die Rückschlüsse auf die ökologische Rolle pederinartiger Metabolite zulässt. Die Evolution dieser Gencluster kann auch näher beleuchtet werden, da der symbiotische Partner in diesem Falle bekannt ist und dieses Wissen zukünftig genutzt werden kann, um die verwandtschaftlichen Verhältnisse und den horizontalen Gentransfer nachzuverfolgen.

Im zweiten Projekt wurde für die Studien an *trans*-AT-PKS-Systemen der *bae*-Gencluster verwendet. Dieser kodiert für das in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 produzierte Bacillaen (**21**), das eine antibiotische Aktivität aufweist. Der Fokus lag auf der Substratspezifität der fünf ersten aktiven Ketosynthasen (KS) der Bacillaen-PKS. KS sind für die Kondensation der Startereinheit und der folgenden Elongationseinheit bzw. der weiteren Elongationseinheiten zuständig. Nguyen *et al.* zeigten in ihrer Arbeit mittels bioinformatischer Analysen, dass bei KS in *trans*-AT-PKS-Systemen eine Korrelation zwischen der Verwandtschaft der KS-Domänen und ihrer Funktionsweise besteht. Aus diesen *in silico* Analysen resultierte die Hypothese, dass die KS eine Substratspezifität zeigt, die auf bestimmte Positionen im Substratintermediat beschränkt ist, d.h. dass eine Molekülregion der Substrate über deren Akzeptanz entscheidet. Diese bislang nur theoretische Annahme sollte an den *bae*-KS experimentell bestätigt werden. Umgesetzt werden sollte dies mittels zweier alternativer Ansätze. Die erste Variante verfolgte einen mutasynthetischen Ansatz, bei dem synthetische

N-Acetylcysteamin (SNAC)-Thioesterderivate *in vivo* der dafür eigens klonierten Deletionsmutante AK2 hinzugefüttert worden sind. Dabei wurde das Initiationsmodul der Bacillaen-PKS in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 mittels homologer Rekombination deletiert. Dies hatte zur Folge, dass die Bacillaensynthese nicht initiiert werden konnte und die Mutante somit nicht in der Lage ist, die Substanz zu produzieren. Der hinzugefütterte SNAC-Thioester, der dem natürlichen Intermediat der KS2 entsprach, hätte theoretisch von dieser akzeptiert werden und die Bacillaenbiosynthese damit wieder stattfinden müssen. Die Resultate sprachen jedoch dafür, dass die Mutante die SNAC-Thioester nicht aufnehmen und somit auch nicht weiter verstoffwechseln konnte. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die SNAC-Thioester direkt den KS *in vitro* hinzugefüttert und mittels ESI-MS (**E**lektronenspray-Ionisation-**M**assenspektrometrie) festgestellt, ob eine Acylierung der KS stattfand und in welcher Zeit das dargereichte Substrat umgesetzt wurde. Die Ergebnisse dieser Messungen bestätigten die bereits erwähnte Hypothese, dass bestimmte Positionen des Substrats oder spezifischer - die β -Position ausgehend von der Carbonylfunktion des neukondensierten Teils des Substrats eine tragende Rolle für die Substraterkennung spielt. Vor allem der sterische Anspruch der in dieser Position befindlichen Gruppen entschied über die Akzeptanz des Substrats. Dies konnte eindeutig für die KS1, 2 und 5 nachgewiesen werden. Zudem konnte bei der KS1 gezeigt werden, dass das in diesem Fall vorliegende sekundäre Amin wichtige Interaktionen mit dem Substrat eingeht, da eine Abwesenheit dieser Gruppe sich in einer Nichtakzeptanz des Substrats geäußert hat. Diese Ergebnisse sind äußerst relevant für die kombinatorische Biosynthese. Mit dem hier erworbenen Wissen über die Substratspezifitäten der KS, ist es z.B. möglich gezielt KS-Domänen bzw. ganze Module in fremde Gencluster zu integrieren oder diese auch zu eliminieren, da jetzt bekannt ist, welche Substratpositionen entscheidend für die Toleranz und damit für das Fortschreiten der Kettenverlängerung ist. Umgekehrt könnten auch den *trans*-AT-PKS gezielt synthetische Derivate zugeführt werden. Auf beiden Wegen könnten unnatürliche Produkte mit möglicherweise verbesserter pharmakologischer Wirksamkeit generiert werden.

5. Abstract

The present dissertation examined *trans*-AT-PKS systems identified in natural product gene clusters from symbiotic microorganisms. In contrast to *cis*-polyketide synthases (PKSs) that contain ATs integrated into each multi-modular enzyme, *trans*-AT-PKSs contain free-standing ATs that operate *in trans*. The large structural diversity and bioactivity of PKS-derived natural products provides an interesting source for pharmaceutically useful small molecules. Some of these natural products are only weakly bioactive or not at all, but they can be chemically modified to exhibit more potent activity against human diseases. These transformations can be accomplished by chemical synthesis using organic reactions or combinatorial biosynthesis by manipulation of biosynthetic enzymes. The plasticity of a natural product pathway must be elucidated in order to establish restraints within the system. The goal of this dissertation was to disclose additional insight into the *trans*-AT PKS class and its natural products. In addition, knowledge for possible engineering applications of these enzymes was to be established. For this purpose two different *trans*-AT PKS systems were examined in this work.

The *trans*-AT PKS system of the first project showed similarity to the gene cluster of pederin (**17**) and other pederin like metabolites. The pederin family is a group of natural products that share structural features including a substituted pyran ring attached to an unsaturated carbon chain through an amide bond (fig. 18). A very interesting phenomenon within this group of natural products is their widespread presence in microorganisms that live in symbiotic associations. In most cases the microorganisms are unknown, but it is evident that their compounds may be beneficial for the host. The toxic activity of metabolites, that are similar to pederin (**17**), provide evidence that they may protect the host organism from being consumed by predators. All PKSs of this group belong to the *trans*-AT PKS family and can be found in astonishingly diverse organisms and habitats. This supports the hypothesis of horizontal gene transfer events of genes of the pederin type. Sequencing of the metagenome from the lichen *Peltigera membranacea* by Prof. Ólafur Andrésón and coworkers revealed a gene cluster of the pederin type. The gene cluster sequence allowed for prediction of the natural product structure. Based on this predicted structure the compound was targeted for isolation. The pederin like metabolite was to be extracted from the lichen *Peltigera membranacea*. The dried lichen material was extracted several times and the extracts were purified by chromatography. Individual fractions were examined by mass spectrometry, TLC (thin layer chromatography) and cytotoxicity tests for the product encoded by the pederin like gene cluster. Since initial attempts to find the natural product were unsuccessful, the

cyanobacterial symbiont (*Nostoc* N6) of the lichen containing the pederin like gene cluster was cultured on a large scale. Combined use of ^{13}C isotope labeling and LC-SPE-NMR enabled the detection of low amounts of the natural product. ^1H and ^{13}C NMR spectra as well as 2D spectra (COSY, HMBC and HSQC) were obtained by this methodology. Spectrometric analysis led to the complete structure elucidation of the natural product that was named nosperin (**45**). Comparison with the completely elucidated structure showed a high similarity between the actual and the predicted structure. The structure of the natural product revealed information about the organization within the PKS domain order. Nosperin (**45**) represents a new addition to pederin-like *trans*-AT PKS metabolites and with the *Peltigera membranacea* system another symbiosis has been identified that allows conclusions about the ecological role and evolution of pederin like metabolites. Future studies should be focused on the evolution of the gene clusters derived from the pederin family and the ecological role of these metabolites.

The second project focused on the *bae* gene cluster encoding bacillaene (**21**), a bioactive natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. The substrate specificity of the first five active ketosynthases (KSs) in the bacillaene PKS was investigated. KSs are responsible for the condensation of the starter unit followed by elongation of the remaining carbon chain. Using a bioinformatics approach, Nguyen *et al.* had previously shown that in *trans*-AT PKS systems a correlation exists between the KS domains and their functionality. This *in silico* analysis resulted in the hypotheses that the KS exhibit a substrate specificity for certain positions of the substrate intermediate. This theoretical study was experimentally tested using the *bae* KS. First, a mutasynthetic approach feeding synthetic SNAC thioester derivatives to the deletion mutant AK2 *in vivo*. The initiation module of the bacillaene PKS in *Bacillus amyloliquefaciens* was knocked out by homologous recombination in order to prevent biosynthesis of bacillaene. It was expected that, in case the added SNAC thioester corresponding to the natural substrate of KS2 is accepted by the KS and initiate bacillaene biosynthesis, variation of the SNAC thioester derivatives should deliver new insights in substrate flexibility. However, the results showed that the mutant is unable to process the SNAC thioester and cannot metabolize them. In contrast, an alternative approach added SNAC thioesters *in vitro* directly to the KS generated valuable data. In this approach, ESI-MS was used to detect acylation of the substrate onto the KS. The result of these measurements confirmed the hypothesis that the $\alpha\beta$ -position was a substantial for substrate recognition by several KSs. Analyzable results were obtained for the KS1, 2 and 5. Results for KS1 showed that the interaction of the secondary amine with the substrate is very important and that its presence was necessary for acceptance of the substrate. With these studies we have acquired knowledge about the substrate specificity of the KSs within the *bae* cluster, and these results are relevant for future studies regarding combinatorial biosynthesis. For

example, it should be possible to integrate or eliminate KS domains or whole modules in other gene clusters. We also found the position of certain functional groups is critical for the tolerance and for further chain elongation. In addition, synthetic SNAC derivatives were accepted by the *trans*-AT PKSs. This work contributes to the knowlegde of how to generate natural product derivatives with potentially improved pharmaceutical activity.

6. Einleitung

6.1 Polyketide

Der Begriff "Polyketide" (PK) wurde von dem organischen Chemiker J. Collie Ende des 19ten Jahrhunderts definiert.¹ Collie postulierte, dass die von ihm untersuchten "Polyketone" Polymere aus kleinen Keteneinheiten darstellten.² Jedoch konnte erst Birch Mitte der 50iger Jahre belegen, dass PK durch die Kondensation einzelner Acetyleinheiten gebildet werden.³ Die bahnbrechenden Ergebnisse seiner Arbeit führten zu einem starken Anstieg der Polyketidforschung, so dass das heutige Wissen über Polyketide als eine große Gruppe der Naturstoffe sehr weitreichend ist.

Bekannte Produzenten von Polyketiden sind Pflanzen, Pilze und Bakterien. Das Erscheinungsbild dieser Metaboliten ist äußerst vielfältig und reicht von vollständig aliphatischen, zum Teil auch stark ungesättigten, cyclischen oder acyclischen, bis hin zu aromatischen Strukturen.⁴ Ebenso divers ist auch die biologische Funktion der Polyketide in den verschiedenen Organismen. Sie können als Pigmente, Virulenzfaktoren, Kommunikations- und Abwehrstoffe eingesetzt werden.⁵ Auch wenn ihre ökologischen Funktionen oftmals nicht bekannt sind, werden viele Polyketide vom Menschen aufgrund ihrer pharmazeutischen Wirkung genutzt. Sie zeigen z.B. häufig antibakterielle, antivirale, antiparasitäre, antitumorale, fungizide und immunsuppressive Wirkung.^{2,6} In Abb. 1 sind einige Beispiele medizinisch relevanter Polyketide dargestellt.

Doxorubicin (**1**) interkaliert mit der DNA und inhibiert die Topoisomerase II. Diese wird am DNA-Strang stabilisiert und somit an der Entwirrung der DNA-Supercoils gehindert. Damit wird eine Replikation der DNA-Stränge unterbunden.⁷ Aufgrund ihrer zytostatischen Wirkung sind Epothilone (**2**) starke Antitumortheraeutika. Durch die Stabilisierung der Mikrotubuli, wird die mitotische Zellteilung unterbunden, so dass Tumore ihr Wachstum einstellen.⁸ Die vom *Mycobacterium ulcerans* produzierten Mykolaktone (**3**) wirken immunsuppressiv, indem sie inhibierend auf Monozyten und T-Zellen einwirken.⁹ Erythromycin (**4**) entfaltet seine antibiotische Wirkung, indem es die bakterielle Proteinbiosynthese hemmt.¹⁰

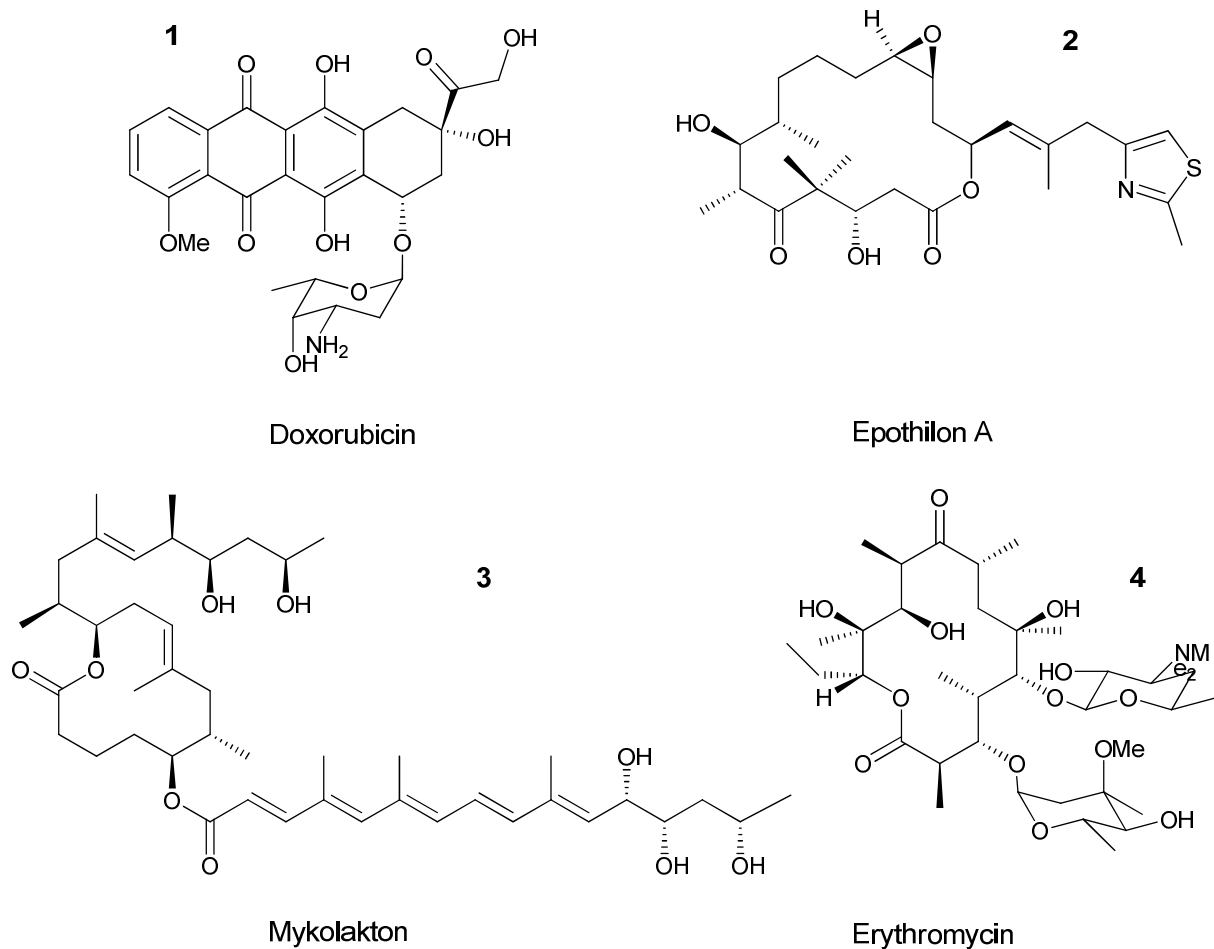


Abb. 1: Beispiele medizinisch relevanter Polyketide

Die zunehmende Bedeutung der Polyketide als pharmazeutische Therapeutika in den letzten Jahrzehnten hat das Interesse an ihnen gefördert und zur Entwicklung neuer Herangehensweisen geführt, um diese und die entsprechenden Polyketidsynthasen (PKS) zu detektieren, zu isolieren und zu modifizieren. Der kombinierte Gebrauch von genetischen, proteinchemischen und chemischen Werkzeugen hat fundamental neue Erkenntnisse über die Struktur und die Funktion von PKS erbracht. Besonders die Molekulare Biologie erweitert die Möglichkeiten drastisch. Das Klonieren neuer PKS-Gene, die Konstruktion von rekombinanten PKS-Genclustern und die Analyse der zugehörigen Produkte *in vivo* und *in vitro* gehören längst zur Routine in der PKS-Forschung. Dieser Zweig der PKS Forschung ist besonders relevant für die Entwicklung neuer wirksamer Pharmazeutika.

6.2 Biosynthese von Polyketiden

Die Biosynthese der Polyketide ist der Fettsäurebiosynthese sehr ähnlich.¹¹ Neben den gleichen Mechanismen werden auch zum Teil die gleichen Bausteine wie Acetyl-CoA (**5**) und Malonyl-CoA (**6**) verwendet (Abb. 2), wobei **5** in der Regel als Startereinheit und **6** als Verlängerungseinheit genutzt wird.¹² Jedoch steht den PKS im Vergleich zu den FAS eine größere Auswahl an biosynthetischen Bausteinen zur Verfügung. Darunter fallen z.B. Propionyl-CoA (**7**), Zimtsäure-CoA (**8**) (Synthese von flavonoiden Verbindungen), Malonsäureamid-CoA (**9**) (Synthese von Tetracyclinen), CoA-Derivate der Oxosäuren von Leucin, Isoleucin und Valin sowie Nicotiny-CoA (**10**) (Abb. 2).¹³

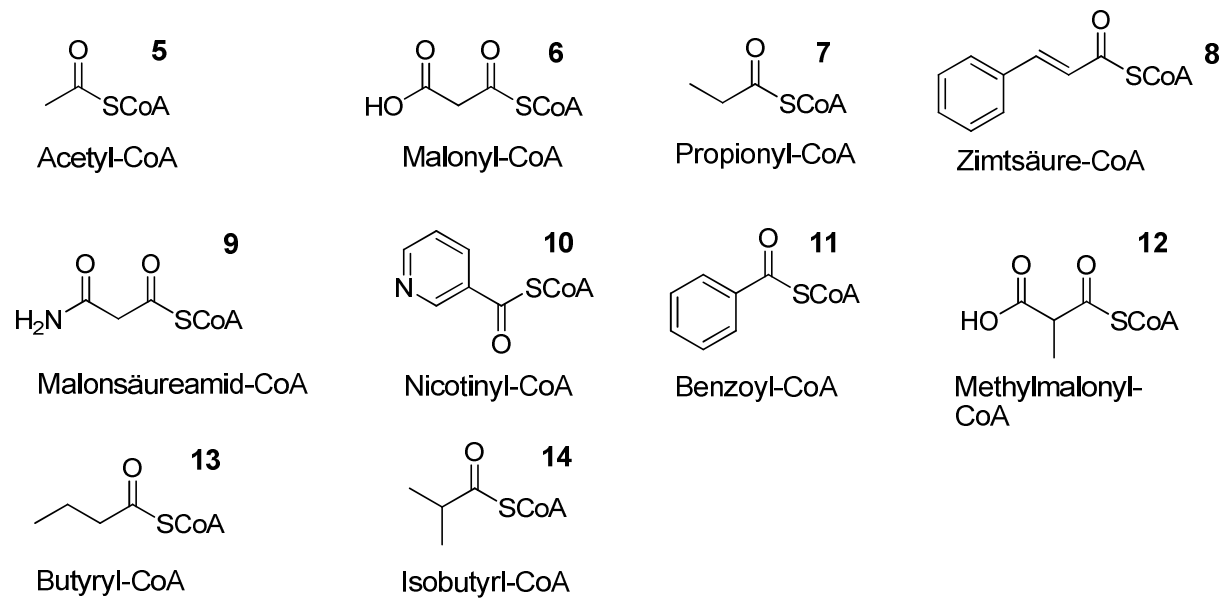


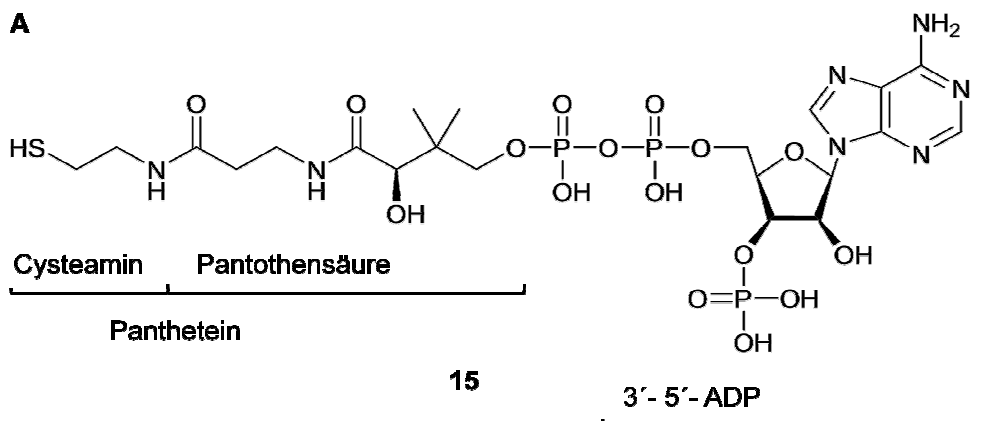
Abb. 2: Auswahl an verschiedenen Starter- und Elongationseinheiten

Das Grundgerüst sowohl von Polyketiden als auch von Fettsäuren wird durch die repetitive Claisen-Thioester-Kondensation einer Acylstartereinheit mit (substituierten) Malonylresten aufgebaut.¹⁴ Während bei der Fettsäurebiosynthese danach stets eine vollständige Reduktion erfolgt, kann die β -Oxogruppe des jeweils zuletzt angebauten Acetylrests in der PKS-Biosynthese durch Reduktion optional in eine β -Hydroxy-, α,β -ungesättigte- oder eine vollständig reduzierte C₂-Einheit überführt werden. Diese Variabilität der Reduktionsschritte führt im Falle der Polyketide zu einer erhöhten Diversität der Polyketidstrukturen. Die Kondensationen und Reduktionen werden von großen Multienzymkomplexen, den sogenannten Polyketid- bzw. Fettsäuresynthasen (FAS) katalysiert. In beiden Fällen werden die Verlängerungs- bzw. Reduktionszyklen so lange wiederholt, bis die durch die PKS bzw.

FAS vorgegebene Kettenlänge erreicht ist. Die gemeinsamen Merkmale der PKS und FAS sind eine Folge ihrer evolutionsgeschichtlichen und biochemischen Verwandtschaft.¹²

Ein weiterer Unterschied zwischen FAS und PKS besteht in der iterativen und nicht-iterativen Arbeitsweise ihrer Module. Im Falle von iterativen PKS und FAS katalysiert ein Modul mehrere Kettenverlängerungen des Polyketids, während beim nicht-iterativen PKS-Typ ein Modul nur eine Kettenverlängerung katalysiert. Die FAS ist immer iterativ, wogegen es iterative und nicht-iterative PKS-Typen gibt. Der iterative PKS-Typ kommt hauptsächlich in Pilzen vor.⁵ In Bakterien lässt sich hingegen fast ausschließlich der modulare PKS-Typ finden. Gruppen aktiver Enzymdomänen bestimmen die Organisation der modularen PKS. Diese werden als Module zusammengefasst. Jeweils ein Modul katalysiert einen Verlängerungs- und Reduktionzyklus. Jedes verlängernde Modul kann eine unterschiedliche Anzahl und Kombination von katalytischen Domänen enthalten, jedoch besitzen alle Module zumindest eine β -Ketoacylsynthase (KS), eine Acyltransferase (AT) und ein phosphopantetheinyliertes Acylcarrierprotein (ACP). Zusätzlich können spezifische Kombinationen von Ketoreduktasen (KR), Dehydratasen (DH) und Enoylreduktasen (ER) vorkommen und nach jedem Kettenelongationszyklus funktionelle Modifikationen vornehmen.¹⁵ Durch die endständige Thioesterase (TE) wird die Polyketidkette vom Enzymkomplex freigesetzt. Das Polyketid kann weiterhin in sogenannten posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. Acylierung, Methylierung, Glykosylierung und Oxidation, von den entsprechenden Tailoringenzymen in seiner Struktur verändert und funktionalisiert werden.

Bevor die Polyketidsynthese initiiert werden kann, muss zunächst das ACP aktiviert werden, indem es von der inaktiven *apo*-Form in die aktive *holo*-Form überführt wird.¹⁶ Eine 5'-Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) katalysiert dabei die Phosphodiester-Bindung zwischen dem Ppant-Rest aus einem Coenzym A (**15**) und der Hydroxyfunktion eines konservierten Serins des ACPs (Abb. 3).



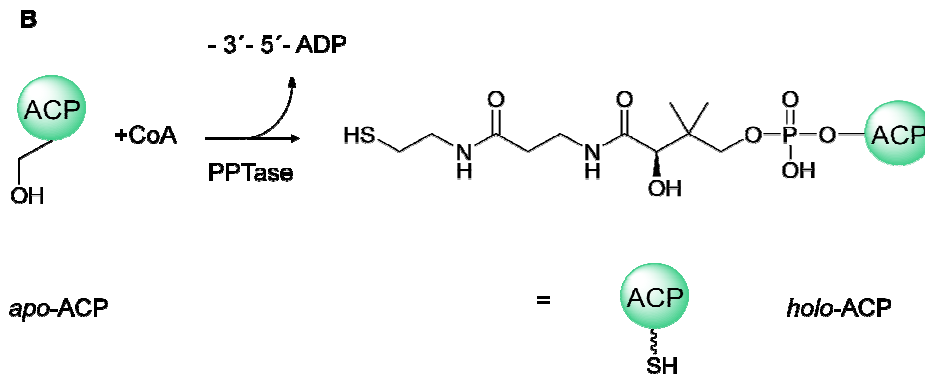


Abb. 3: A Struktur von Coenzym A (15). B Aktivierung der apo-ACP zur holo-ACP

Auf diese Weise aktiviert, kann das ACP durch die AT mit einer Starter- bzw. Elongationseinheit beladen werden. Dabei sind in einer PKS meist mehrere ATs lokalisiert (eine pro Biosynthesemodul), die eine unterschiedliche Substratspezifität für die Starter- bzw. Elongationseinheiten aufweisen können. Die Startereinheit ihrerseits wird nun von dem holo-ACP auf ein konserviertes Cystein einer KS übertragen. Durch eine decarboxylative Claisen-Reaktion kondensiert die KS die Startereinheit mit der Elongationseinheit. Diese ist an die nächste, stromabwärts gelegene holo-ACP gebunden. Bei diesem Schritt erfolgt eine Decarboxylierung und die Bildung eines β -Keto-Thioesters (Abb. 4).

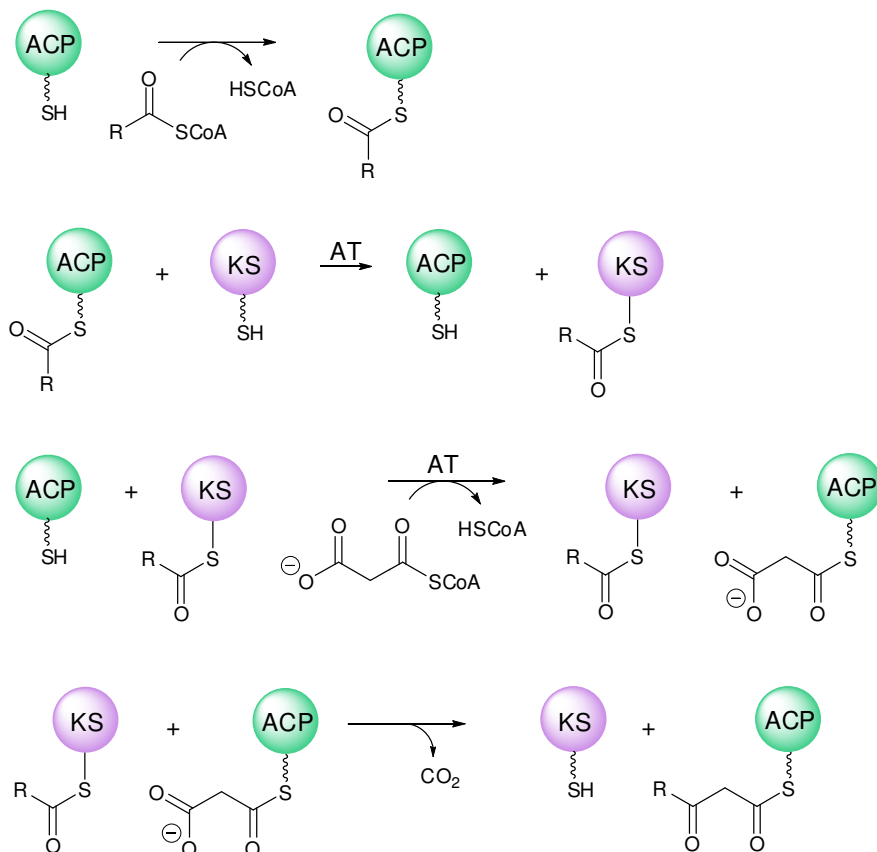


Abb. 4: Kettenelongation der Polyketide. AT: Acyltransferase; KS: Ketosynthase

Analog dazu werden die übrigen Kettenverlängerungen durchgeführt, indem die Elongationseinheiten mittels einer Claisen-Kondensationen an die wachsende Polyketidkette addiert werden.¹⁷⁻¹⁹

Die β -Ketogruppe des neu entstandenen β -Keto-Thioesters kann durch eine NADH-abhängige KR zu einer Hydroxy-Gruppe reduziert werden. In einem folgenden Schritt kann eine DH die Hydroxygruppe unter Wasserabspaltung zu einer Doppelbindung umfunktionieren. Die KR kann die gebildete Doppelbindung im Anschluss zum gesättigten System reduzieren (Abb. 5).²⁰

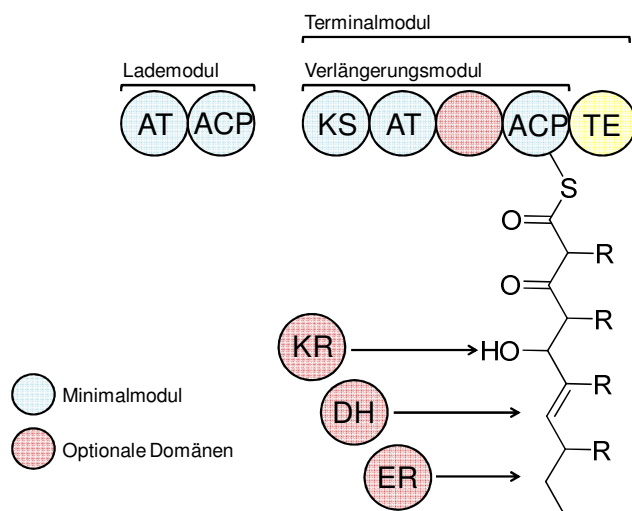


Abb. 5: Optionale Kettenverlängerung. KR: Ketoreduktase; AT: Acyltransferase; DH: Dehydrogenase; ACP: Acylcarrierprotein; TE: Thioesterase; ER: Enoylreduktase; KS: Ketosynthase

6.3 Typen der Polyketidsynthasen

Die Polyketidsynthasen werden gemäß ihrer Architektur sowie ihrer Funktionsweise in verschiedene Typen unterteilt.²¹ Die drei grundlegenden Typen werden als Typ I, II und III bezeichnet, wobei bei Typ I, wie im vorhergehenden Kapitel schon kurz umrissen, nochmals zwischen dem multimodularen und dem iterativen Typ I unterschieden wird.

Der Fokus dieser Arbeit richtet sich auf Polyketide, die durch PKS des multimodularen Typs I synthetisiert werden, weshalb dieser Typ detaillierter beschrieben wird.

Die multimodularen Typ I-PKS kommen in Bakterien vor, während die iterativen Typ I-PKS nur vereinzelt in Bakterien gefunden wurden und Pilze die hauptsächliche Quelle darstellen.²² Ein Unterschied zwischen diesen beiden Typen ist, dass ein Modul des

iterativen Typs mehrere Elongationsschritte katalysiert. Ein weiterer Unterschied ist die Einschränkung des iterativen Typs in der Auswahl seiner Verlängerungseinheiten. Während diesem nur Malonyl-CoA (**6**) zur Verfügung steht, kann der multimodulare Typ auf verschiedene Verlängerungseinheiten zurückgreifen. Ein Beispiel für eine iterative PKS I ist die 6-Methylsalicylsäure-Synthase aus *Penicillium patulum*. Ein Modul mit dem Domänenarrangement KS-AT-DH-KR-ACP wird dreimal durchlaufen um die vollständige Biosynthese abzuschließen, wobei nur bei dem zweiten Durchlauf die optionalen Reduktionsschritte durchgeführt werden.²³

Den iterativen und den multimodularen PKS I ist jedoch gemeinsam, dass die katalytischen Domänen eine lineare Anordnung zeigen und miteinander kovalent verbunden sind. Die im Falle der multimodularen PKS I hintereinander geschalteten Module sind für die Biosynthese des Polyketids zuständig. Dabei übernimmt meist jedes Modul exakt eine Kettenverlängerung. Die Domänen KS, AT und ACP bilden dabei eine Minimalkonfiguration eines Moduls. Jedes Modul kann jedoch weitere optionale Domänen (KR, DH, ER) besitzen.² Die Struktur des Polyketids ist von der Anordnung der Module und der Domänen innerhalb jedes Moduls abhängig. Das heißt aufgrund der Modulabfolge kann die Struktur des Polyketids recht gut vorhergesagt werden und ebenso kann von der Struktur auf die Modularchitektur zurückgeschlossen werden. Dieser als Kolinearitätsregel²⁴ bekannte Zusammenhang ermöglicht es durch bioinformatische Sequenzanalysen eine oft hochpräzise Vorhersage der Polyketidstruktur zu machen. Auf diese Weise konnte z.B. die Struktur des Naturstoffes ECO-02301 (**16**) aus *Streptomyces aizunensis* sehr genau vorhergesagt und durch anschließende Isolation und Strukturanalyse bestätigt werden (Abb. 6).²⁵

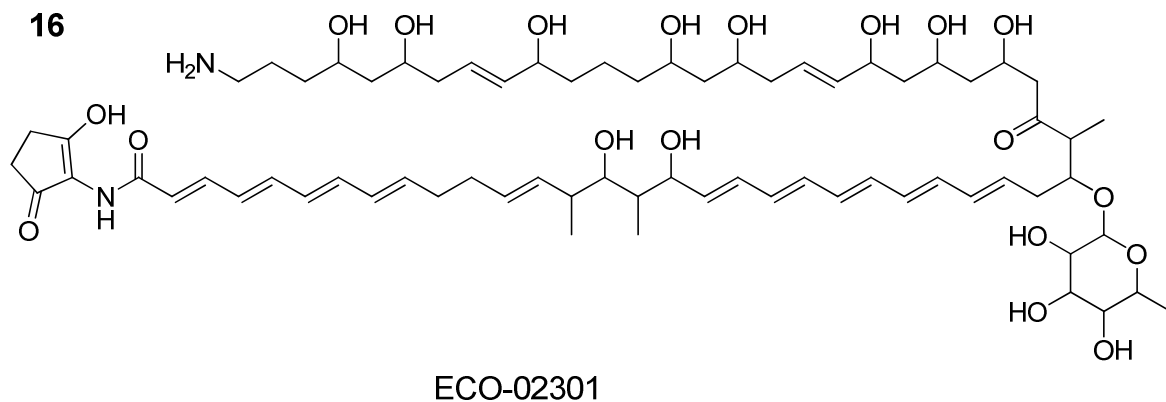


Abb. 6: ECO-02301 (**16**) aus *Streptomyces aizunensis*.

Typ II-PKS kommen ausschließlich in Bakterien vor.⁵ Ihr dissoziierbarer Komplex besteht im Normalfall aus drei bis sieben monofunktionellen oder bifunktionellen Enzymen.²⁶ Die Polyketidkette wird dabei, mit der wahrscheinlichen Ausnahme einer Ketoreduktion, solange keinen reduktiven Prozessen unterzogen, bis die volle Länge erreicht ist. Ihre Länge wird durch intrinsische Eigenschaften des Enzymkomplexes bestimmt. Diese Enzymkomplexe sind Minimal-PKS, die aus zwei Ketosynthase-Untereinheiten (KS α und KS β) und einem ACP bestehen. Erst im nachhinein werden die Polyketidketten gegebenenfalls von Enzymen wie Ketoreduktasen, Zyklasen und Aromatasen modifiziert. Der Actinorhodin-Gencluster stellt dabei einen der bestuntersuchteten PKS II-Gencluster dar.²⁷

Typ III-PKS sind am häufigsten in Pflanzen zu finden, kommen jedoch auch in Pilzen und Bakterien vor. Sie liegen als homodimere Enzyme vor. Jedes Monomer wählt eine Startereinheit und katalysiert die Verlängerungs- und Zyklisierungsreaktion.²⁸ Die Polyketidprodukte der PKS III schließen Resorcinole, Acridone, Chalcone, Stilbene und Phloroglucinole ein.^{29,30} Diese hohe Diversität erwächst aus der Akzeptanz der Typ III PKS für Variationen der Startereinheiten sowie aus der Variabilität in der Anzahl der Elongationseinheiten. Zudem eröffnen die Zyklisierungsreaktionen weitere Strukturmöglichkeiten. Bezeichnend für diese PKS ist auch ihre ACP-Unabhängigkeit. Statt die Polyketidkette an ein ACP zu binden verwenden diese PKS Acyl-CoA Thioester.³¹

6.4 *Trans*-AT-PKS

Es gibt jedoch eine Untergruppe der multimodularen PKS I, deren Module sehr ungewöhnliche Architekturen besitzen. Dies macht eine Vorhersage der Naturstoffstruktur nach der Kolinearitätsregel unmöglich. Manche Module werden gar nicht zur Kettenverlängerung eingesetzt, andere hingegen werden mehrfach genutzt.³¹ Auch kann die Struktur des Polyketids an einigen Stellen von der gemäß der Domänenabfolge erwarteten Struktur abweichen. Die Untergruppe, die diese Abweichungen zeigt, wird als *trans*-AT-PKS bezeichnet. Diese werden von den *cis*-AT-PKS aufgrund ihrer nicht in den Multienzymkomplex integrierten, externen, also *in trans* fungierenden AT abgegrenzt (Abb. 7).³²

cis-AT-PKS

trans-AT-PKS

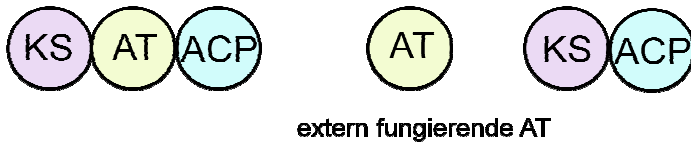


Abb. 7: *cis*-AT-PKS und *trans*-AT-PKS.

Erstmals beschrieben worden sind diese außergewöhnlichen PKS anhand des Pederin-Genclusters (Abb. 8).³³

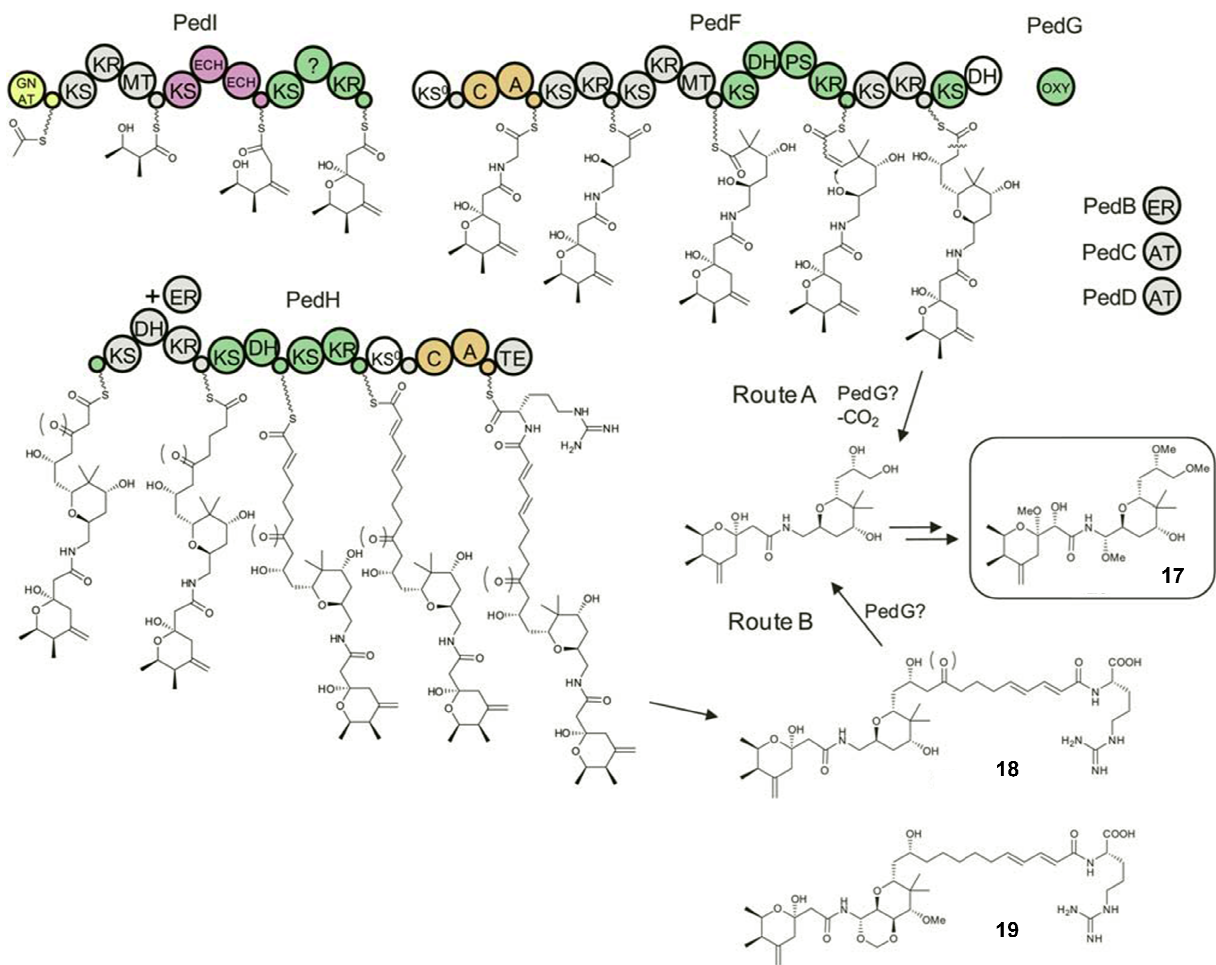


Abb. 8: Biosynthese des Pederins (**17**).³⁴ Für die Biosynthese des Pederins (**17**) sind zwei alternative Wege denkbar. Nach Route A wird die Polyketidkette nach der Katalyse durch PedF nicht weiter verlängert und von der Oxygenase PedG abgespalten. Route B zu folge wird auch PedH durchlaufen und das zu Dihydroonnamid (**19**) sehr ähnliche Produkt **18** im nachhinein durch PedG abgespalten.

Der *ped*-Gencluster wurde von J. Piel bei der PCR-Analyse von metagenomischer DNA der *Paederus* Käfer isoliert. Dabei stellte sich heraus, dass der Gencluster nur bei Weibchen mit

hohem Pederingehalt zu finden war, was auf eine Lokalisation des Genclusters in einem Symbionten nahe legte. Mittels Zellseparationsstudien und genomischen Analysen konnte so ein *Pseudomonas* sp.-Symbiont als der eigentliche Träger des Genclusters ermittelt werden. Eine außergewöhnliche Eigenschaft für die PKS war ihre Aufteilung auf drei individuelle Genomregionen. Die Domänenanalyse zeigte, dass die PKS eine ausgezeichnete architektonische Übereinstimmung mit der Struktur des Pederins (**17**) aufwies. Die größte Abweichung von der Kolinearitätsregel zeigten die letzten sechs Module (PedH), die keine strukturelle Entsprechung im Pederin (**17**) hatten. Die Vorhersage des fehlenden Strukturteils nach *trans*-AT-PKS und nichtribosomalen Peptidsynthasen (NRPS)-Regeln führte zu einer Substanz, die fast identisch mit Dihydroonnamid A (**19**) war. Dieses ist ein aus dem marinen Schwamm *Theonella* sp. isolierter natürlicher Metabolit. Folglich konnten erhebliche Übereinstimmungen zwischen den Biosynthesewegen von Pederin und Onnamid verzeichnet werden. Für die Biosynthese des Pederins waren zwei alternative Wege denkbar, die in Abb. 8 erläutert sind.³⁴

Weitere Beispiele für *trans*-AT-PKS-Systeme sind das Leinamycin³⁵ (**20**) und das Bacillaen³⁶ (**21**).

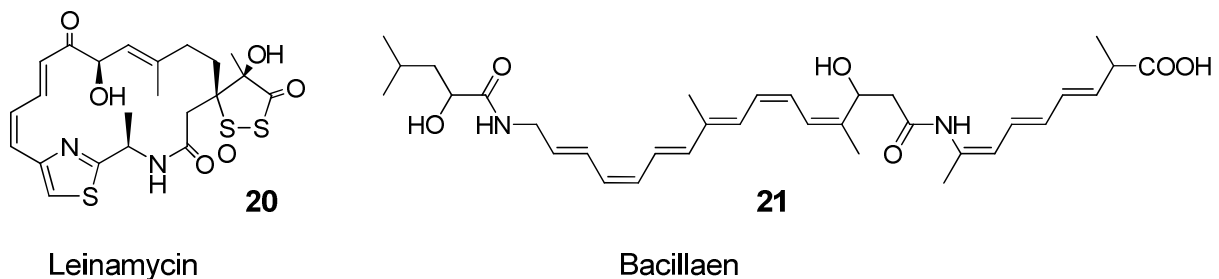


Abb. 9: Produkte von *trans*-AT-PKS

Aufgrund ihrer ähnlichen Mechanismen und Produkte wäre anzunehmen, dass *cis*-AT-PKS und *trans*-AT-PKS eine ähnliche Phylogenie aufweisen. Untersuchungen hinsichtlich dieser brachten jedoch überraschenderweise zu Tage, dass die phylogenetischen Ursprünge dieser beiden modularen PKS verschieden sind. Für die phylogenetischen Analysen wurden aufgrund ihrer hochkonservierten Abschnitte KS-Sequenzen verwendet. Diesem Stammbaum ist deutlich zu entnehmen, dass nur geringe evolutionäre Verwandtschaft zwischen *cis*- und *trans*-AT-PKS existiert und sich diese beiden PKS evolutionsgeschichtlich unabhängig voneinander aus einfachen FAS-Systemen entwickelt haben.³² Der Stammbaum der KS von *cis*-AT-PKS zeigt eine deutliche Korrelation der phylogenetischen Positionen von

KS mit der Naturstofffamilie. Dies deutet darauf hin, dass die Gencluster durch Modulduplikation entstanden sind und eine optionale Änderung der Domänen in den einzelnen Modulen stattgefunden hat.³⁷

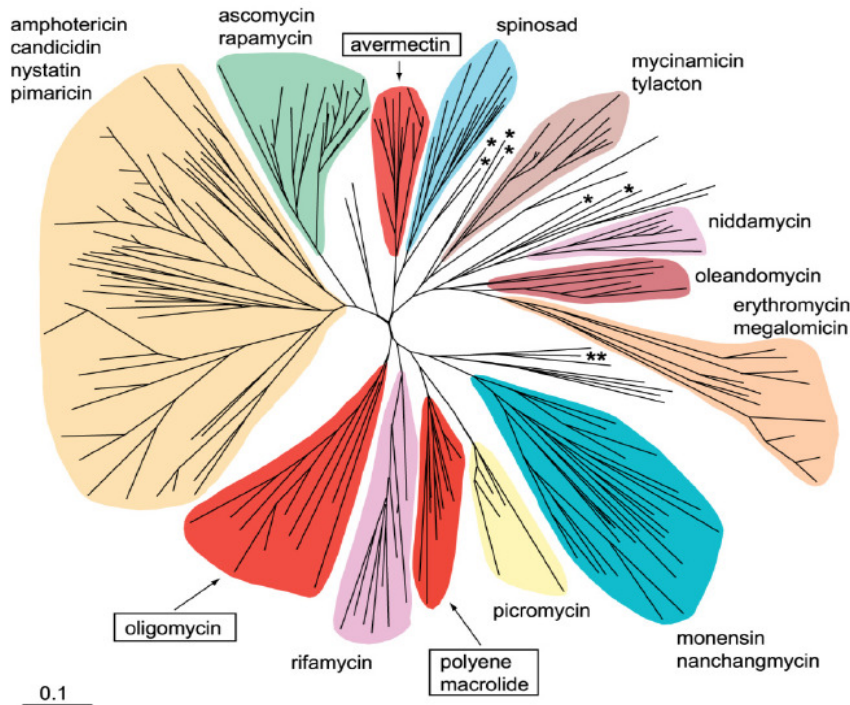


Abb. 10: Phylogenie der KS-Domänen von *cis*-AT-PKS.³⁷

Diesen Zusammenhang kann man bei den *trans*-AT-PKS nicht beobachten. Hier liegen DNA-Mosaik Strukturen vor, d.h. die Gencluster sind evolutionsgeschichtlich gesehen aus Abschnitten von anderen Genclustern zusammengesetzt.³⁸ Ursache hierfür könnte ein im Vergleich zu *cis*-AT-PKS häufigerer horizontaler Gentransfer oder/und eine einfachere Faltung und Expression dieser Proteine nach dem Gentransfer sein. Interessant ist die Entdeckung, dass eine Korrelation zwischen der Verwandtschaft der KS-Domänen und ihrer Funktionsweise zu Grunde liegt (Abb. 11).³⁸

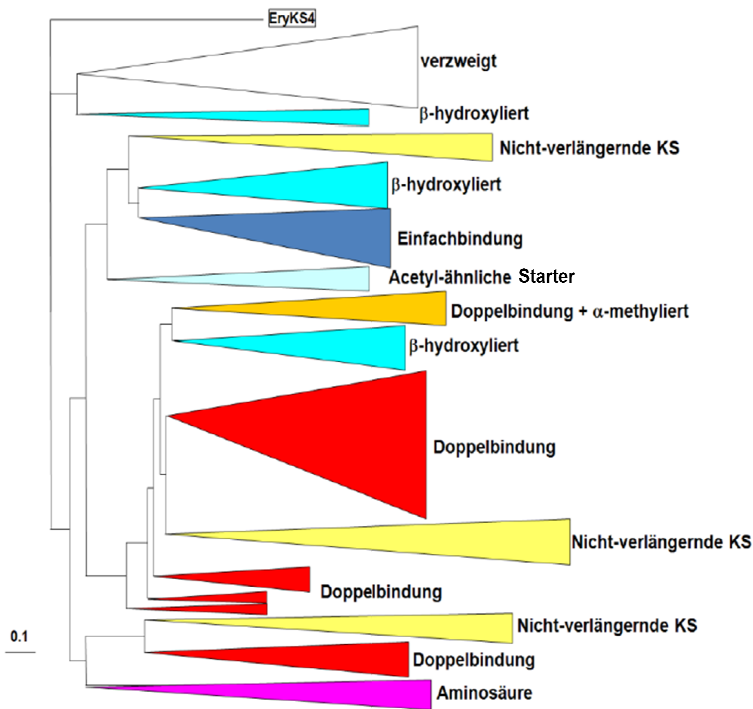


Abb. 11: Phylogenie der *trans*-AT PKS. Die Verwandtschaft der KS-Domänen korreliert mit deren Funktionsweise.

War eine Vorhersage der Naturstoffstruktur, wie bei den *cis*-AT-PKS nach der Kolinearitätsregel, für die *trans*-AT-PKS aufgrund ihrer ungewöhnlichen Modularchitekturen bisher nicht möglich, so erlaubte es dieser Zusammenhang nun eine recht präzise Vorhersage zu machen. Die *in silico* Analyse der vorliegenden KS in einer *trans*-AT-PKS mit bislang unbekanntem Produkt liefert Hinweise darauf, welche Funktion der jeweiligen KS zugrunde liegt. Anhand dieses Wissens lassen sich Rückschlüsse auf die Struktur des Naturstoffs ziehen.

6.5 PKS/NRPS-Hybride

Ein Großteil der in Bakterien und Pilzen vorkommenden strukturell komplexen Peptide wird von nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) synthetisiert. Als Bausteine können Amino-, Carboxy- und Hydroxysäuren verwendet werden, was zu einer beträchtlichen Diversität der NRPS-Produkte führt.³⁹ Viele dieser Substanzen haben eine biologische Aktivität. Eine antibiotische Wirkung zeigen z.B. Penicillin (**22**) und Vancomycin (**23**). Aber auch toxische (z.B. Syringomycin (**24**)) und immunsuppressive (z.B. Rapamycin (**25**) und Cyclosporin (**26**)) Naturstoffe erweitern das Spektrum der Eigenschaften (Abb. 12).

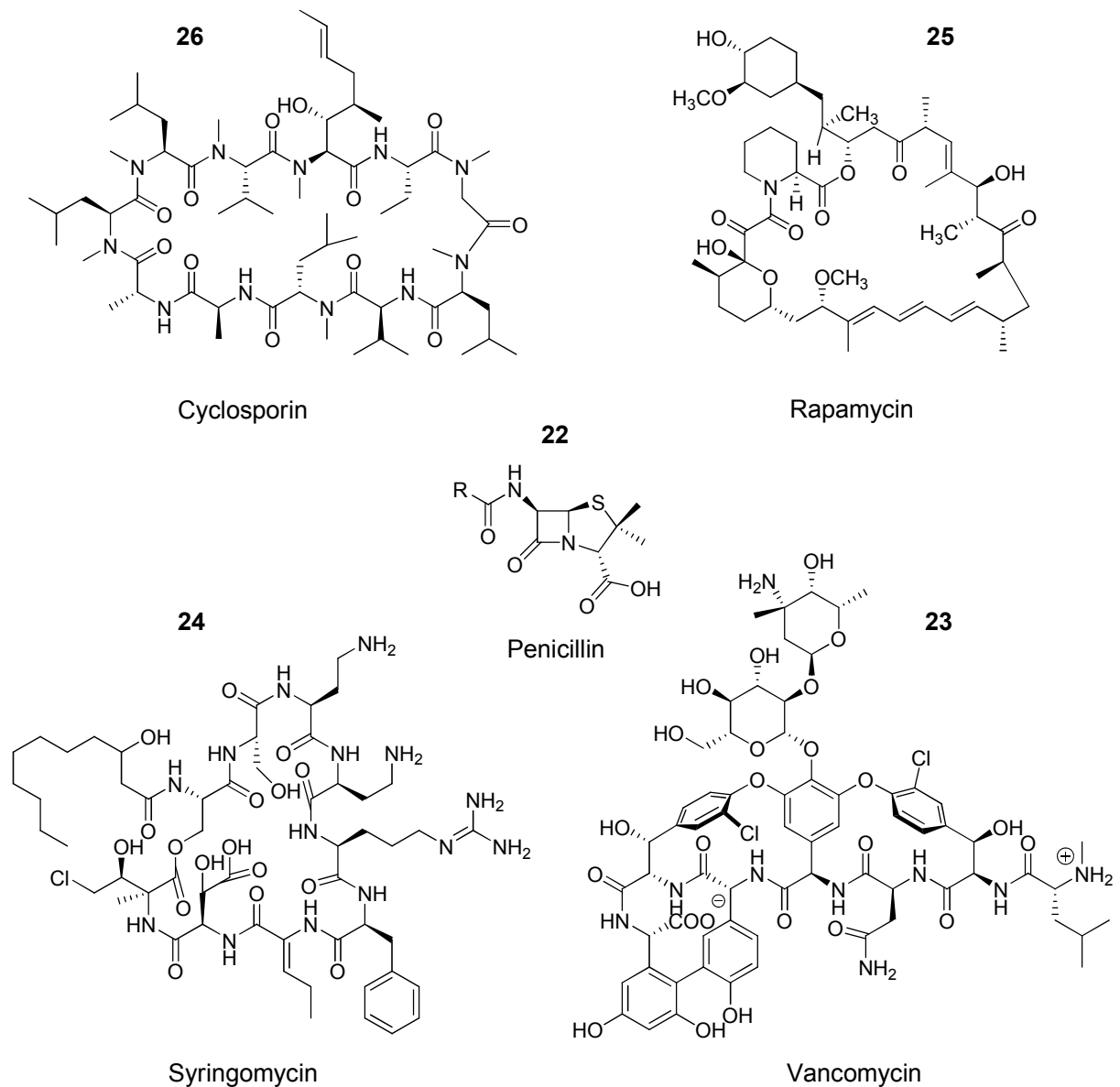


Abb. 12: Beispiele für PKS/NRPS-Hybrid-Produkte

NRPS weisen analog zu vielen PKS-Systemen des Typs-I eine modulare Organisation auf und verbinden Aminosäurenreste durch einen Multiple-Carrier-Thiotemplat-Mechanismus.⁴⁰ Wie bei den Typ-I PKS besteht auch hier ein Minimalmodul aus drei Domänen, die auch ähnliche Funktionen wie im Falle der PKS übernehmen. Zu diesen drei Domänen zählt die Adenylierungsdomäne (A-Domäne), die Kondensationsdomäne (C-Domäne) und das Peptidyl-Carrier-Protein (PCP). Die Adenylierungsdomäne wählt selektiv eine Aminosäure aus und generiert mittels ATP das zugehörige Aminoacyladenylat. Der Aminoacylrest wird dann kovalent an die Thiolgruppe des prosthetischen Phosphopantetheinylteils (Ppant) der PCP-Domäne gebunden. Die Ppant-Gruppe wurde im Vorfeld posttranslational durch eine Ppant-Transferase an die PCP-Domäne gebunden. Die C-Domäne katalysiert die

Übertragung des so generierten Intermediats auf eine weitere Acylaminosäure, die von dem nächsten stromabwärts gelegenen Modul geliefert wird. Diese Verknüpfung findet mittels einer Peptidbindung statt. In weiteren Modifikationen können die Monomere z.B. durch Epimerisierung oder/und *N*-Methylierung und das Peptidrückgrat durch Acylierung, Glykosylierung oder/und Heterozyklisierung weitergehend funktionalisiert werden.^{39,41} Diese Tailoringreaktionen werden durch spezielle Domänen oder aber bei der Fusion mit PKS-Modulen katalysiert.⁴²⁻⁴⁴

Aufgrund ihrer verwandten Organisation und Funktionsmechanismen konnten in der Evolution Hybride zwischen NRPS- und PKS-Gencluster hervorgebracht werden.^{17,45} Entsprechend findet man Verbindungen, die Strukturelemente beider Systeme enthalten. Diese PKS/NRPS-Hybride treten sehr häufig auf. Beispiele für solche Hybridsysteme sind z.B. Rapamycin⁴⁶ (**25**) und das in dieser Arbeit behandelte Bacillaen (**21**), in dessen PKS-Gencluster auch zwei NRPS-Module integriert sind.⁴⁷ Eine für diese Arbeit sehr interessante Beobachtung ist, dass *cis*-AT-PKS/NRPS-Gencluster besonders gehäuft in Cyanobakterien vorkommen.⁴⁸

6.6 Polyketide aus *Bacillus amyloliquefaciens*

6.6.1 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42

Bacillus amyloliquefaciens FZB42 ist ein Gram-positives, pflanzenassoziiertes Rhizobakterium, das Pflanzenwachstum stimuliert und sekundäre Metabolite produziert, die bodenbürtige Pflanzenpathogene unterdrücken. 8,5% des 3.92 Mb großen Genoms codieren für die nicht ribosomale Synthese von Antibiotika und Siderophoren.⁴⁹ Zu den von *Bacillus amyloliquefaciens* synthetisierten Polyketiden zählen Bacillaen (**21**), Difficidin (**27**) und Macrolactin (**28**), während die Lipopeptide Surfactin (**29**), Bacillomycin D (**30**) und Fengycin (**31**), auf dem nichtribosomalen Peptidweg entstehen (Abb. 13).

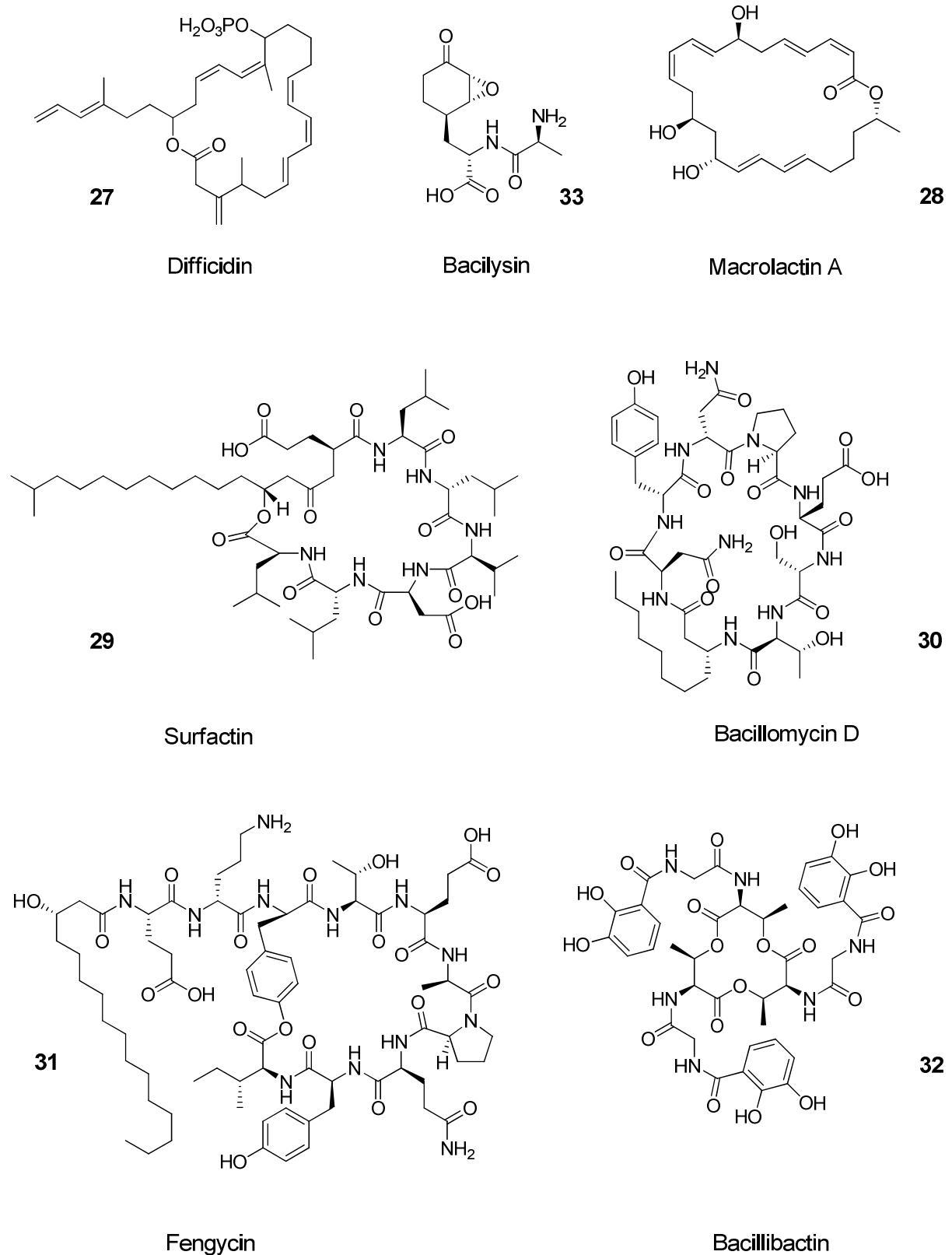


Abb. 13: Von *Bacillus amyloliquefaciens* produzierte Polyketide

Beispiele für Siderophore sind das Bacillibactin (**32**) und das Produkt des *nrs*-Genclusters.⁵⁰⁻

⁵² Die Expression dieser Gencluster ist abhängig von dem *sfp*-Gen, das für eine 4'-

Phosphopantethein-Transferase (Sfp) codiert. Diese modifiziert in einem posttranslationalen Schritt die ACPs und PCPs und ist somit unerlässlich für die Biosynthese der oben genannten Substanzen. Von der Sfp unabhängig ist dagegen das Dipeptid Bacilysin (**33**).⁵³⁻⁵⁵ Der Vergleich mit dem Modellorganismus *Bacillus subtilis* 168 zeigt, dass bei diesem das *sfp*-Gen eine Mutation aufweist, so dass die Bildung der Sfp abhängigen Substanzen nicht zustande kommt. Der Prozentanteil des Genoms, der für die Biosynthese nichtribosomaler Sekundär-metabolite codiert, ist nur halb so groß wie bei *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42.⁵³ So ist es nicht verwunderlich, dass sich *Bacillus subtilis* 168 von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 auch hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Stimulation von Pflanzenwachstum und Unterdrückung von Pflanzenpathogenen unterscheidet.⁵⁶ In den folgenden Abschnitten wird auf das Bacillaen (**21**) und seine Biosynthese näher eingegangen. Dieses ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse, weil die KS-Domänen der Bacillaen-PKS als Modell dienen, um neue Erkenntnisse über die Substratspezifität von KS in *trans*-AT-Systemen zu gewinnen.

6.6.2 Bacillaen

Das Bacillaen (**21**) ist ein hochkonjugiertes, lineares Polyen, das eine *cis*-Doppelbindung aufweist. Die Geschichte seiner Entdeckung und Genclusterzuordnung ist besonders interessant, da sie neue Möglichkeiten zur Suche nach sekundären Metaboliten mittels ihrer Gencluster aufzeigt.

Die *pksX* PKS-Gene wurden 1993 bei einer Genomsequenzierung von *Bacillus subtilis* 168 entdeckt.³⁶ Mittels Kryoelektronenmikroskopie konnte man beobachten, dass die PKS-Proteine zu einer zellorganellartigen Struktur assemblieren, deren Durchmesser mehr als 0,1 µm beträgt.⁵⁷ Jedoch gelang es erst 2006, das Bacillaen (**21**) als das Produkt des *pksX*-Genclusters zu ermitteln. Dabei wurde der Bacillaengencluster (*bae*), der dem *pksX*-Gencluster in *Bacillus subtilis* 168 fast identisch ist, in *Bacillus amyloliquefaciens* gefunden. Das ihm entsprechende Produkt konnte dank der Kombination von Kassettenmutagenese und erweiterter Massenspektrometrietechniken detektiert werden, auch wenn an dieser Stelle noch keine komplette Strukturaufklärung des Bacillaens (**21**) gelang.⁵² Die Strukturaufklärung dieses antibiotisch wirkenden Polyketids gestaltete sich aufgrund dessen Instabilität äußerst schwierig. 2007 gelang es dann aber erstmals die Struktur des Bacillaens (**21**) mit Hilfe von 2D NMR Techniken aus teilweise aufgereinigten Kulturextrakten von *Bacillus subtilis* aufzuklären und einen Verlauf der Biosynthese zu postulieren.⁵⁸

6.6.3 Bacillaenbiosynthese

Der Bacillaen-Gencluster (Abb. 14 und Abb. 15) codiert für einen *trans*-AT-PKS/NRPS-Hybriden, da seine drei AT-Domänen *in trans* agieren⁵⁷ und es zusätzlich zwei NRPS-Module beinhaltet.⁵⁹

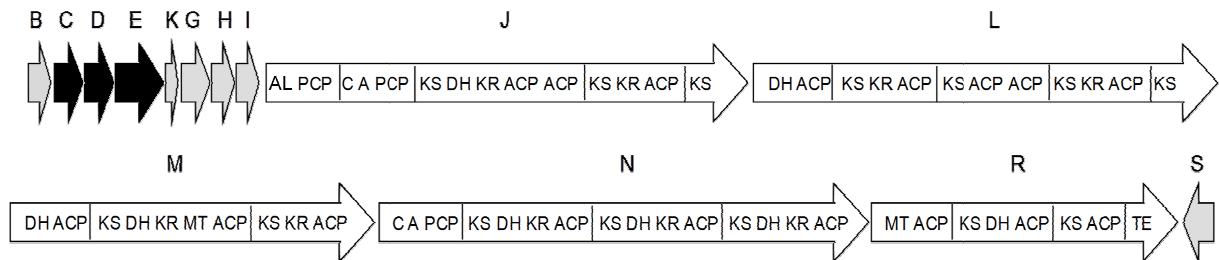


Abb. 14: Bacillaen-Gencluster von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Für die *trans*-AT-Enzyme codieren die Gene *pksC*, *D* und *E*. KS: Ketosynthase; KS⁰: inaktive Ketosynthase; AT: Acyltransferase; ACP: Acyl-Carrier-Protein; DH: Dehydratase; KR: Ketoreduktase; MT: Methyltransferase; A: Adenylierungs-Domäne; C: Kondensations-Domäne; PCP: Peptidyl-Carrier-Protein; TE: Thioesterase

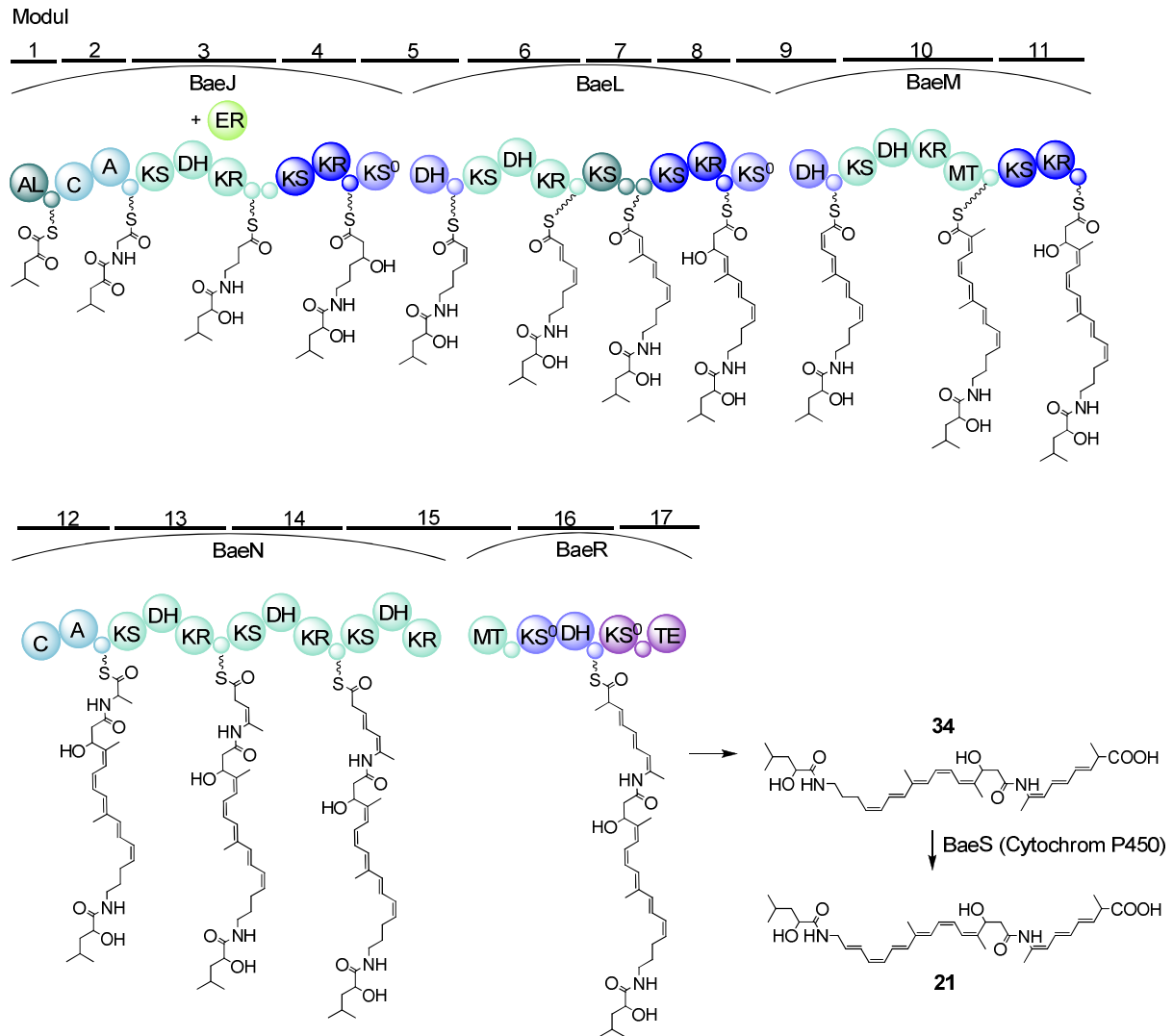


Abb. 15: Biosyntheseweg des Bacillaens. Für die Abkürzungen siehe (Abb. 14).

Wie häufig bei diesen Systemen wird auch hier die Kolinearitätsregel nicht eingehalten. Der Bacillaen-Gencluster zeigt fünf open reading frames (PksJ-R) für die verlängernden Modulabschnitte. PksJ initiiert die Bacillaenbiosynthese und enthält das erste NRPS-Modul, das einen Glycinrest einbaut.⁵⁸ Interessanterweise endet PksJ mit einer einzelnen KS, deren Modulkomplementierung der Aminoterminus von PksL erfüllt. Dieses bei *trans*-AT-PKS häufig vorkommende Phänomen wiederholt sich im Falle von PksL und PksM, wo das Modul auf die gleiche Weise gesplittet wird. PksN zeigt am Carboxyterminus ebenfalls ein geteiltes Modul und beherbergt das zweite NRPS-Modul, das eine Alanin-Einheit integriert.⁵⁸ Die Synthese der Polyketidkette wird durch PksR beendet.

Die drei *trans*-ATs werden von *pksC*, *D* und *E* codiert. Bei der *trans*-AT, die von *pksE* codiert wird, handelt es sich um eine Didomäne. Sie ist mit einer Domäne fusioniert, die

bioinformatisch als Flavinmononucleotid abhängige Oxidoreduktase (OxR) zugeordnet worden ist.⁵⁸ PksE katalysiert die Sättigung der Doppelbindung zwischen C22 und C23 des Bacillaens (**21**) und fungiert somit als externe ER.⁶⁰ Die anderen beiden *trans*-ATs sind Monodomänen. Die von *pksC* codierte *trans*-AT lädt bevorzugt ACPs mit Malonyl-CoA statt Acetyl- und Methylmalonyl-CoA.⁶¹ Ferner enthält der Syntheseweg diskret arbeitende Enzyme wie PksB (Hydrolase), PksK (KS), PksG (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase (HMGS)), PksH/I (Enoyl-CoA Dehydratase (ECH)) und PksS (P450 Monooxygenase).³⁴

Umfassende Experimente wurden unternommen, um ein detailliertes Verständnis des Bacillaen-Biosynthesewegs zu erhalten. Dabei wurden unter anderem die Post-PKS/NRPS-Tailoringenzyme und der Mechanismus, der zum β -Branch führt, näher untersucht. Der β -Branch ist die Transformation einer Ketofunktion zu einer Kohlenstoffmethylverzweigung (Abb. 16).

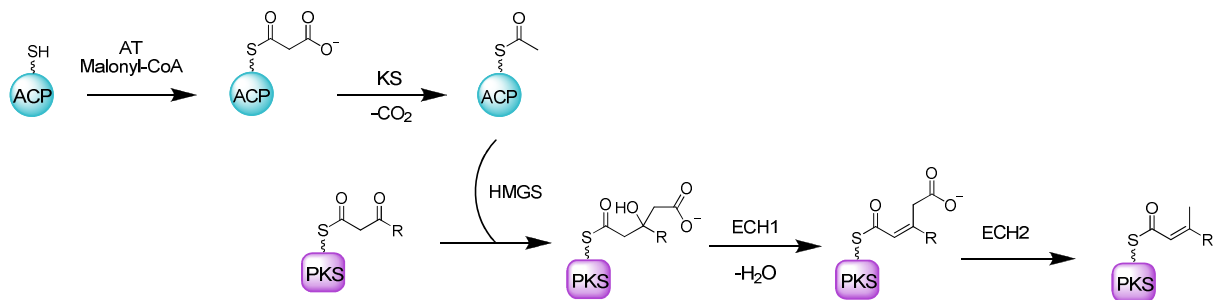


Abb. 16: Formation einer Bacillaen β -Kohlenstoffverzweigung. HMGS, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Synthase; ECH, Enoyl-CoA Dehydratase

Diese bei vielen von *trans*-AT-PKS synthetisierten Polyketiden auftretende Kohlenstoffverzweigung wird in mehreren Schritten eingeführt. Der erste Schritt ist eine Decarboxylierung von Malonyl-ACP zu Acetyl-ACP, die von einer diskret arbeitenden KS katalysiert wird. Im nächsten Schritt folgt eine Aldoladdition der Acetateinheit mittels der HMGS. Abschließend erfolgt eine Dehydratation sowie eine Decarboxylierung durch die ECH.⁶¹⁻⁶⁴

Eine andere interessante Entdeckung war die Beteiligung des Enzyms PksS an der Umwandlung von Dihydrobacillaen (**34**) zu Bacillaen (**21**) (Abb. 14).³⁴ Es können immer beide Substanzen in *Bacillus subtilis* gefunden werden, aber anfangs war unklar, welche der beiden Substanzen das eigentliche Endprodukt war. Durch vergleichende PksS-Sequenzanalysen konnte diese als ein Cytochrom P450 identifiziert werden.⁶⁵⁻⁶⁷ Ein erster Hinweis darauf, dass das Cytochrom P450 das Dihydrobacillaen (**34**) zu Bacillaen (**21**) hydroxyliert, gaben die Versuche von Reddick *et al.* Bei diesen wurden *Bacillus subtilis*-

Extrakte, in denen beide Substanzen vorhanden waren, mit dem geklonten und überexprimierten Cytochrom P450 versetzt. Das hatte zur Folge, dass kein Dihydrobacillaen (**34**) mehr nachgewiesen werden konnte.⁶⁸ Letztendlich validiert werden konnte diese Hypothese durch die Arbeit von Piel *et al.*, in deren Rahmen eine Mutante erzeugt worden ist, bei der die Thioesterase und das Enzym PksS deletiert worden sind. In den Extrakten ließen sich 13 Polyketidintermediate anwachsender Kettenlänge finden, deren Biosynthese zum Stillstand gebracht wurde und die von ihrem entsprechenden Modul losgelöst worden waren.^{69,70} Die Identifikation dieser Intermediate erlaubte einige neue Einblicke in die Bacillaenbiosynthese. Hinsichtlich des Enzyms PksS konnte anhand der entsprechenden Intermediate abgeleitet werden, dass es als Desaturase die Reaktion von Dihydrobacillaen (**34**) zu Bacillaen (**21**) katalysiert.

6.7 Pederin und verwandte Substanzen

Die Pederinfamilie zählt inzwischen weit mehr als dreißig Mitglieder, deren Zahl immer noch durch neu entdeckte pederinartige Substanzen wächst.⁷¹ Pederin (**17**) ist ein äußerst cytotoxisches und dermatotoxisches Polyketid, das von den bisher nicht kultivierbaren bakteriellen *Pseudomonas*-Symbionten von *Paederus*-Käfern (Abb. 17) erzeugt wird.⁷²



Abb. 17: *Paederus fuscipes* (Bildautor: Christoph Benisch - Bildquelle: www.kerbtier.de)

Nähere Untersuchungen ergaben eine enge Verwandtschaftsbeziehung des Symbionten zu *Pseudomonas aeruginosa*.⁷² Der bakterielle Symbiont lässt sich in speziellen Anhangdrüsen des Abdomens der weiblichen *Paederus*-Käfer finden,⁷³ wobei nur 90% der weiblichen Käfer diesen Symbionten in sich tragen.⁷⁴ Diese geben das Toxin bei der Eiablage an die Larven weiter, die in der Lage sind, dieses zu speichern. Es übernimmt als chemische Abwehrsubstanz eine Schutzfunktion gegen Fressfeinde.⁷⁵

Pederin (**17**) weist auch sehr interessante, möglicherweise pharmakologisch nutzbare Bioaktivität auf. Es fungiert als ein Inhibitor der Proteinbiosynthese,⁷⁶ indem es an das Ribosom bindet.⁷⁷ Der ribotoxische Stress, der dadurch verursacht wird, führt zur Apoptose.⁷⁸ Diese Eigenschaften verhelfen Pederin (**17**) und Pederin-artigen Substanzen zu einer beachtlichen antitumoralen Wirkung.⁷⁹

Die dem Pederin (**17**) zugehörige Ped-PKS ist die erste *trans*-AT-PKS, die einem Produkt zugewiesen werden konnte (Abb. 8).³³ Mit Hilfe von Screeninganalysen des Metagenoms konnte dieser erste *trans*-AT-PKS-Gencluster identifiziert werden. Er erstreckt sich über drei verschiedene genomische Regionen, wobei die ersten beiden Gene *pedI* und *pedF* für den Aufbau des Polyketidrückgrats codieren, während die Funktion von *pedG* noch umstritten ist. Die hauptsächlichsten Abweichungen des *ped*-Genclusters von der Kolinearitätsregel zeigen sich vor allem darin, dass die letzten sechs Module des *pedH* keine strukturelle Entsprechung zum Pederin zeigen. Es gibt zwei denkbare Alternativen für die Biosynthese der Pederinstruktur, die beide die Funktion der von *pedG* codierten Oxygenase einschließen. Zum einen wäre ein Szenario (Abb. 8) möglich, bei dem *pedG* eine Geninsertion darstellt, die den Ablauf der Biosynthese nach *pedF* unterbricht und die Oxygenase das "unfertige" Polyketid abspaltet. Zum anderen könnte zunächst PedH durchlaufen und das Produkt im Anschluß durch die Oxgenase gespalten werden. Interessanterweise ist das vorhergesagte Produkt des *ped*-Genclusters fast identisch dem Dihydroonnamid A (**19**), das aus dem marinen Schwamm *Theonella* sp. isoliert werden konnte.³⁴ Darüber hinaus sind einige andere Substanzen, die sowohl biosynthetische als auch strukturelle Übereinstimmungen mit dem Pederin (**17**) zeigen, der "Pederinfamilie" zugehörig (Abb. 18).

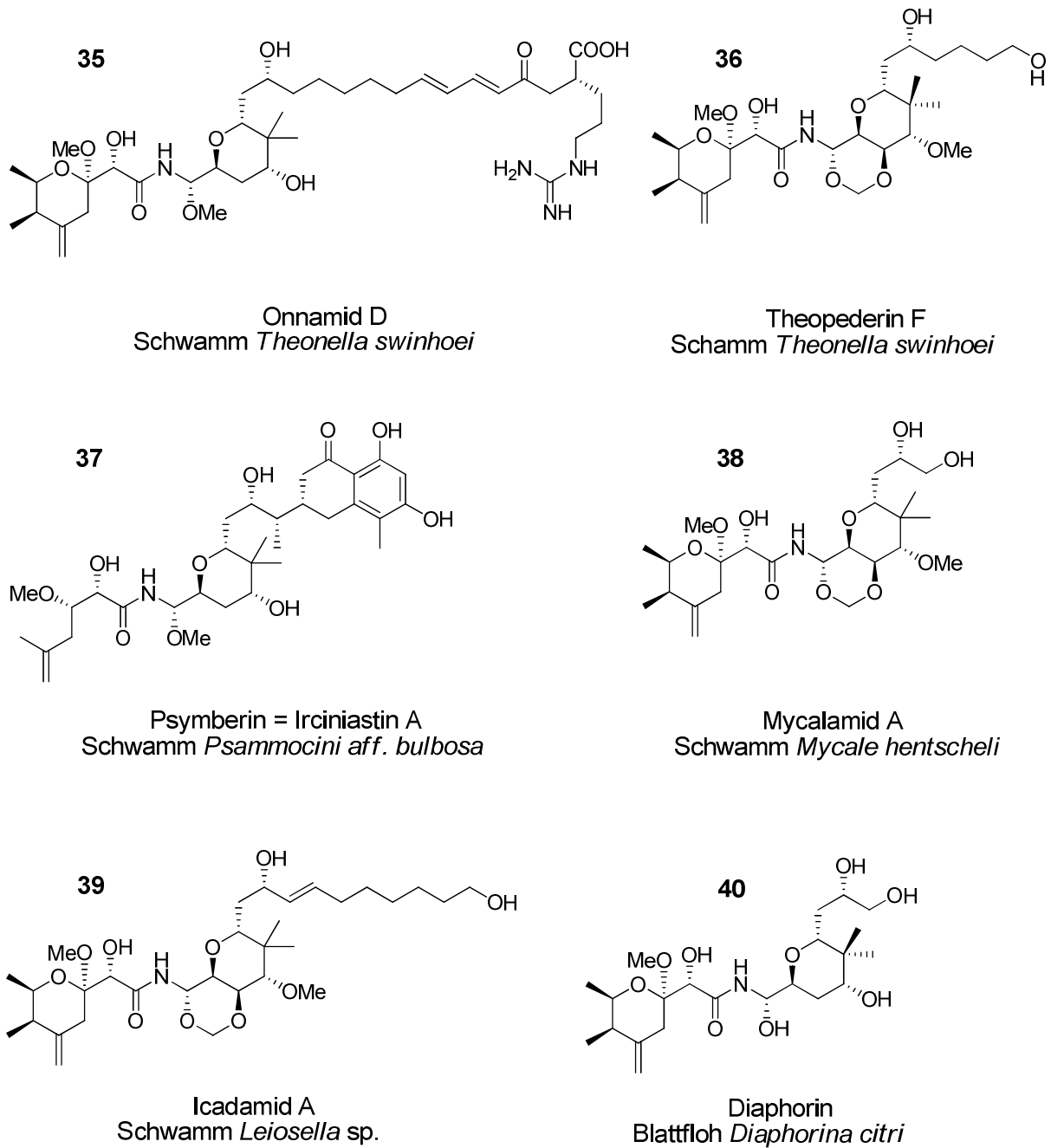


Abb. 18: Vertreter pederinartiger Polyketide und ihre Quellen

Dazu zählen Onnamide (**35**), Theopederine (**36**), Irciniastatine (**37**), Mycalamide (**38**) und Icadamide (**39**), die sehr wahrscheinlich alle Symbionten von Schwämmen entstammen, wie im Falle des Psymberins (**37**) schon nachgewiesen werden konnte.⁸⁰ Viele von ihnen weisen cytotoxische Eigenschaften auf. Einige Mycalamide sind ebenfalls dermatotoxisch.³⁴ Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Pederin (**17**) war auch eine Verwandtschaft der Sequenzen ihrer Gencluster zu vermuten. Das erleichterte die Detektion der entsprechenden

Aminosäuresequenzen. Wie vermutet handelt es sich bei ihnen um *trans*-AT-PKS-Systeme.⁷¹ Auch das kürzlich entdeckte Diaphorin (**40**) gliedert sich in die Pederinfamilie ein. Interessanterweise entstammt dieses jedoch dem Betaproteobakterium *Proffella armatura*, das als Endosymbiont der Blattfloh-Art *Diaphorina citri* lebt.⁸¹ Diese unterschiedlichen Symbionten aus Organismen sehr diverser Habitate weisen auf einen horizontalen Gentransfer der pederinartigen Gencluster hin, der sich in das Genom phylogenetisch und ökologisch diverser Bakterienlinien integriert hat.⁸²

6.8 Cyanobakterien

Cyanobakterien sind in vielen Ökosystemen integriert und spielen weltweit eine enorme Rolle bei biogeochemischen Zyklen. Sie besiedeln diverse Habitate, zu denen neben marinen, Süßwasser- und terrestrischen Gebieten auch extreme Lebensräume wie die Antarktis oder heiße Quellen zählen.⁸³ Cyanobakterien gehörten bis in jüngere Zeit nicht zu den etablierten Quellen von Naturstoffen. Lange Zeit beschränkte man sich darauf, nur ihre Toxine zu untersuchen.⁸⁴ Eines der bedeutendsten und bestuntersuchtesten davon ist das Microcystin aus *Microcystis aeruginosa* (Abb. 19).

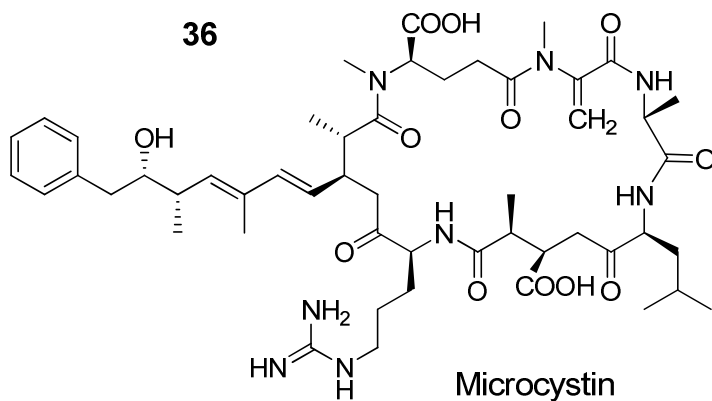


Abb. 19: Microcystin aus *Microcystis aeruginosa*

Der zugehörige *mcy*-Gencluster wurde als erster NRPS/PKS-Gencluster in einem Cyanobakterium identifiziert und charakterisiert.^{85–87} Mit dem Beginn der 80iger Jahre wurden mittels Bioaktivitätsscreeningtests einige aussichtsreiche Substanzen gefunden, die cytotoxische, Protease-inhibierende, antifungale und antivirale Aktivitäten aufweisen.⁸⁸ Viele dieser bioaktiven Metabolite gehören den Peptiden und Makroliden an. Auch ist eine

Kombination beider nicht selten zu beobachten.⁸⁹⁻⁹¹ In den letzten beiden Jahrzehnten konnten viele Metabolite einem Gencluster zugeordnet werden.^{90,92} Die hohe Diversität an sekundären Metaboliten in Cyanobakterien und ihre chemischen Strukturen lassen vermuten, dass eine hohe Anzahl an NRPS- und PKS-Gencluster vorhanden ist. Einer Vielzahl von Metaboliten konnte aber bis heute kein Gencluster zugeordnet werden. Eine Besonderheit sekundärer Metabolite in cyanobakteriellen Genomen ist das gehäufte Auftreten von NRPS/PKS-Hybriden.⁹⁰ Eine Methode, um in den verschiedenen Cyanobakterientaxa nach NRPS- und PKS-Genen zu suchen, ist die Verwendung von degenerierten Primern bei der Polymerasekettenreaktion (PCR). Mit dieser Studie wurden in 75% von 146 axenischen Cyanobakterienstämmen NRPS-Gencluster nachgewiesen.⁹³ Ähnliche Studien führten zu Entdeckung von NRPS- und PKS-Genclustern in weiteren Cyanobakterientaxa, die mit Stromatolithen assoziiert sind.⁹⁴ Aufgrund solcher und weiterer Ergebnisse ist anzunehmen, dass Cyanobakterien eine reiche Fundgrube für neue NRPS und/oder PKS Gene sind, die für die Biosynthese von Metaboliten mit möglicherweise pharmazeutisch nutzbaren Bioaktivitäten codieren. Im Folgenden wird das biosynthetische Potential der Gattung *Nostoc* näher betrachtet, da in dieser Arbeit mit einem Vertreter dieser Gattung gearbeitet wurde.

Bemerkenswerterweise beinhaltet das Genom von Arten mit kleinem Genom keine NRPS/PKS-Gene, während Arten mit einem verhältnismäßig großen Genom mehrere Cluster beherbergen, die mehr als 5% der genomischen Sequenz ausmachen können. Letztere Arten lassen sich z.B. besonders häufig innerhalb der beiden Gattungen *Crocospaera* und *Nostoc* finden.⁹⁰ Die Gattung *Nostoc* ist eine ökologisch, morphologisch und physiologisch diverse Gruppe meist bodenlebender Mikroorganismen, die eine potentielle Quelle für viele Naturstoffe darstellt.⁹⁵ Ihre ökologische Rolle kann so signifikant sein, dass sie ihre Umwelt durch die Produktion und Wirkweise ihrer biologisch aktiven Metabolite beeinflussen.⁴⁸ Die Naturstoffe weisen eine große Vielfalt, sowohl in ihrer biologischen Aktivität, als auch in ihrer chemischen Komposition auf. Letztere beinhaltet cyclische und lineare Lipopeptide, Fett- und Aminosäuren, Amide, Ester, Lactone, Alkaloide und andere Verbindungen.^{89,96} Unter diesen Verbindungen konnten viele neue Wirkstoffe mit cytotoxischen,⁹⁶ antifungalen,⁹⁷ antibakteriellen,⁹⁸ immunsuppressiven,⁹⁹ Enzym-inhibierenden und antiviralen^{100,101} Eigenschaften identifiziert werden. Folgend werden einige Beispiele von Naturstoffen in *Nostoc* spp. genannt.

In *Nostoc punctiforme* gelang es zum erstenmal, einen NRPS/PKS Gencluster zu identifizieren, der einem terrestrischen Bakterium entstammt. Der *nos*-Gencluster codiert für das Nostopeptolid^{102,103} (**42**) (Abb. 20), das keine cytotoxische, antifungale oder Protease-hemmende Bioaktivität zeigt und dessen ökologische Rolle damit völlig im Dunkeln liegt.¹⁰³

Nostocyclopeptide (**43**) (Abb. 20), die von einem reinen NRPS-Gencluster in *Nostoc* sp. ATCC 53789 synthetisiert werden, zeigen eine schwache Zytotoxizität gegen humane Karzinome.⁹⁵ Ein weiterer NRPS/PKS-Gencluster tritt in mehreren terrestrisch, aber auch in Symbiose mit Flechten lebenden *Nostoc*-Stämmen auf und codiert für das Cryptophycin (**44**) (Abb. 20).¹⁰⁴ **44** ist ein hochpotenter Inhibitor der Mikrotubulibewegung und wirkt damit gegen ein weites Spektrum von Tumoren, inklusiver solcher, die eine Pharmazeutika Multiresistenz aufweisen.^{105,106}

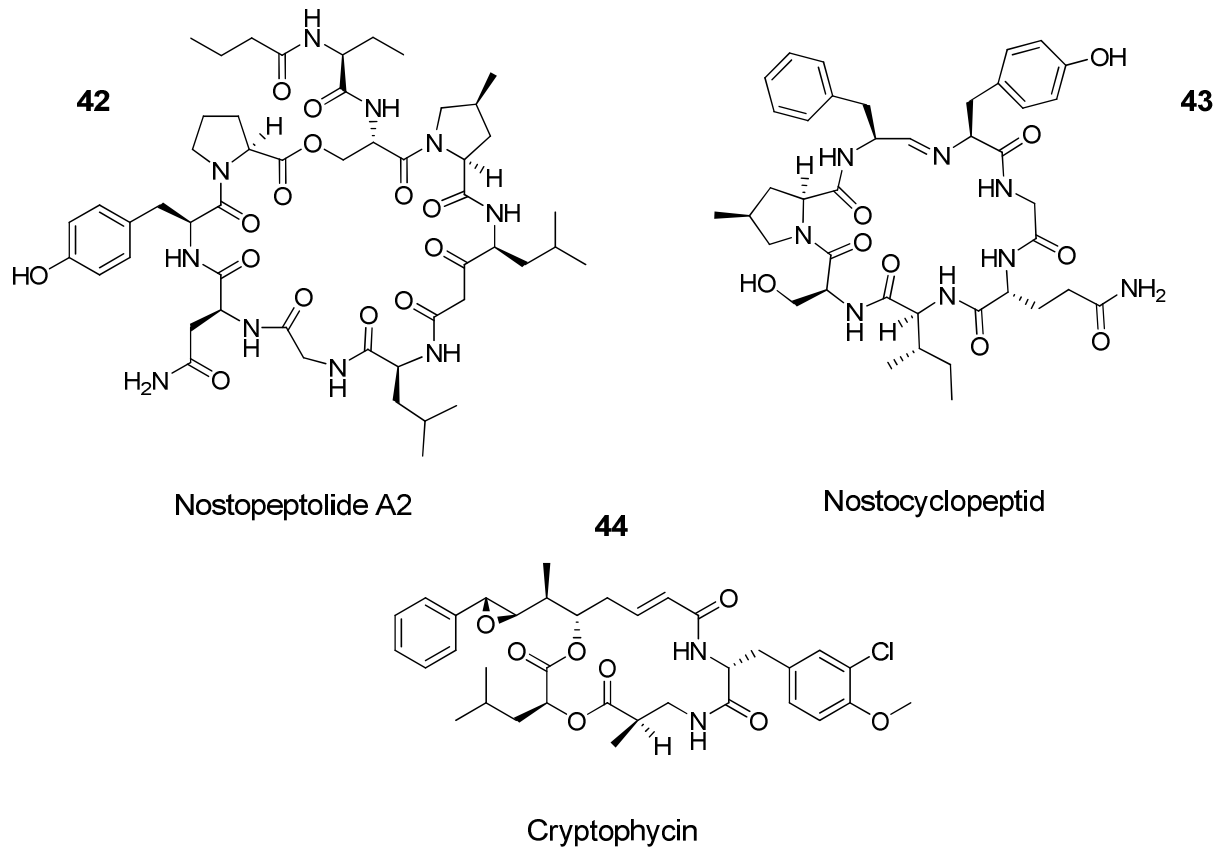


Abb. 20: Vertreter von Polyketiden aus Cyanobakterien

Cyanobakterien sind oftmals in Symbiosen assoziiert. Sie bilden mit verschiedenen Organismengruppen eine Lebensgemeinschaft. Dazu zählen marine Organismen wie Kieselalgen, Schwämme und Dinoflagellaten, als auch terrestrische Arten wie Pilze (Abb. 21), Bryophyten, Palmfarne, *Azolla* und *Gunnera*.

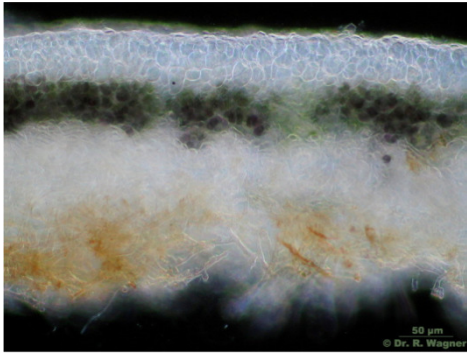


Abb. 21: Lobenquerschnitt der Flechte *Peltigera membranacea*. Zwischen der unteren und einer oberen Pilzmycelschicht ist der Cyanobaktériensymbiont als dunkelgrüne Schicht zu erkennen (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Ralf Wagner).

Nostoc bildet eine monophyletische Gruppe, die aus zwei Untergruppen besteht, *Nostoc*-Gruppe A (*Nephroma*-Gruppe) und *Nostoc*-Gruppe B (*Peltigera*-Gruppe). Gruppe A bezieht nur *Nostoc*-Arten ein, die in Symbiose mit epiphytischen Flechten leben, während Gruppe B von Arten charakterisiert wird, die symbiontisch mit terrestrischen Flechten, in den Wurzeln von Palmfarnen oder frei leben.^{107,108} Die symbiotische Funktion, die *Nostoc* spp. in den meisten Fällen zukommt, ist zumeist als Stickstoffproduzent oder Photobiont.¹⁰⁹ Jedoch ist die Rolle vieler sekundärer Metabolite in *Nostoc* spp. unbekannt. Fest steht aber, dass in *Nostocales* und *Oscillatoriales* die meisten Naturstoffe gefunden wurden⁹⁰ und ihr Potential hinsichtlich neuer Metabolite noch lange nicht erschöpft ist. Hinsichtlich des Phänomens, dass die *Nostocales* oft als Symbionten auftreten, ist es interessant herauszufinden, ob das besonders reiche Vorkommen von sekundären Metaboliten in dieser Ordnung mit der Symbiosefähigkeit in Zusammenhang steht. Es gilt die Frage zu klären, ob diese Naturstoffe möglicherweise eine Rolle für die Symbiose spielen.

6.9 Genome mining

Wie schon oben erwähnt, sind sekundäre Metabolite, die von PKS, NRPS oder Hybriden dieser beiden Enzymgruppen synthetisiert werden, oftmals bioaktiv und können entweder direkt pharmazeutisch verwendet werden oder dienen als Leitstrukturen bei der Synthese neuartiger Wirkstoffe. Ihre bedeutende Rolle für die Entdeckung neuer Medikamente wurde von der pharmazeutischen Industrie Mitte des 20. Jahrhunderts erkannt und führte zu einer ausgedehnten Suche nach weiteren Metaboliten.¹¹⁰ Diese Suche beschränkte sich auf die Methode, Rohextrakte von Pflanzen, Pilzen oder Mikroorganismen auf ihre Bioaktivität zu

prüfen. Diese Methode ist äußerst aufwendig und kostspielig, insbesondere angesichts der häufigen Wiederentdeckung von bereits bekannten Naturstoffen. Das Sequenzieren ganzer Genome von Mikroorganismen im großen Maßstab seit der Mitte der 90er Jahre schuf jedoch eine neue vielversprechende Methode zur Detektion neuer PKS/NRPS-Gencluster.¹¹¹ Das sogenannte Genome mining ermöglicht es, durch bioinformatische Analyse des Genoms diese Gencluster zu entdecken und ihre Funktion vorauszusagen.¹¹² Dabei verwendet man konservierte PKS- bzw. NRPS-Sequenzmuster, um ein Alignment zu erstellen. Vielfach werden auch Programme wie antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell), die von HMMs (hidden Markov models) gestützt werden und damit leistungsfähiger sind als herkömmliche Sequenz vergleichende Programme, für die Suche verwendet. Die Durchforstung ganzer Genome mit diesen Methoden förderte eine Vielzahl neuer Gencluster zu Tage. Dabei wurden Gencluster gefunden, deren Metabolite man aufgrund der Kolinearitätsregel vorhersagen und damit leichter detektieren konnte. Auch konnten die bisher unbekanntes Biosynthesemaschinerien von bekannten Metaboliten gefunden werden. Zusätzlich war man in der Lage, neue Metabolite zu bis dahin kryptischen Genclustern zuzuordnen.^{113–115} Mit kryptisch werden die Gencluster tituiert, deren Produkte unbekannt sind. Bei der Untersuchung einer Vielzahl von Genomen wurden wesentlich mehr Gencluster in den untersuchten Organismen gefunden, als Metabolite aus jenen bekannt waren.¹¹² Eines der ersten Beispiele hierfür ist die Durchforstung des Genoms von *Streptomyces coelicolor* A3(2). 2001 wurde das Genom dieses Actinobakteriums vollständig sequenziert.¹¹⁶ Es wurden weit mehr Gencluster gefunden, als Metabolite für diesen Organismus bekannt waren. Im Zuge weiterer Forschung gelang es, viele bekannte Metabolite ihren Clustern zuzuordnen, aber ebenso wurden neue Metabolite gefunden, die den kryptischen Genclustern entstammten.^{41,117–120} Es konnten auch in zahlreichen anderen Organismen auf diese Weise neue Naturstoffe entdeckt werden, wie z.B. in *Arabidopsis thaliana*.¹²¹ Genome mining bietet demnach eine effiziente Methode, um neue Naturstoffe zu entdecken und damit auch neue Erkenntnisse über die Biosynthese solcher Naturstoffe zu gewinnen. Zu den Vorteilen, die das Genome mining in Relation zu den herkömmlich angewandten Methoden bei der Suche nach neuen Naturstoffen bringt, sind vor allem die hohe Ersparnis an Kosten und Aufwand zu nennen. Wiederentdeckungen, die durch die bisherigen Screeningtests häufig verzeichnet waren, können vermieden werden. Zudem ist es im Vergleich zu der bisherigen dafür aufgewendeten Laborarbeit eine erhebliche Zeitersparnis Gencluster anhand von bioinformatischen Analysen zu entdecken und ihre Strukturen vorherzusagen. Gerade diese mögliche Verknüpfung der Entdeckung von neuen Naturstoffen und ihren Genen, die das Genome mining bewerkstelligt, verhilft mehr Wissen über die einzelnen Biosyntheseschritte zu erhalten. Dies setzt aber voraus, dass die Vorhersage der Metabolitstruktur anhand der Gensequenz für möglichst viele

Biosynthesewege höchst zuverlässig ist. Gerade in Bezug auf die *trans*-AT-PKS, die viele Abweichungen von der Kolinearitätsregel in ihrer Biosynthese zeigt, ist eine verlässliche Vorhersage unabdingbar. Basierend auf funktionalen und phylogenetischen Studien wurde jedoch ein weitgehend präzises Vorhersagesystem etabliert.^{38,69} Die Vorhersage beruht auf dem Erkenntnis, dass die Substratspezifität von KS in *trans*-AT-PKS-Systemen mit ihrer Evolution im Zusammenhang steht. Die Eingliederung in einen phylogenetischen Baum ermöglicht es oftmals vorherzusagen, ob das Substrat z.B. eine β -Hydroxygruppe, eine α,β -Doppelbindung, einen α,β -reduzierten Rest oder eine α - oder β -Kohlenstoffverzweigung beinhaltet. Auf diese Weise kann die strukturelle Information für die gesamte Polyketidkette aus der Kombination der Informationen aller vorhandenen KS in der PKS gewonnen werden. Erfolgreich angewendet wurde dieses Prinzip zum ersten Mal bei einem Gencluster aus *Burkholderia thailandensis*, der für das Thailandamid A kodiert³⁸, aber auch in weiteren Fällen, wie z.B. bei einem Gencluster aus *Chitinophaga pinensis*, dem das Elansolid A zugewiesen werden konnte.¹²² Die Genauigkeit der Vorhersage steigt stetig mit zunehmenden Neuentdeckungen von *trans*-AT-PKS-Systemen, da diese es ermöglichen, die phylogenetische Analyse mit KS entsprechend zu verfeinern. Somit erhöht die Verwendung des Genom-minings gleichzeitig dessen Effizienz.

7. Zielsetzung

Modulare *trans*-AT-PKS gehören einer erst in jüngerer Zeit entdeckten und erforschten Klasse von PKS an. Folglich ist über ihre Funktionalität noch sehr wenig bekannt. Aufgrund ihrer vielfältigen, mit interessanten biologischen Aktivitäten versehenen Produkte sind die *trans*-AT PKS jedoch äußerst vielversprechend in Hinsicht auf die Entdeckung aber auch Erzeugung neuer Medikamente. Der modulare Aufbau der Enzymkomplexe könnte einen Eingriff in die Struktur der Produkte ermöglichen. Durch kombinatorische Biosynthese, z.B. in Form von Austausch, Deletion oder Einfügen von Domänen, könnten effizientere biologische Aktivitäten der Metabolite erzielt werden. Die Möglichkeit dazu ist schon anhand der *cis*-AT-PKS gezeigt worden.¹²³ Der Unterschied zwischen den beiden PKS-Klassen hinsichtlich der Vorhersagbarkeit der Struktur ihrer Naturstoffe nach der Kolinearitätsregel, erschwert es aber, die bei den *cis*-AT-PKS geltenden Gesetzmäßigkeiten auch auf die *trans*-AT-PKS zu übertragen. Für die Erzeugung maßgeschneiderter *trans*-AT-PKS muss dementsprechend mehr über die Funktionsweise der gesamten Enzymkomplexe, sowie der einzelnen Domänen in Erfahrung gebracht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Projekte bearbeitet, die sich beide mit *trans*-AT-PKS-Systemen beschäftigen, mit dem konformen Ziel, Gesetzmäßigkeiten der Funktionalität dieser Enzymklasse zu erarbeiten. Im ersten Projekt, das in Kooperation mit der Universität zu Reykjavik durchgeführt wurde, wurde ein *trans*-AT-PKS-Metabolit gesucht, dessen Gencluster bekannt war, aber der noch nicht isoliert und analysiert werden konnte. Der Cluster wurde zunächst von der Arbeitsgruppe unter Prof. Andrésson während der Sequenzierung des Metagenoms der Flechte *Peltigera membranacea* gefunden, entstammt aber dem symbiotisch lebenden Cyanobakterium *Nostoc* sp. Ziel dieser Arbeit war die Detektion, Isolation und Strukturaufklärung des Metaboliten. Die komplette Strukturaufklärung und der Abgleich mit dem Gencluster, also der Vergleich der vorhergesagten Struktur und der realen Struktur, sollte neue Erkenntnisse über die Funktionsweise bislang unbekannter Dom nenkombinationen, die in diesem Gencluster gefunden worden sind, einbringen. Zudem weist jede neue *trans*-AT-PKS ihre Eigenheiten auf, die generell das Wissen um diese Klasse ausweiten. Zeitgleich sollte eine Methode ausgearbeitet werden, mit der auch schwer detektierbare und unbekannte Metabolite gezielt entdeckt werden können. Dies sollte die recht neue Strategie des Genome minings unterstützen und somit die Entdeckung neuer Metabolite in Zukunft erleichtern.

Das zweite Projekt, in Kooperation mit der Universität von Nottingham, befasste sich mit der Substratspezifität von KS-Domänen in einer *trans*-AT-PKS. Die stark konservierten KS-

Domänen übernehmen die Kondensation der wachsenden Peptidkette mit der Elongationseinheit. Anhand von phylogenetischen Analysen wurde die KS-Substratspezifität zwar vorausgesagt, aber bislang gab es keine experimentellen Daten darüber, wie zutreffend die Vorhersagen sind. Auch war nicht bekannt, wie hoch die Spezifität ist und auf welche Molekülbereiche sie sich im Einzelnen erstreckt. Wie spezifisch die KS Domänen ihr Substrat wählen, ist aber entscheidend für die Erzeugung von maßgeschneiderten *trans*-AT-PKS. Deswegen wurde der Fokus auf diese Domänen gerichtet. Die KS-Domänen der Bacillaen-PKS von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 dienten hierbei als Modell-KS. Die ersten fünf aktiven KS des Bacillaenclusters sollten dabei auf ihre Substratbreite untersucht werden, indem ihnen eigens dafür synthetisierte Derivate der natürlichen Intermediate offeriert wurden. Massenspektrometrische Analysen sollten dann Auskunft darüber geben, ob und wie gut die Derivate akzeptiert bzw. umgesetzt worden sind. Dabei sollten zwei verschiedene Ansätze verfolgt werden. Zum einem sollte eine in der Biosynthese des Bacillaen-Initiationsbausteins blockierte Mutante erzeugt werden, mit der die mutasynthetischen Ansätze durchgeführt werden sollten. Zum anderen sollten die Substratanaloga auch *in vitro* mit den vorab exprimierten KS getestet werden. Durch die biologische Evaluierung der Mutasyntheseprodukte bzw. die Akzeptanz der Substrate *in vitro* sollten Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden, die nicht nur neue Erkenntnisse über die Funktion der KS, sondern auch ein Werkzeug für das rationale Wirkstoffdesign liefern sollten.

8. Ergebnisse und Diskussion

8.1 Teil I: Charakterisierung eines neuen Naturstoffs der Pederinfamilie

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Ólafur Andrésson an der Universität Reykjavik in Island wurde ein Genome-Mining-Projekt bearbeitet, dessen Ergebnis in den folgenden Kapiteln beschrieben ist.

8.1.1 Entdeckung von *trans*-AT-PKS-Genen im Metagenom der Flechte *Peltigera membranacea*

Die in diesem Kapitel dargelegten Erkenntnisse über den Gencluster und die damit verbundene Arbeit wurden allsamt von der Arbeitsgruppe von Professor  lafur Andrésson gewonnen bzw. durchgeführt, wobei Andrey Gagunashvili als hauptsächlicher Projektbearbeitender zu nennen ist. Diese Arbeiten hängen aber eng mit der vorliegenden Dissertation zusammen, weshalb sie hier zum besseren Verständnis und der Vollständigkeit halber erläutert werden.

Die Gruppe von Professor Andrésson sammelte Feldproben der unter anderem in Island beheimateten Flechte *Peltigera membranacea*. Diese Flechte ist dort weit verbreitet und gehört zu den terrestrischen Flechten, die den Symbionten *Nostoc* sp. als Photobionten in ihren Thallus integriert haben. Im Anschluß wurde die DNA der gesamten Flechte extrahiert und das Gesamtmetagenom sequenziert.¹²⁴ Das Metagenom der Flechte setzt sich ungefähr aus gleichen Anteilen des Mykobionten, des Photobionten und der intrathallin sen Mikroben zusammen. Bioinformatische Analysen ergaben, dass das Metagenom 18 Genclusterkandidaten enthält, die für PKS-Enzyme kodieren. Zwei dieser vermeintlich bakteriellen Gencluster gehören zu der *trans*-AT-PKS Familie (Abb. 18). Wie in Kapitel 6.7 erwähnt ist diese Gruppe von Enzymen besonders interessant, da ihr eine hohe Anzahl an Metaboliten entstammt, die von symbiontisch lebenden Bakterien synthetisiert werden.³⁴ Die Annahme, dass diese beiden Gencluster dem *Nostoc*-Genom entspringen, wird durch die entsprechend hohe Übereinstimmung von *Nostoc*-DNA-Sequenzen mit dem Flechtenmetagenom gestützt. Zudem konnte diese Annahme mittels diagnostischen Markern des *Nostoc*-Genoms, wie z.B. des Gens *hgl*, das eine Rolle bei der Glykolipidbiosynthese von Heterozysten spielt,¹²⁵ gefestigt werden. Einer der beiden *trans*-AT-PKS-Gencluster

zeigt eine signifikante Homologie zu Genclustern, die zur Pederinfamilie gehören. Dieser im folgenden als *nsp*-Gencluster bezeichnete Gencluster besteht aus einer 59 kb großen Region. Diese Region enthält neben drei großen Genen (*nspA*, *nspC* und *nspD*), die für multidomäne PKS- oder PKS/NRPS-Proteine kodieren, auch einen Satz von zehn kleineren Genen für akzessorische Proteine. Die Multidomänen-Proteine umfassen ein Startmodul "0" und neun PKS- oder PKS/NRPS-Verlängerungsmodule (Module 1-9). Das 5'-Ende des Genclusters, d.h. *nspA* (Module 1-3), *nspB* und der Beginn von *nspC* (Modul 4 und die KS Region von Modul 5), ebenso wie die akzessorischen Gene am 3'-Ende des Clusters haben eng verwandte Entsprechungen in den Biosynthesegenclustern pederinartiger Metabolite (Abb. 22).

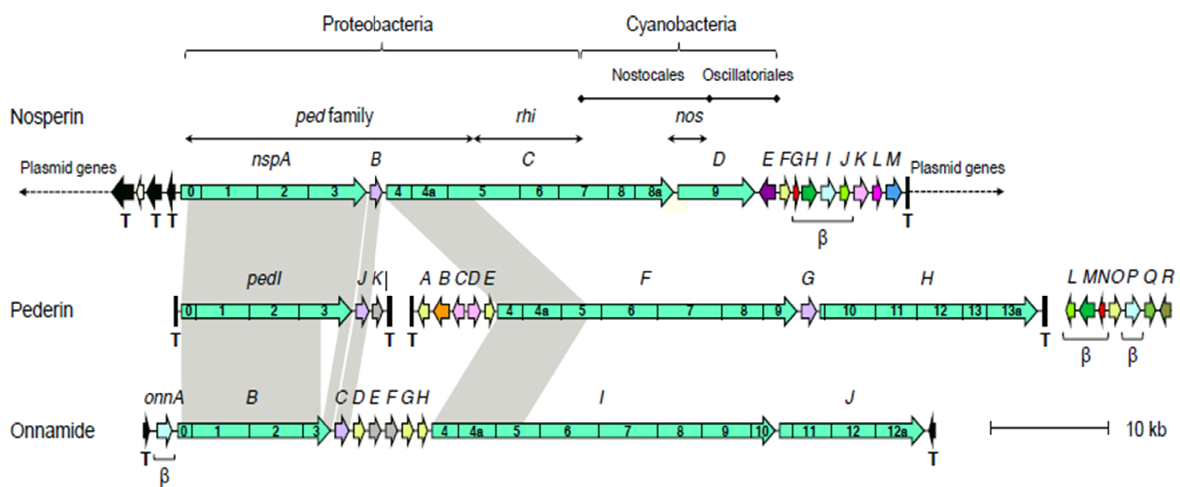


Abb. 22: Verwandtschaft des Nosperin-Genclusters mit den Pederin- und Onnamid-Genclustern. Abgebildet sind der Nosperin-Gencluster *nsp* und die flankierenden Regionen. Mikrosynthese und Homologie mit den Pederin- und Onnamid-Genclustern sind in grau markiert. Die Pfeile mit zwei Spitzen markieren die Ähnlichkeit von *nsp* zu anderen PKS-Biosynthese-Genclustern. Die Zahlen kennzeichnen die einzelnen Module. Gene mit ähnlicher Funktion sind mit identischen Farben dargestellt. β: in β-Kohlenstoffverzweigungen involvierte Gene; T: Transposon¹²⁶

Die mittlere Region hat jedoch Ähnlichkeit zu NRPS-PKS-Biosynthesewegen von anderen Mitgliedern der Proteobakterien oder Cyanobakterien. Das Ende von *nspC* (modules 5-7) ist den PKS-Genen des Rhizoxin (*rhi*) Biosynthese-Genclusters von *Burkholderia* sp.¹²⁷ und *Pseudomonas* sp.¹²⁸ ähnlich. Weiter downstream ähneln die PKS-Gene Teilen von Genclustern, die aus verschiedenen *Nostocales* oder *Oscillatoriales* bekannt sind. So weist eine etwa 3 kb große Region an der Verbindungsstelle von *nspC* und *nspD* eine 80%ige Übereinstimmung in ihrer DNA-Sequenz mit einem Teil des *nos*-artigen Genclusters in *Peltigera membranacea* auf. Ein ähnlicher Gencluster lässt sich in *Nostoc* sp. GSV224 finden und kodiert für das Nostopeptolid¹⁰² (**42**). Dieses zyklisches Peptid-Polyketid ist ein Produkt eines *cis*-AT-PKS-Biosynthesewegs. Dementsprechend scheint der *nsp*-Gencluster

ein evolutionäres Mosaik aus *trans*- und *cis*-AT-PKS-Fragmenten zu sein, die verschiedene Ursprünge haben. Die Expression des *nsp*-Genclusters konnte mittels RNA-Sequenzanalyse in den frisch gesammelten Thalli von *P. membranacea* nachgewiesen werden. Dabei wurden die Thalli in der gleichen Umgebung gesammelt, wie die Thalli für die Sequenzierung des Gesamtgenoms. Die *nsp*-Transkripte wurden nur in dem Thallusgewebe, die auch den Photobionten beherbergten, gefunden, nicht aber in den Apothecien oder Wurzeln, was die Annahme des Photobionten als eigentlichen *nsp*-Träger unterstützt. *Trans*-AT-PKS-Systeme wurden in vielen Bakterien gefunden,^{38,129} aber bisher war kein Fund in Cyanobakterien bekannt, obwohl Cyanobakterien hingegen reichhaltige Quellen an *cis*-AT-PKS sind.^{129,130}

8.1.2 Strukturvorhersage

Die Strukturvorhersage und jede damit verbundene Recherche wurde von Professor Jörn Piel erarbeitet.

Wie in Kapitel 6.4 beschrieben, erlaubt die detaillierte phylogenetische Analyse von KS-Domänen in PKS Genclustern und der Vergleich der Modularchitektur in Biosynthesewegen mit ähnlichen Produkten oftmals eine Vorhersage der Naturstoffstruktur, die von einer *trans*-AT-PKS mit noch unbekanntem Produkt generiert wird.^{38,122} Unter diesen Gesichtspunkten wurden die neun KS des neuentdeckten *trans*-AT-PKS Genclusters analysiert. Die KS wurden mit einem Zahlenappendix von 1-9 versehen, der Bezug auf die jeweilige Modulnummer nimmt, in der die KS-Domäne enthalten ist. Alle neun KS-Sequenzen des *nsp*-Genclusters wurden mit 494 homologen KS-Sequenzen abgeglichen. KS-Sequenzen aus *cis*-AT-Systemen wurden als Fremdgruppe hinzugezogen. Die daraus resultierenden Claden sind im Allgemeinen übereinstimmend bezüglich ihrer KS Funktionen (Abb. 68, Abb. 69 und Abb. 70). Zum Beispiel akzeptieren alle KS mit bekannter Funktion, die in der selben Gruppe wie KS1 sind, Acetyl-Startereinheiten, die von Domänen der GCN5 verwandten *N*-Acetyltransferasefamilie (GNAT) eingebaut werden.¹³¹ Auf diese Weise wurden Teilstrukturen für die Substrate von KS1-3, 5, 7 und 9 vorhergesagt (Tab. 1).

Tab. 1: Analyse der in der Nsp-PKS vorliegenden KS-Domänen

Domäne	Nächster charakterisierter Verwandter (Substratspezifität)	Vorhergesagte Spezifität der KS-Klade	In vorhandener Rest	Nosperin
KS1	Pederin KS1 (Acetyl Startereinheit)	Acetyl	Acetyl	

KS2	Onnamid KS2 (α -L-Methyl + β -D-OH)	α -L-Methyl + β -D-OH	α -L-Methyl + β -D-OH (anti konfiguriert)
KS3	Onnamid KS3 (β -Exomethylen)	Meist β -Exomethylen	β -Exomethylen
KS4	Onnamid KS4 (KS ⁰)	KS ⁰	KS ⁰
KS5	Pederin KS5 (Aminosäure)	Aminosäure	Glycin
KS6	Rhizoxin KS11 (KS ⁰ , Doppelbindung)	KS ⁰ , Doppelbindung	KS ⁰ , Doppelbindung
KS7	Rhizoxin KS12 (verschobene Doppelbindung)	Verschobene Doppelbindung	Verschobene Doppelbindung
KS8	Bryostatin KS8 (KS ⁰)	KS ⁰	KS ⁰
KS9	Oxazolomycin KS9 (Serin)	Aminosäure	Prolin

KS1-5, die auf die Gene *nspA* und *nspC* verteilt sind, wiesen eine hohe Ähnlichkeit zu den KS-Sequenzen des Pederins^{33,132} und/oder der Onnamide auf.⁷⁹ Die vollständige Analyse der Domänen zeigte zudem, dass die ersten sechs Module architektonisch komplett mit den entsprechenden Regionen des *ped*- und *onn*-PKS-NRPS-Clusters übereinstimmen. Die Region beherbergt auch eine NRPS (Modul 4a), deren Homologe in den verwandten Routen einen Glycinrest einbauen. Ausgehend von diesen Beobachtungen konnte eine weitreichende Übereinstimmung eines Großteils der Polyketidstruktur mit der des Pederins (**17**) und des Onnamids (**35**) angenommen und eine Vorhersage der entsprechenden Struktur postuliert werden (Abb. 23).

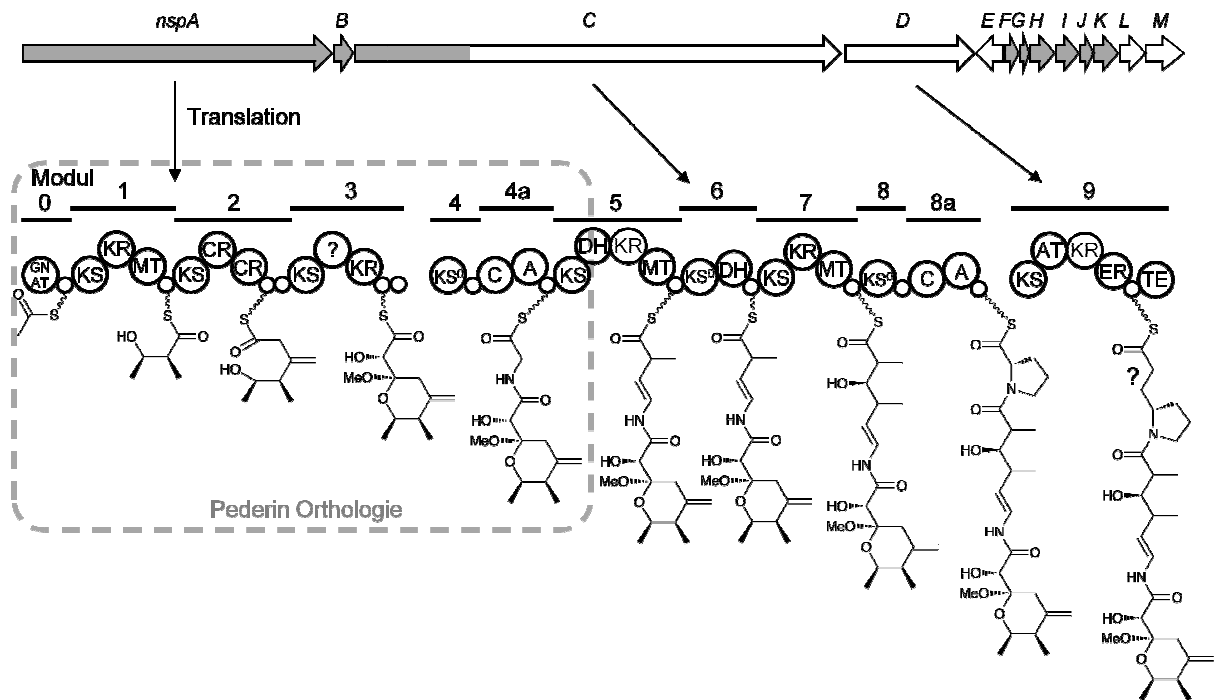


Abb. 23: Vorhersage des Produktes des *nsp*-Genclusters aufgrund phylogenetischer Analysen der KS-Domänen und dem Vergleich der Modularchitektur mit ähnlichen Biosynthesewegen. GNAT, GCN5 verwandte *N*-Acetyltransferasenfamilie; KS, β -Ketoacylsynthase; KR, Ketoreduktase; MT, *C*-Methyltransferase; CR, Crotonase Superfamilie (auch bekannt als Enoyl-CoA Hydratase); KS⁰, nicht elongierende KS; C, nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) Kondensations Domäne; A, NRPS Adenylierungsdomäne; DH, Dehydratase; AT, Acyltransferase; ER, Enoylreduktase; TE, Thioesterase; ?, unbekannt.

Die Vorhersage des übrigen Teils gestaltete sich indes schwieriger, da dieser zwei KS (KS6 und KS8) enthält, die in Claden fallen, die sie als "KS⁰" definieren. Dies sind nicht verlängernde KS, die gewöhnlich wenig Übereinstimmung zwischen Phylogenie und Substratstruktur zeigen.³⁸ KS⁰₆ fällt in eine Subclade, die Homologe der Rhizoxin und Bacillaen-PKS enthält, die an der Umlagerung von Doppelbindungen von der α,β -Position in die β,γ -Position beteiligt sind.^{70,133} Die Module, in denen diese KS auftreten, besitzen neben der KS⁰ und dem ACP auch eine DH-Domäne. Diese DH-Domäne besitzt ein bei der Isomerisierung der Doppelbindung beteiligtes NSAF/YL Motiv anstatt des üblichen DxxxQ/H Motivs, das bei der Dehydrierung beteiligt ist.¹³⁴ Auch das Modul, in dem die KS⁰₆ integriert ist, beherbergt diese Art der DH-Domäne. Die Verwandtschaft dieser Region zu der des Rhizoxins äußert sich desweiteren dadurch, dass die benachbarte KS7 zu der KS12 des Rhizoxins eine weitgehende Ähnlichkeit zeigt. Diese ist durch ihre Akzeptanz von Substraten mit verlagerten Doppelbindungen charakterisiert.¹³³ In Anbetracht des stromaufwärts gelegenen NRPS Moduls war der Rückschluss auf eine vorliegende Enamidfunktion naheliegend. Im Gegensatz zu KS6-8 ließ sich die KS9 wieder einer Clade zuordnen, deren Funktion eindeutig vorhersagbar ist. Diese Clade wird von KS bestimmt, die die

Kettenverlängerung mit Aminosäureresten katalysieren. Unterstützt wurde dieser Befund durch die Anwesenheit eines vorangehenden NRPS-Moduls (8a), das normalerweise eine Aminosäure in die wachsende Polyketidkette integriert. Dass es sich bei der eingebauten Aminosäure um ein Prolin handeln sollte, ergab eine Analyse der Reste in der Substrattasche der Adenylierungsdomäne (A-Domäne). Dieses Modell zur Bestimmung der Aminosäurespezifität der A-Domäne allein aufgrund ihrer Proteinsequenz ist als nichtribosomaler Code bekannt.^{39,41} Aufgrund fehlender diagnostizierbarer stromabwärts gelegenen KS-Domänen wurden die Teile des Polyketids, die von den Modulen 5, 7 und 9 generiert werden, nach den klassischen PKS-Kolinearitätsregeln¹³⁵ vorhergesagt, obwohl sie sich selten auf *trans*-AT-PKS anwenden lassen. Modul 9 zeigte dabei gleich zwei außergewöhnliche Eigenschaften. Zum einen handelt es sich bei Modul 9 um ein *cis*-AT-PKS-Modul mit integrierter AT-Domäne. Die Kombination von *trans*-AT-PKS- und *cis*-AT-PKS-Systemen tritt selten auf und ist deshalb erwähnenswert. Zum anderen weist das Modul eine bisher unbekannte Modularchitektur auf (KS-AT-KR-ER-ACP-TE), die widersprüchlich zu der kanonischen Reihenfolge (KS-AT-DH-ER-KR-ACP-TE) ist. Die fehlende DH-Domäne machte eine Vorhersage sehr schwierig, weil das wachsende Polyketid aufgrund der fehlenden DH-Domäne nicht so modifiziert werden sollte, dass die nachfolgende ER-Domäne eine Enoylreduktion katalysieren kann. Diese außergewöhnliche Modularchitektur führte zu den alternativen Annahmen, dass entweder die ER-Domäne nicht funktional ist (obwohl die relevanten Aminosäurereste vorhanden sind) oder dass das Modul durch eine in *trans* agierende DH-Domäne komplementiert wird. Die vergleichende Analyse der akzessorischen und post-PKS *nsp*-Gene mit bereits bekannten Biosynthesewegen erlaubte weitere Strukturvorhersagen. Die Gene *nspGHIJK* ähneln solchen, die eine Rolle bei der Einführung einer Polyketid- β -Kohlenstoffverzweigung spielen. Folglich konnte eine pederinartige Exomethylenbindung als Strukturelement angenommen werden.⁶³ Für *nspB* und *nspF* konnte die engste Verwandtschaft zu den Genen des *ped* und *onn* Genclusters festgestellt werden, die für eine Oxygenase bzw. eine Methyltransferase¹³⁶ codieren. Im Pederin (**17**) wird entsprechend C7 oxygeniert und der C6 Halbacetalsauerstoff methyliert. Die Vermutung lag nahe, dass die entsprechenden Gene im *nsp*-Gencluster die gleichen Modifikationen übernehmen. Aufgrund ihrer Enzymhomologie konnten NspM bzw. NspL als Asparaginsynthetase bzw. als Cytochrom P450 klassifiziert werden. Ihre genaue Funktion in der Biosynthese konnte aber nicht weiter abgeleitet und daher keine entsprechenden Strukturvorhersagen gemacht werden, da keine entsprechenden Gegenstücke in den anderen pederinartigen Biosynthesewegen vorkommen.

8.1.3 Isolation des vorausgesagten Polyketids

Für die Extraktion wurde in Island gesammeltes und getrocknetes Material der Flechte *Peltigera membranacea* verwendet. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erreichen, wurde das Material im flüssigen Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert. Ausgehend von der vorläufigen Strukturinformation konnten Rückschlüsse bezüglich der Eigenschaften des Naturstoffs gezogen werden, die sowohl die Extraktions- als auch die Detektionsmethode mitbestimmten. Die vorhergesagte Struktur (Abb. 23) zeigte polare Anteile, was zur Wahl eines polaren (MeOH) und eines semipolaren (EtOAc) Lösungsmittels für die Extraktion führte. Das pulverisierte Flechtenmaterial wurde über Nacht in MeOH gerührt und der Feststoff anschließend abgefiltert (9.16.2.1). Dieser Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt und die beiden Methanolüberstände vereinigt und evaporiert. Dieselbe Prozedur wurde danach mit Ethylacetat wiederholt. Die beiden getrockneten Fraktionen wurden mit Hexan ausgeschüttelt um eine Vortrennung der Fraktionen von den Fetten zu erreichen. Die entfetteten Extrakte wurden evaporiert und anschließend in einer geringen Menge Lösungsmittel wieder gelöst, um auf einer Silicasäule fraktioniert zu werden (9.16.2.1). Aufgrund seiner vorhergesagten Enamidbindung war eine geringe UV-Aktivität des Naturstoffs zu erwarten. Diese Eigenschaft bot die Möglichkeit mittels Hochflüssigkeitschromatographie (HPLC) nach der Substanz zu suchen. Die durch die Säulenchromatographie gewonnene polare Fraktion wurde mittels HPLC analysiert (Abb. 24) und die detektierten UV-aktiven Substanzen präparativ aufgetrennt.

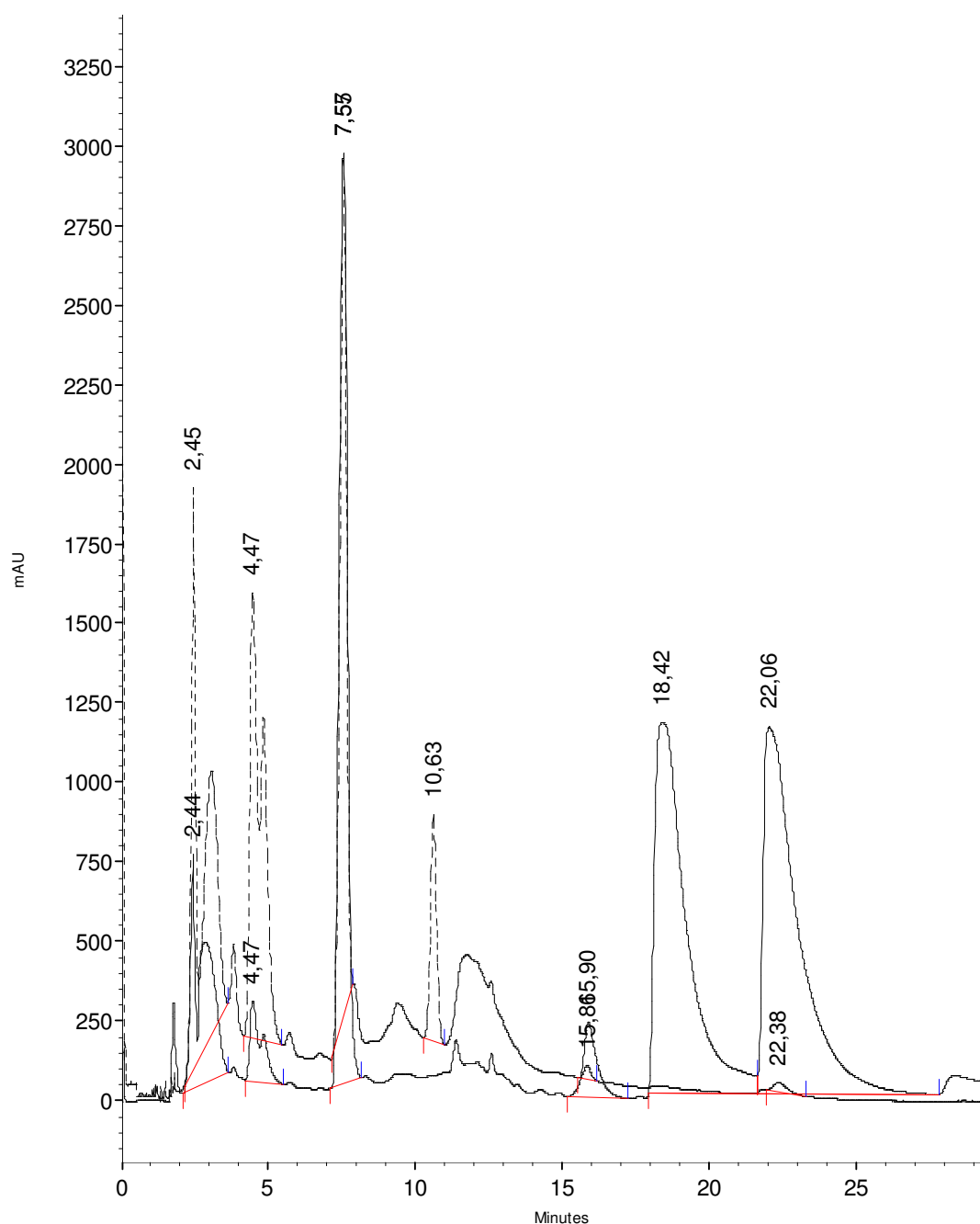


Abb. 24: HPLC-Analyse der mit MeOH extrahierten und anschließend gesäulten polaren Fraktion der Flechte *Peltigera membranacea*. Die gestrichelte Linie zeigt die UV-Aktivität bei einer Wellenlänge von 274nm und die durchgezogene Linie bei einer Wellenlänge von 200nm.

Die separierten Substanzen waren mit einer Ausnahme (Signal bei 274 nm, 4.47 min, Abb. 24) zu niedrig konzentriert, um am Bonner Institut eine NMR-Analyse erfolgreich durchführen zu können; deshalb wurden sie massenspektrometrisch analysiert. Auch diese Methode führte nicht zur Detektion des gewünschten Naturstoffes. Oftmals handelte es sich trotz zweifacher Chromatographie noch um Substanzgemische, bei denen zudem keine MS-Ionen im Bereich der erwarteten Masse zu verzeichnen waren. Der erwartete Massenbereich

wurde anhand der vorhergesagten Struktur festgelegt, aber aufgrund einiger unvorhersagbarer Strukturelemente großzügig zwischen $m/z = 500-600$ angesetzt. Lediglich im Falle einer Auftrennungsfraction (erste Extraktion in MeOH und Säulenfraktion beim Eluieren mit EtOAc + MeOH 9:1) konnte ein aussichtsreicher Kandidat für die gesuchte Substanz gefunden und in ausreichender Konzentration gewonnen werden um diesen einer NMR-Analyse zu unterziehen. Die in deuteriertem Chloroform gelöste Substanz wurde von Dr. Roberta Teta an der Universität in Napoli mit einem 700 MHz NMR-Gerät analysiert. Die Strukturanalyse wurde ebenfalls von Dr. Teta anhand von ^1H -, COSY- und gHSQC-Spektren durchgeführt (Abb. 25 und Anhang Abb. 79 und Abb. 80).

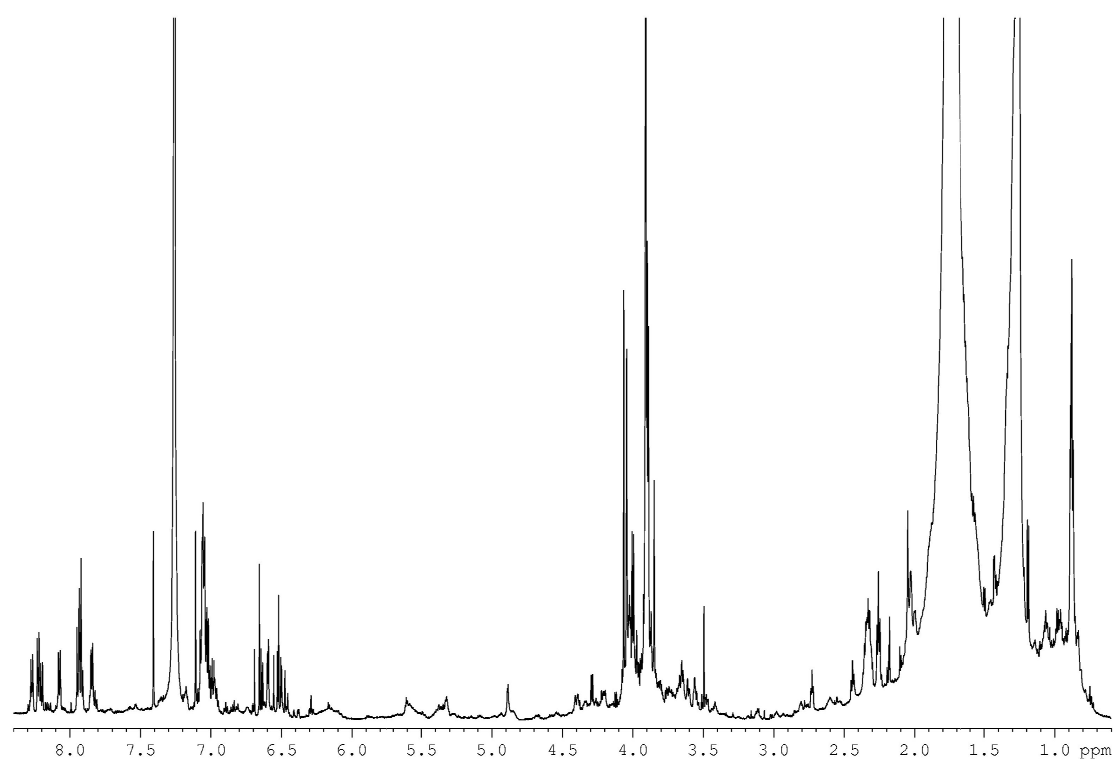


Abb. 25: ^1H -NMR-Spektrum einer aus der Flechte isolierten Substanz

Diese ergab, dass es sich bei der isolierten Substanz nicht um den gesuchten Naturstoff handelte, sondern um das Glykolipid Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG). Das MGDG ist der hauptsächlichste Lipidbestandteil der Chloroplastenmembran und ist dort an photosynthetischen Prozessen beteiligt.¹³⁷

Dass in der Flechte keine aussichtsreichen Kandidaten für das gesuchte Naturstoffprodukt gefunden werden konnten, könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Naturstoff in einer zu geringen Konzentration vorlag oder aber dass er weiterverstoffwechselt wird und als

Ausgangsprodukt nicht mehr zu erkennen ist. Um diese möglichen Erschwernisse bei der Suche auszuschließen, wurde der Symbiont *Nostoc* in Reinkultur angezogen, um die gesuchte Substanz direkt aus dem Symbionten zu extrahieren. Die Möglichkeit einer Kultivierung von *Nostoc*-Cyanobakterien war aus der Literatur bereits bekannt.¹³⁸ Neben den bereits genannten Gründen bot diese Alternative auch den Vorteil, die Anzahl der Metabolite zu reduzieren, da die von den Mykobionten synthetisierten Metabolite entfallen würden. Dies sollte zur leichterem Identifizierung der gesuchten Substanz beitragen. In der Arbeitsgruppe von Professor Andrésson wurden Thalli von *P. membranacea* mazeriert und auf BG-11₀ Nährböden ausplattiert, die ein Minimalmedium ohne Stickstoff darstellen. Auf diese Weise konnten Cyanobakterien, die mittels einer mikroskopischen Untersuchung als *Nostoc* sp. identifiziert wurden, in reinen Kulturen erhalten werden. In drei der unabhängig voneinander isolierten Kulturen konnte der *nsp*-Gencluster nachgewiesen werden. Der *nsp*-Gencluster konnte durch die Generierung der Amplikons der PKS Gene *nspA* und *nspC* sowie des akzessorischen Gens *nspF* mittels PCR nachgewiesen werden. Der letztendlich für die Kultivierung verwendete Stamm wurde durch Sequenzierung der 16S- und 23S-ribosomalen RNA charakterisiert und als N6 bezeichnet. Nach vierwöchiger Kultivierung in flüssigem BG-11 Medium wurde die Genexpression in Kultur getestet. Die Transkription des *nsp*-Genclustern in *Nostoc* sp. N6 konnte mittels Mappings der RNA-Sequenzierungsdaten bestätigt werden und ist in Relation zu dem *Nostoc* Referenzmarker *rbcLXS* um ein Fünffaches höher als im Thallus. Der zugesandte *Nostoc* sp. N6 wurde dann in einem Biofermenter mit dem Fassungsvermögen von 25 l im größeren Maßstab kultiviert (9.13.3). Nach fünfwöchiger Kultivierung wurden 10 l der Kultur entnommen und das abgefilterte Cyanobakterienmaterial mit flüssigen Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Der aus den Cyanobakterien gewonnene Rohextrakt (9.16.2.3) wurde ohne weitere Auftrennung massenspektrometrisch vermessen. Aufgrund der sehr wahrscheinlichen leichten UV-Aktivität wurden LC-MS (Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie) Messungen durchgeführt. Es konnten zwar viele Metabolite in geringen Intensitäten detektiert werden, aber darunter befand sich kein relevanter Kandidat für die gesuchte Substanz. Erschwert wurde die Suche durch das nicht vorhersagbare terminale Nsp-Modul. Dieses machte es durch seine ungewöhnliche Architektur unmöglich, eine genaue Strukturvorhersage zu treffen. Zusätzlich verkomplizierten auch unbekannte posttranslationale Modifikationen eine Eingrenzung des Bereichs der Molekularmasse. Angesichts der doppelten Herausforderung, zum einen aufgrund der unbekanntten Masse und zum anderen durch die grosse Vielfalt der Metaboliten im Extrakt, wurde eine neue Strategie ausgearbeitet. Diese beruhte auf der Anreicherung von stabilen ¹³C-Isotopen in dem Naturstoff mit anschließender HPLC-SPE-NMR (High performance liquid chromatography–solid phase extraction–nuclear magnetic resonance) Analyse. Die Idee war, den Cyanobakterien eine Kohlenstoffquelle mit ¹³C-

Isotopen anzubieten in der Hoffnung, dass diese den Kohlenstoff über die Photosynthese in ihren Stoffwechsel integrieren und für die Biosynthese der gesuchten Substanz verwenden. Folglich wäre die Substanz durch die in verschiedener Anzahl eingebauten ^{13}C -Kohlenstoffe markiert und sollte somit trotz sehr geringer Konzentration mittels NMR detektierbar sein. Durch die bekannten spezifischen Struktur motive sollte es möglich sein, den gesuchten Naturstoff oder zumindest eine sehr stark reduzierte Zahl an Kandidaten, herauszufiltern. Umgesetzt wurde diese Idee, indem dem BG-11 Flüssigmedium der *Nostoc*-Kultur ^{13}C -markiertes NaHCO_3 zugefügt worden ist (9.13.3). Nach fünfwöchiger Inkubationszeit wurden erneut 10 l entnommen und wie bereits oben beschrieben weiterbehandelt. Eine anschließende HPLC-ESI-MS-Analyse des Rohextrakts zeigte, dass viele der Komponenten mehrfachen ^{13}C -Einbau aufwiesen (Abb. 26).

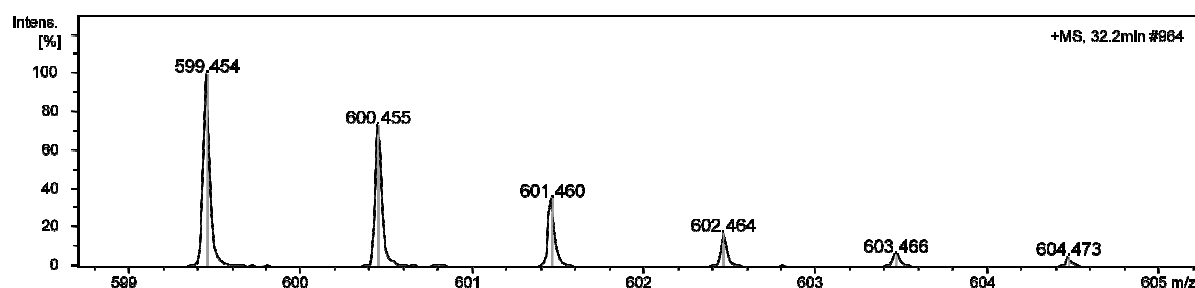


Abb. 26: Beispiel einer ^{13}C -Isotopenmarkierung eines unbekanntes Metaboliten.

Die möglichen Kandidaten unter den markierten Metaboliten wurden weitergehend von Dr. Cristina Daolio und Dr. Markus Godejohann (Bruker, Rheinstetten) analysiert. Zunächst wurde der vollständige Extrakt wiederholt einer HPLC-SPE-Aufreinigung unterzogen. Die somit auf verschiedenen Kartuschen gesammelten und separierten Zielmoleküle wurden mit einem deuterierten Lösungsmittel eluiert und mittels NMR analysiert (9.16.5). Wie schon eingangs erwähnt, sind große Regionen des *nsp*-Genclusters ähnlich denen des Pederins (**17**), was hilfreich bei der Identifizierung eines vielversprechenden Kandidaten war, da die entsprechenden Strukturelemente aufgrund der Gensequenzübereinstimmung mit denen des Pederins (**17**) übereinstimmen sollten. Die aus der Literatur bekannten¹³⁹ NMR-Daten des Pederins (**17**) konnten somit zum Vergleich herangezogen gezogen werden und erleichterten die Identifizierung der gesuchten Substanz. Es konnten hochqualitative ^1H - und ^{13}C -Spektren (Abb. 27 und Abb. 28), ebenso wie COSY-, HMBC- und HSQC-2D-NMR-Daten (Anhang Abb. 81, Abb. 82 und Abb. 83) für diesen vielversprechenden Kandidaten erfasst werden.

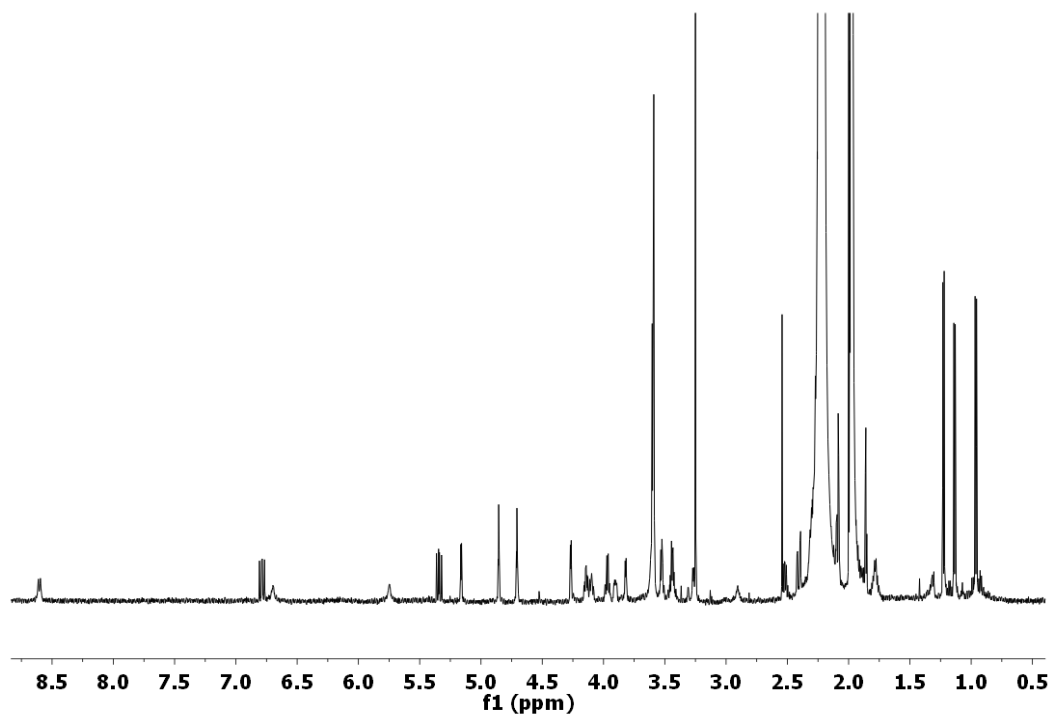


Abb. 27: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des vielversprechenden Kandidaten

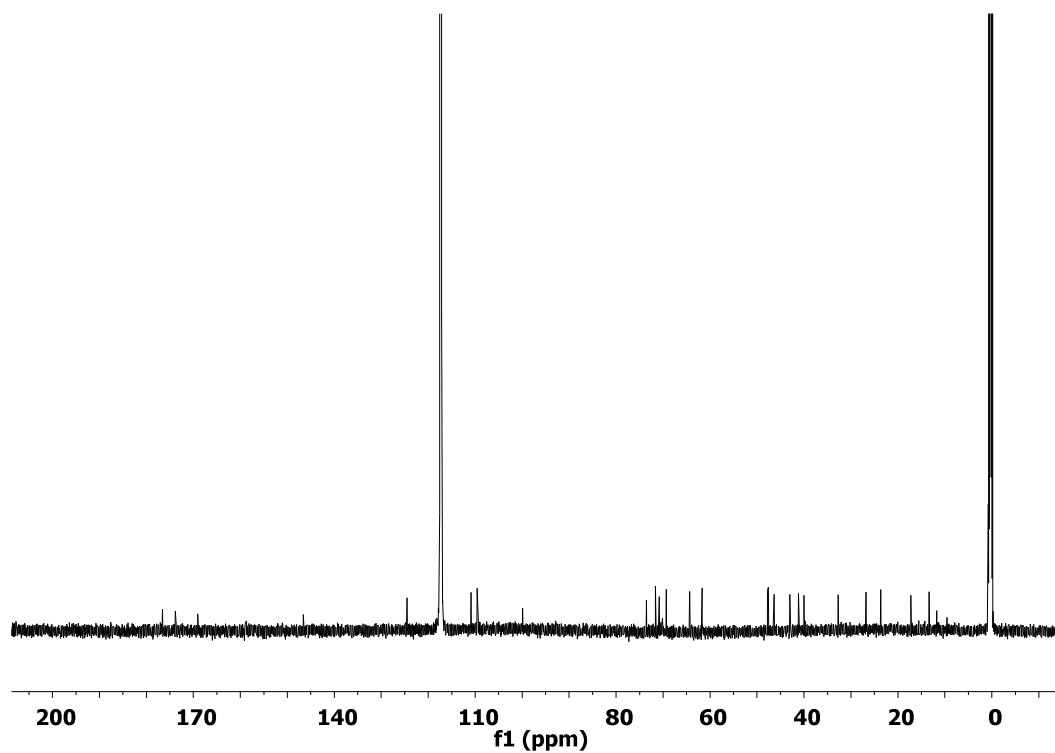
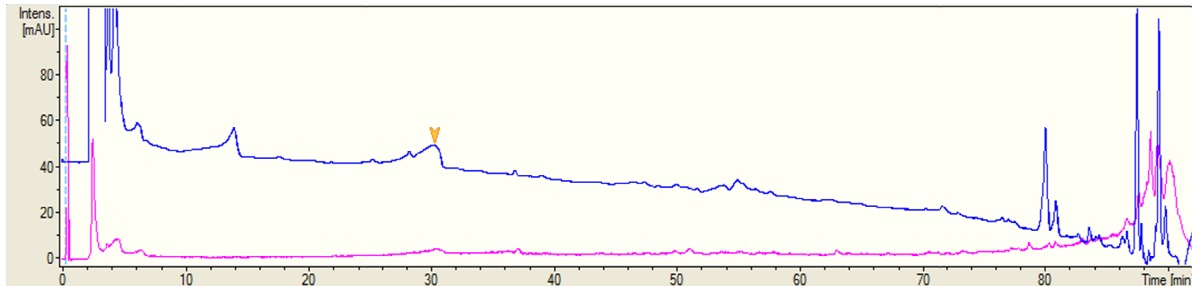


Abb. 28: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum des vielversprechenden Kandidaten

Die für die vorhergesagten Exomethylen-, Methoxy- und C-Methylfunktionen charakteristischen NMR-Signale konnten für diese Substanz detektiert werden. Diese eluierte bei 30.3 min (Abb. 29) und es konnten nur etwa 30 µg von ihr erhalten werden.

A



B

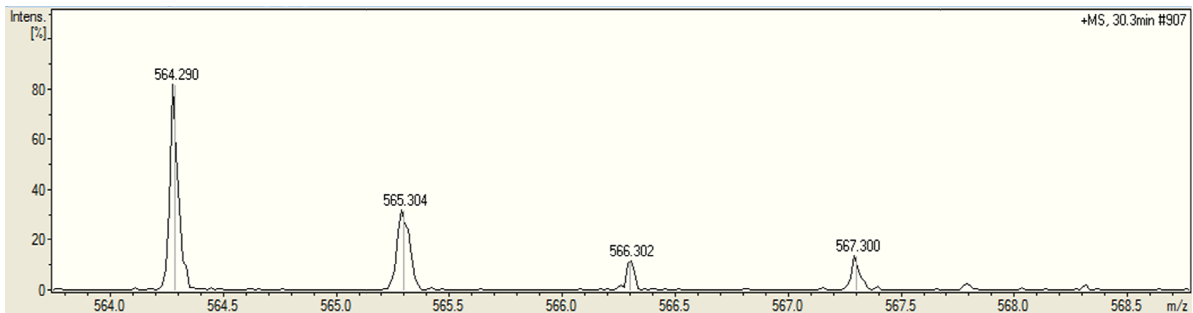


Abb. 29: A HPLC-Chromatogram bei 220 nm (blaue Linie) des MeOH-Extrakts einer *Nostoc* sp. N6 Kultur. Der Nosperin Peak bei einer Retentionszeit von 30.3 min ist mit einem Pfeil markiert. B Massenspektrum des Nosperin Peaks bei 30.3 min.

Trotzdem waren die Spektren so gut, dass eine vollständige planare Strukturaufklärung der Substanz möglich war. Diese Substanz wurde Nosperin genannt. Der Name Nosperin setzt sich zusammen aus dem Nosperin produzierenden Symbionten *Nostoc*, den an der Symbiose beteiligten Mykobionten *Peltigera membranacea* und der Verwandtschaftsbeziehung zu Pederin.

8.1.4 NMR- und MS-Analyse des Nosperins

Durch die kombinierte Analyse der 1D- und 2D-NMR- und der Massenspektren konnte die planare Struktur des Nosperins (**45**) vollständig aufgeklärt werden (Abb. 30).

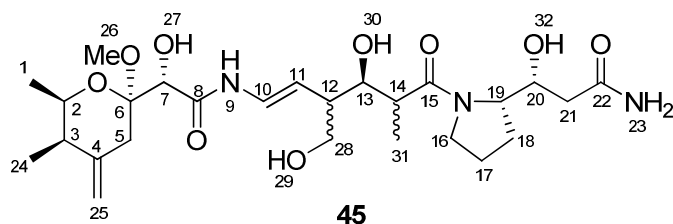


Abb. 30: Gewählte Nummerierung der Kohlenstoffe und Wasserstoff tragender Heteroatome des Nospersins

Sowohl die Analyse der NMR- als auch der MS-Daten ließen annehmen, dass das Molekül 26 Kohlenstoffatome enthält. Die ESI(+)-MS-Messung ergab eine exakte Masse von $m/z = 564.2926$. Diese ließ sich am besten der kalkulierten Masse eines Moleküls mit der Summenformel $C_{26}H_{43}N_3O_9Na$ annähern, die bei $m/z = 564.2897$ liegt. Die chemischen Verschiebungen aller nicht quartärer Kohlenstoffe wurden den zugehörigen Protonen durch Analyse des HSQC-Spektrums (Anhang Abb. 83 und Tab. 2) zugeordnet. Auf diese Weise konnten drei Methylgruppen (C1, C24, C31), sechs diastereotope Protonen an Methylenheiten (C5, C16, C17, C18, C21, C28), acht CH-Funktionen (C2, C3, C7, C12, C13, C14, C19, C20), zwei an das selbe sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatom (C25) gebundene Protonen, die charakteristische Signale für die Doppelbindung am vorhergesagten Pyransystem zeigen, zwei sp^2 -hybridisierte CH-Gruppen (C10 und C11) und eine Methoxyfunktion (C26) identifiziert werden. Außerdem konnte dem HMBC-Spektrum (Anhang Abb. 82) entnommen werden, dass fünf quartäre Kohlenstoffatome (C4, C6, C8, C15, C22) vorhanden sind. Die drei letztgenannten Kohlenstoffe sind ein Teil von Amid- oder Esterfunktionen.

Tab. 2: NMR spektroskopische Daten des Nospersins

NMR spektroskopische Daten (chemische Verschiebungen in ppm angegeben) des Nospersins. 1H und ^{13}C Spektren wurden bei 600 MHz bzw. 150 MHz aufgezeichnet.

Position	δ_C (m, J in Hz)	δ_H (m, J in Hz)	COSY	HMBC
1	18.6	1.19 (d, 6.5)	2	2, 3, 6
2	70.7	3.93 (dq, 2.6, 6.5)	1, 3	1, 6, 24
3	42.5	2.26 ^a	24	4, 24, 25
4	147.9	-	-	-
5a	34.1	2.05	25a/b, 5a/b	4, 6, 25
b		2.20 ^a		3, 4, 6, 25
6	101.2	-	-	-

7	72.1	4.23 (d, 4.2)	27	5, 6, 8
8	170.4	-	-	-
9	NH	8.57 (d, 10.3)	10	-
10	125.9	6.75 (dd, 10.6, 14.5)	9, 11	8, 11, 12, 28
11	112.2	5.31 (dd, 10.4, 14.4)	12	10, 12, 13, 28
12	47.7	2.27 ^a	11	10, 11, 28
13	74.9	3.87 (m)	30	-
14	44.3	2.48 (dq, 6.8, 9.3)	31	12, 13, 15, 31
15	178.0	-	-	-
16	49.1	3.4 (m)	17a/b	15, 17, 18
17a	25.0	1.74 (m)	17a/b,	18
b		1.85 (m)	19	18
18a	28.1	1.75 (m)	19, 17a/b	16, 17, 19, 20
b		1.9 (m)	-	16, 17, 19, 20
19	63.0	4.11 (ddd, 3.5, 7.4, 7.4)	18b	15, 16, 17, 18, 20, 21
20	73.0	4.06	21a/b, 32	22
21a	41.3	2.22 ^a	20, 21a/b	19, 20, 22
b	-	2.37 (d, 2.9, 14.6)	-	19, 20, 22
22	175.2	-	-	-
23	NH ₂	-	-	-
24	13.1	0.93 (d, 7.0)	3	2, 3, 4
25a	110.9	4.67 (dd, 2.1, 2.1)	5a	3, 5
b	-	4.82 (dd, 2.1, 2.1)	-	3, 5
26	48.9	3.21 (s)	-	6
27	OH	3.79 (d, 4.6)	7	-
28a	65.7	3.56 (m)	12, 28a/b	-
b	-	3.49 (m)	-	11, 13
29	OH	-	-	-
30	OH	3.23 (d, 5.2)	13	-
31	14.7	1.10 (d, 6.8)	14	13, 14, 15
32	OH	5.12 (d, 3.9)	20	19, 20, 21

^a Signal ist überlagert mit Lösungsmittelsignal

Die Analyse des HSQC-Spektrums zeigte auch, dass 36 der 43 aus der Summenformel berechneten Protonen an Kohlenstoff gebunden sind. Daraus folgte, dass die sieben verbliebenen Protonen an Heteroatome gebunden sein müssen. Drei dieser Protonen konnten aufgrund von fehlenden HSQC-Kreuzsignalen, aber starken COSY-Interaktionen zu benachbarten Positionen im Molekül, eindeutig den Positionen 9, 27 und 30 zugeordnet werden. Die kombinierte Analyse der COSY- und HMBC-Korrelationen erlaubte die Aufklärung eines Großteils der Struktur. Zur leichteren Übersicht wurde die Struktur für die Aufklärung in drei Fragmente unterteilt (Abb. 31).

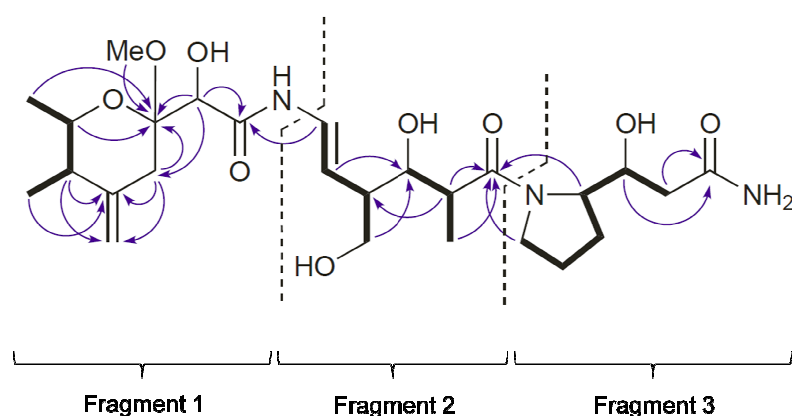


Abb. 31: Relevante 1H-1H COSY- (dick markierte Linien) und HMBC-Korrelationen (Pfeile) des Nospersins (**45**). Die drei Partialstrukturen sind durch gestrichelte Linien getrennt.

Das erste Fragment (Abb. 31) ist der Vorhersage (Abb. 23) nach gekennzeichnet durch ein Tetrahydropyransystem, das mit einer Hydroxyacetamidfunktion assoziiert ist. Ein 2,3-disubstituiertes Butylspinsystem wurde durch die COSY-Kreuzpeaks zwischen $C1-H_3 \leftrightarrow C2-H \leftrightarrow C3-H \leftrightarrow C24-H_3$ nachgewiesen. Die chemische Verschiebung von $C2-^{13}C$ bei 70.6 ppm deutete zudem an, dass das Butylspinsystem an der Position C2 einen Sauerstoffsubstituenten trägt. COSY-Interaktionen von $C25-H_{a/b}$ und den beiden diastereotopischen Protonen an C5 bestätigten ein 4,5-disubstituiertes Propenspinsystem. Dessen Verbindung mittels $C3 \leftrightarrow C4$ mit dem Butylbaustein ging aus einigen HMBC-Korrelationen hervor, wie z.B. von $C24-H_3$, $C25-H_{a/b}$ und $C5-H_{a/b}$ zum quartären, sp^2 -hybridisierten Kohlenstoff C4. Die HMBC-Interaktion von $C5-H_{a/b}$ mit C6 bei 101.2 ppm wies auf ein zweifach mit Sauerstoff substituiertes Kohlenstoffatom an der zuletztgenannten Position hin. HMBC-Kreuzpeaks von $C26-H_3$ und $C2-H$ zu C6 erhärteten diese Annahme, was zu dem vorhergesagten Tetrahydropyransystem führte. Weitere unterstützende Daten für die zweifache Sauerstoffsubstitution am C6 lieferte ein MS/MS Fragmentierungsexperiment des Nospersins (**45**) (Abb. 32 und Abb. 33).

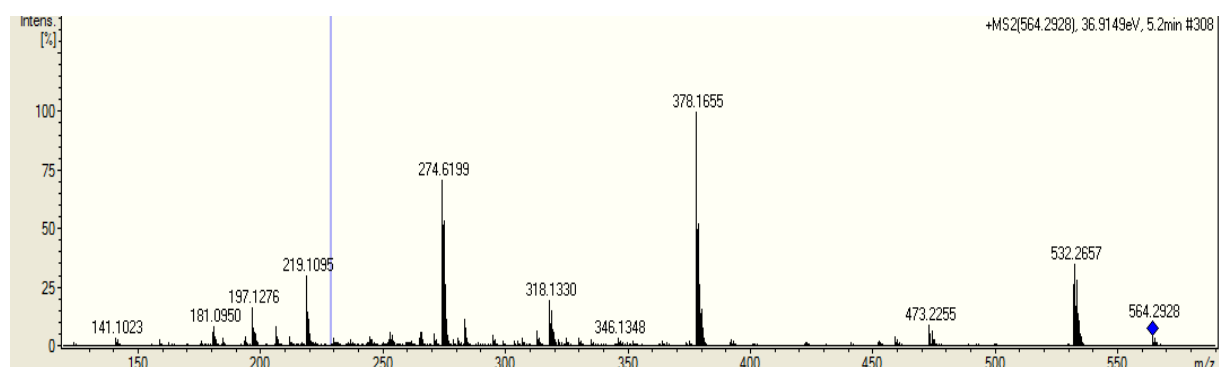


Abb. 32: MS/MS Spaltfragmente des Nosperins (45)

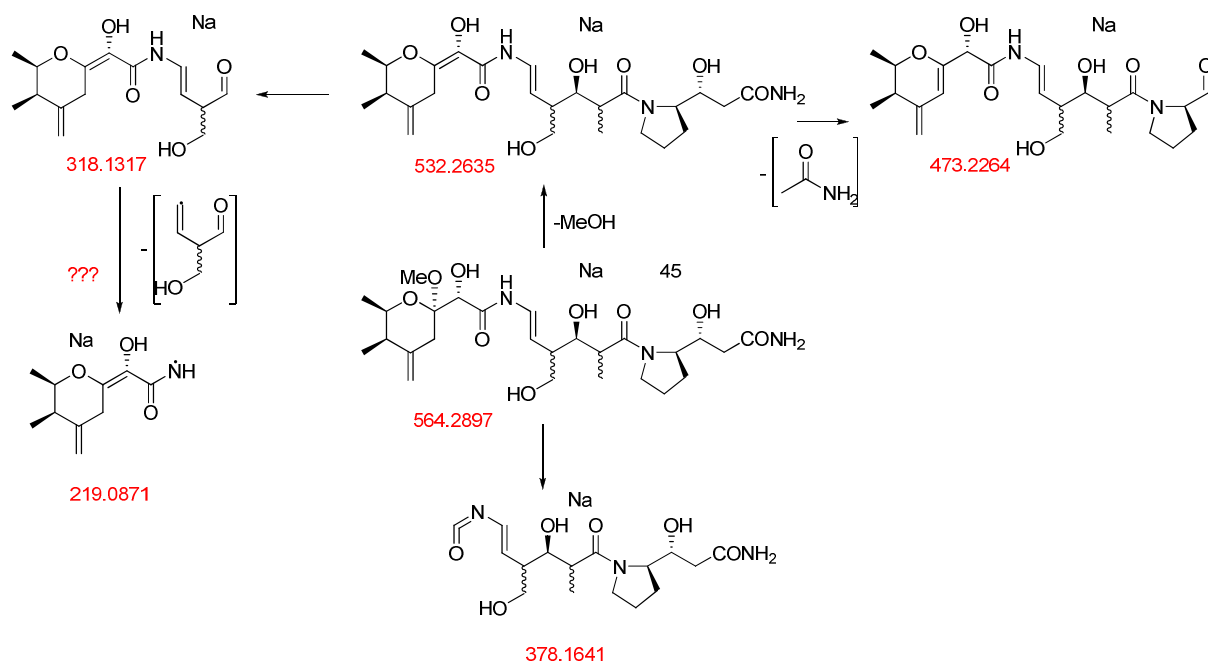


Abb. 33: Analyse der MS/MS Spaltfragmente des Nosperins (45)

Das Tochterion des Molekularions mit der Masse ($m/z = 532.2664$) ließ sich mit dem formalen Verlust von MeOH erklären, wobei die sich so ergebende Summenformel $C_{25}H_{39}N_3O_8Na$ zu einer berechneten Masse von $m/z = 532.2635$ passt. Zusammen mit den oben genannten HMBC-Daten und der Vorhersage, konnten diese Ergebnisse die Methoxygruppe am C6 belegen. Die Massen der Spaltfragmente unterstützten zudem auch das Sauerstoffatom, das als Brücke zwischen C2 und C6 fungiert. Die Teilstruktur des ersten Fragments wird durch die zusätzliche Substitution einer Hydroxyacetamidfunktion am C6 komplementiert. Als Nachweise für diese konnten die chemische Verschiebung von C7 bei 72.1 ppm, die COSY-Kreuzsignale zwischen C7-H und O27-H sowie die HMBC-

Interaktionen von C7-H zu C5, C6 und einer Carbonylgruppe bei 170.4 ppm (C8) herangezogen werden.

Im zweiten Fragment (Abb. 31) konnten zwei individuelle Spinsysteme aus den COSY-Daten bestehend aus C10-H ↔ C11-H ↔ C12-H ↔ C28-H_{a/b} und O30-H ↔ C13-H ↔ C14-H ↔ C31-H₃ abgeleitet werden. Die chemischen Verschiebungen in dem C10 zu C28-H_{a/b}-Spinsystem verwiesen auf eine Doppelbindung zwischen C10 und C11, wobei die Daten auf eine Substitution eines Elektronen-schiebenden Heteroatoms am C10 deuteten. Aufgrund der Kopplungskonstante von 14.5 Hz konnte bestimmt werden, dass die Protonen der C10-C11 Doppelbindung in einer relativen *trans*-Position zueinander stehen. Des Weiteren konnten den Daten eine Alkylsubstitution am C12 entnommen werden. Die Analyse von C28 enthüllte eine an diesem substituierte Hydroxygruppe. Das zweite Spinsystem besteht aus einer Propanoleinheit mit einer Alkoholgruppe am C13 (74.9 ppm) und einer weiteren Substitution am C13 und C14. Die beiden Spinsysteme sind durch eine C12-C13 Einfachbindung miteinander verbunden, was durch die Interaktion von C11-H mit C13, C12-H mit C14, C13-H mit C28-H_{a/b} und C14-H mit C12 im HMBC ersichtlich wurde. HMBC-Korrelationen von C14-H und C31-H₃ mit C15 ließen hier auf eine Verbindung zwischen C14 und C15 schließen, wobei C15 einer Acetamidgruppe (178.0 ppm) angehört.

Das dritte Fragment (Abb. 31) besteht aus einem einzelmem Spinsystem zusammengesetzt aus C16-H_{a/b} ↔ C17-H_{a/b} ↔ C18-H_{a/b} ↔ C19-H ↔ C20-H ↔ C21-H_{a/b}. Die chemischen Verschiebungen in den ¹H- und ¹³C-Spektren von C16 bis C19 deuteten auf eine C20 Monoalkylsubstituierte Pyrrolidineinheit hin. Diese wurde bestätigt durch passende HMBC-Interaktionen in dieser Region, z.B. von C19-H mit C16, C17 und C18. C19 ist direkt verbunden mit dem sekundären Alkohol C20 (73.0 ppm), der seinerseits mit C21-H_{a/b} assoziiert ist. Der letztgenannte Kohlenstoff ist im Weiteren mit einer Acetamidfunktion verknüpft, was durch die HMBC-Kreuzsignale von C20 und C21-H_{a/b} mit C22 (175.2 ppm) belegt wurde. Die endständige Acetamidfunktion konnte erst mit dem Heranziehen der MS/MS-Analyse (Abb. 32 und Abb. 33) bewiesen werden. Das Spaltfragment mit der Masse $m/z = 473.2255$ stimmt im Rahmen des Fehlerbereichs mit der kalkulierten Masse im Falle einer Acetamidabspaltung (C₂₃H₃₄N₂O₇Na: $m/z = 473.2264$) überein.

Die Verknüpfung der drei oben beschriebenen Teilstrukturen konnte letztlich durch einige HMBC- und COSY-Interaktionen belegt werden. So besitzt das C10-H des zweiten Fragments ein gemeinsames HMBC-Kreuzsignal mit dem postulierten Acetamidkohlenstoff C8 des ersten Fragmentes. Dies unterstützte sehr stark die Annahme, dass beide Fragment über ein Stickstoffatom verbunden sind. Untermuert wird diese These noch durch die COSY-Interaktionen von C10-H mit dem N9-H-Protonensignal bei 8,57 ppm. Desweiteren

zeigten C16-H_{a/b} und C19-H HMBC-Korrelationen mit C15 des zweiten Fragments. Somit ist der Pyrrolidinpart über seinen Stickstoff direkt an das C15-Kohlenstoffatom geknüpft.

Die Bestimmung der 3D-Struktur des Nosperins (**45**) konnte nur teilweise durch die NMR-Analyse erfolgen. Die Tetrahydropyranteilstruktur, bestehend aus C1 bis C8 des molekularen Rückgrats des Nosperins (**45**), ist in vielen pederinartigen Sekundärmetaboliten sowohl von der Struktur als auch von der Stereochemie her identisch. Dies schließt Pederin (**17**), Theopederine (**36**), Mycalamide (**38**) und Onnamide (**35**) ein. Da die ersten sechs Module des biosynthetischen Genclusters des Pederins (*ped*) und der Onnamide (*onn*) mit dem entsprechenden Nosperin-Modulen quasi identisch sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Stereochemie in dem analogen Molekülteil kongruent ist. Diese Annahme konnte mit dem Nachweis der absoluten Konfiguration mittels NMR-Analyse bewiesen werden. Durch die chemische Verschiebung oder/und die Kopplungskonstanten (Tab. 2) konnte etwa die Konfiguration für die chiralen Zentren C1, C2, C6, C7 und die Geometrie der C10-C11 Doppelbindung bestimmt werden. Weiterhin erlaubte es die Analyse der Kopplungskonstanten des C1 ↔ C2 ↔ C3 ↔ C24 Spinsystems (Tab. 2) eine relative Orientierung der C2 und C3 Protonen in *cis*-Stellung abzuleiten. Die Voraussage für das stereogene Zentrum am C3 hat sich somit bestätigen lassen. Außerdem zeigte der Vergleich von NMR-Daten der übrigen Positionen der Tetrahydropyranstruktur anderer pederinartiger Metabolite eine weitgehende Similarität, die die Annahme einer gleichgearteten absoluten Konfiguration in dieser Teilstruktur noch wahrscheinlicher machte. Die Stereospezifität einiger anderer Stereozentren konnte hingegen durch bioinformatische Analysen postuliert werden. Eine Untersuchung galt dem Stereospezifität bestimmenden Motiv der KR-Domänen. Dem zugrunde liegen die Arbeiten von McDaniel et al.¹⁴⁰ sowie Caffrey et al.¹⁴¹, in der HMMs (hidden Markov models) verwendet worden sind, um die Konfiguration von sekundären Alkoholen und α -Methyl-Kohlenstoffverzweigungen in modularen Polyketiden vorherzusagen. Dabei wurde festgestellt, dass die KR-Domäne spezifische Motive hat, in denen eine diagnostische Aminosäure eine Vorhersage der Stereospezifität der jeweiligen KR-Domäne erlaubt. Basierend auf dieser Methode wurde die Stereospezifität der im *nsp*-Gencluster vorliegenden KR-Domänen untersucht und dadurch die Konfiguration der korrelierenden Stereozentren vorhergesagt (Tab. 3).

Tab. 3: Analyse der in der *nsp*-PKS vorliegenden KR-Domänen

Domäne	Stereospezifitätsmotiv (diagnostische Aminosäure in fett)	der KR	Vorhergesagte Spezifität	In Nosperin vorhandener Rest
KR1	HAAVGLFD ^r RSFN ^D T		β -D-OH	β -OH

KR3	HSAGITSDFKKPAF	β -D-OH (nicht aktiv in Ketal anderen pederinartigen Biosynthesewegen)	
KR5 (+DH5)	HTAIELQDQSLAQM	β -D-OH in eine <i>E</i> - Doppelbindung umgewandelt	Verschobene Doppelbindung
KR7	HSAVGQFDQSLSEM	β -D-OH	β -OH
KR9	HSAGVPGGGVIQLK	β -L-OH	β -OH

Diese Analyse ermöglichte es die absolute Konfiguration der beiden Stereozentren C13 und C20, die von KR7 bzw. KR9 vorgegeben wird, vorherzusagen. Auch die Stereospezifität des zu KR1 gehörenden chiralen Zentrums konnte auf diese Weise ermittelt werden. Dieses Resultat stimmte mit der aufgrund der Verwandtschaft mit Pederin (**17**) zu erwartenden Stereospezifität überein. Eine Vorhersage für die Konfiguration des stereogenen Zentrums am C19 erlaubte die Analyse mittels des nichtribosomalen Codes. Dieses experimentell bestätigte Modell beschreibt die Möglichkeit die Aminosäurespezifität einer A-Domäne anhand diagnostischer Aminosäurereste in ihrer Proteinsequenz zu bestimmen.^{39,142} So konnte für die beiden A-Domänen des *nsp*-Genclusters ihre jeweilige Aminosäurespezifität bestimmt werden (Tab. 4).

Tab. 4: Analyse der in den *nsp*-PKS vorhandenen A-Domänen

Modul	Nichtribosomaler Code	Vorhergesagte Spezifität (Übereinstimmung mit dem nächsten Verwandten) ^a	In Nosperin vorhandener Aminosäurerest
4a	DILQLGLIWK	Glycin (90%)	Glycin
8a	DVQYIAQVIK	Prolin (80%)	Prolin

^aSubstratspezifität wurde mit NRPSpredictor2 ermittelt, <http://nrps.informatik.uni-tuebingen.de>

Für das NRPS-Modul 8a konnte somit der Einbau eines Prolins vorhergesagt werden. Dieses Modul weist keine Epimerisierungsdomäne auf. Epimerisierungsdomänen katalysieren eine Konfigurationsumkehr der Aminosäure. Aus dem Fehlen einer Epimerisierungsdomäne im NRPS-Modul 8a ließ sich folglich vermuten, dass ein L-Prolin eingebaut wird. Hierbei handelt es sich jedoch nur um eine Vorhersage, die noch

experimentell bestätigt werden muss. Nicht bestimmbar war das stereogene Zentrum C12, das durch eine Doppelbindungsverschiebung entsteht, deren stereochemisches Ergebnis nicht vorhersagbar ist. Auch die Konfiguration des chiralen Zentrums am C14 kann nicht vorhergesagt werden, weil dieses durch einen C-Methylierungsprozess gebildet wird. Dieser ist im Normalfall abhängig von S-Adenosyl-methionin (SAM), das die Methylgruppe überträgt. Da diese Katalyse stereochemisch unspezifisch ist, konnte auch keine Aussage über die Stereospezifität des chiralen Zentrums am C14 gemacht werden.

Große Teile der 3D-Struktur des Nosperins (**45**) konnten durch Kombination von NMR- und bioinformatischer Analyse vorhergesagt und die Vorhersagen teilweise bestätigt werden (Abb. 34).

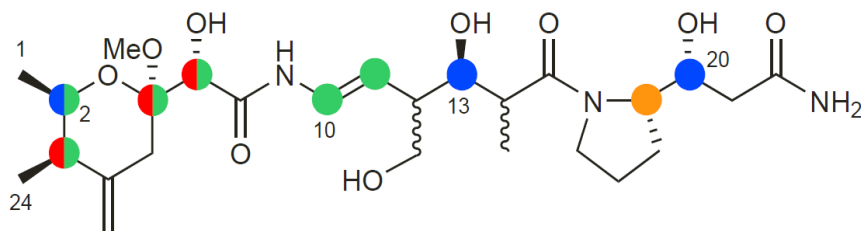


Abb. 34: Stereochemische Charakterisierung des Nosperin mittels NMR- und bioinformatischer Analyse. Die absolute Konfiguration der chiralen Zentren ist festgelegt durch die Analyse der KR-Domänen-Stereospezifität (blau), die NRPS-Domänenstruktur (orange), die allgemeine Domänenorganisation im Vergleich zu anderen Pederin-artigen Biosynthesegenclustern (rot) und die NMR Kopplungskonstanten und/oder die chemischen Verschiebung (grün).

Unbestimmt geblieben sind C12 und C14, über deren Chiralität keinerlei Aussage gemacht werden kann. Im Fall von C13, C19 und C20 konnte nur aufgrund bioinformatischer Analyse eine Vorhersage getroffen werden, die jedoch noch einer experimentellen Verifizierung bedarf. Somit konnte die Konfiguration der 3D-Struktur des Nosperins (**45**) vorerst nicht komplett aufgeklärt werden. Jedoch konnte die Substanz eindeutig als zu der Pederinfamilie zugehörig klassifiziert werden. Nosperin (**45**) ist ein Hybrid aus Pederin (**17**) und einer strukturell neuen östlichen Hälfte. Die Struktur des Nosperins (**45**) stimmte fast komplett mit den vorhergesagten Eigenschaften überein (Abb. 35).

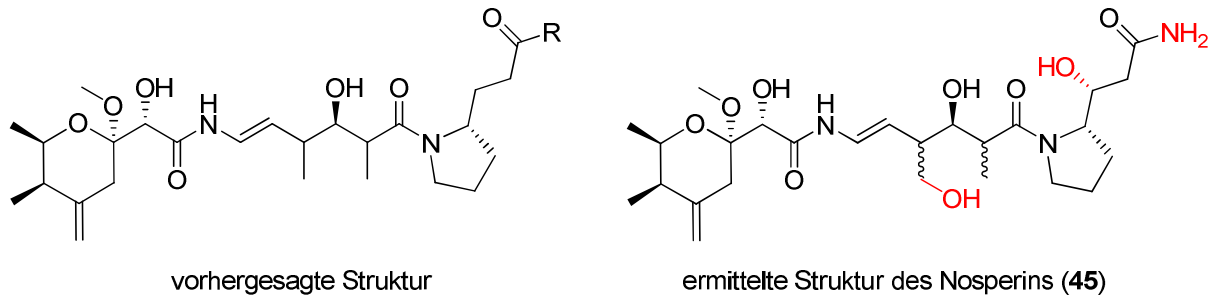


Abb. 35: Vergleich zwischen der nur durch bioinformatische Analyse vorhergesagten und der durch NMR-, MS- und bioinformatischer Analyse ermittelten Struktur des Nosperins (45). Die Abweichungen der ermittelten von der vorhergesagten Struktur sind rot markiert.

Abweichend von der ursprünglichen Strukturvorhersage wurden zwei weitere Hydroxyfunktionen nachgewiesen. Die Hydroxygruppe, die sich an C28 befindet, wird vermutlich in einer Post-PKS-Oxidation durch das P450-Homologe NspL angefügt. Die am C20 substituierte Hydroxygruppe wird hingegen von der Ketoreduktase des Moduls 9 katalysiert. Dies war jedoch aufgrund der ungewöhnlichen Modularchitektur nicht vorhersagbar. Darüber hinaus konnte die terminale bisher undefinierte Endgruppe als Amidfunktion, die höchst wahrscheinlich von dem Asparaginsynthetase-artigen Protein NspM generiert wird, bestimmt werden.

8.1.5 Verbreitung des *nsp*-Locus in Cyanobakterien

Die Erkenntnisse, die diesem Kapitel zu Grunde liegen, wurden durch Vivian Miao von der Universität British Columbia in Kanada erarbeitet. Auch wenn sie somit nicht im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, tragen sie viele interessante Aspekte bei, die für das Gesamtverständnis des Stellenwertes der vorliegenden Arbeit entscheidend sind und somit hier dargelegt und in die Diskussion mit einbezogen werden sollen.

Neben der *Peltigera membranacea* Probe, in deren Metagenom der *nsp*-Gencluster gefunden worden ist, wurden noch andere Proben der gleichen Flechte auf den *nsp*-Gencluster hin untersucht. Auch diese enthielten den *nsp*-Gencluster, der den mit der Flechte symbiontisch lebenden *Nostoc*-N6-Stämmen entstammt. Die *Nostoc*-N6-Stämme aus den unterschiedlichen Flechtenproben wiesen einen charakteristischen 23S-rRNA-Polymorphismus auf. Diese Daten ließen vermuten, dass der *nsp*-Biosyntheseweg vielleicht auch in anderen Photosymbionten von *Peltigera membranacea*, oder generell in *Nostoc* spp. und möglicherweise auch in anderen Cyanobakterien weit verbreitet sein könnte. Um dem weiter nachzugehen, wurden weitere Proben der Flechte *Peltigera membranacea*

gesammelt. Dabei wurden nicht nur Proben aus verschiedenen Regionen Islands, sondern auch aus verschiedenen Habitaten in Britisch-Kolumbien (Kanada) auf das Vorhandensein des *nsp*-Genclusters hin untersucht. Zum Nachweis wurden Amplikons von *nspA*, *nspC* und *nspF* generiert. Diese PCR-basierende Analyse führte zu dem Ergebnis, dass alle untersuchten isländischen Proben den *nsp*-Gencluster aufwiesen, während für einige kanadische Proben der Nachweis nicht erbracht werden konnte, da die PCR-Zielsequenzen nicht amplifiziert werden konnten.¹⁴³ Eine Probe, die in der Nähe des Vancouver-Festland gesammelt worden ist, wies drei *nsp*-Amplikons auf, die eine 3%ige Divergenz zu der isländischen Referenz zeigten, jedoch fast komplett identisch (99.9%) mit Proben von den Vancouver Inseln waren.

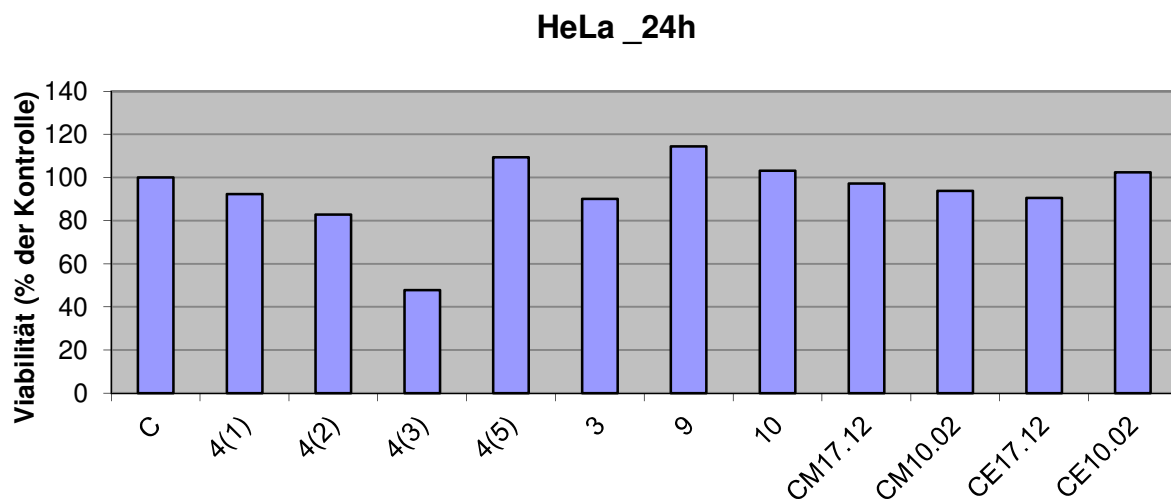
Desweiteren wurden 26 Cyanobakterienstämme, die 15 Gattungen aller cyanobakteriellen Ordnungen repräsentierten, ebenfalls auf die Amplikons *nspA*, *nspC* und *nspF* hin untersucht. Zusätzlich wurde eine bioinformatische Suche nach *nsp*-artigen Sequenzen in der GenBank durchgeführt. Mit Ausnahme für die Gattung *Nostoc* spp. erbrachten beide Analysen keine positiven Ergebnisse. Aufgrund dessen kann vermutet werden, dass der *nsp*-Biosyntheseweg eine phylogenetisch beschränkte Verbreitung hat. Innerhalb der Gattung *Nostoc* spp. zeichnete sich ein gehäuftes Vorkommen des *nsp*-Genclusters bei jenen Gattungen ab, die in einer Assoziation mit *Peltigera*-Flechten leben. PCR-Studien für vier aus *Peltigera* spp.^{144,145} isolierte Stämme (*Nostoc* sp. PCC9709, AR10B, AR9A und WL-2) zeigten ein positives Ergebnis bezüglich der Amplifizierung der *nsp*-Gene, während für vier nicht mit Flechten assoziierte Stämme (*Nostoc muscorum* PCC7906, *Nostoc punctiforme* PCC73102, *Nostoc* spp. PCC6705 und PCC7107) keine *nsp*-Amplikons mittels PCR generiert werden konnten.

Aufgrund der limitierten Verbreitung in Cyanobakterien und dem scheinbaren Fehlen des *nsp*-Genclusters in einigen untersuchten Flechten in Kanada, liegt die Vermutung nahe, dass die *nsp*-Gene eher kein Kernelement des Genoms sind, sondern durch horizontalen Gentransfer ins Genom integriert worden sind. Untersuchungen der flankierenden Regionen des *nsp*-Clusters zeigten IS4-Elemente (Insertionssequenz) an beiden Seiten und Verknüpfungen mit Genen, die mit Plasmidreplikation und -partitionierung (inklusive *parA*, *parB*, *parM* Homologe und ein eine DNA-Helikase codierendes Gen) assoziiert sind, was die These einer extrachromosomalen Quelle stützt.¹⁴³

8.1.6 Toxizitätstest

Über die biologische Rolle des Nosperins (**45**) kann soweit nur gemutmasst werden. Aufgrund der Zugehörigkeit zur Pederinfamilie kann vermutet werden, dass Nosperin (**45**) einen Vorteil für den Wirt des Cyanobakteriums bedeutet. Da die pederinartigen Metabolite oftmals eine toxische Wirkung zeigen und somit die verschiedenen Wirte vor Fressfeinden schützen, liegt die Annahme nahe, dass auch Nosperin (**45**) eine ähnliche Funktion erfüllt. Bedauerlicherweise war es aufgrund der minimalen Mengen nicht möglich, das isolierte Nosperin (**45**) für Cytotoxizitätstest zu verwenden. Jedoch wurden sowohl Flechtenextrakte, die mehrfach chromatographisch aufgereinigt wurden (9.16.4), als auch Cyanobakterienextrakte verschiedener Aufarbeitungen, sowie das speziell aufbereitete Medium (9.16.2.2) zweier Cyanobakterienkulturen auf toxische Aktivität hin untersucht. Die Zytotoxizitätsmessungen wurden von Dr. Mihaela Gurgui in der Arbeitsgruppe von Prof. van Echten Deckert durchgeführt. Dabei wurden kultivierte Neuroblasten der Zelllinie B104 sowie HeLa Zellen (Krebszellen) mit den verschiedenen Extrakten bzw. Medien inkubiert, und nach 24 h wurde der prozentuale Zelltod erfasst (9.17). Eine erhebliche cytotoxische Wirkung konnte bei der Flechtenextraktfraktion 4(3) diagnostiziert werden. Während sich diese Fraktion bei den HeLa Krebszellen zu etwa 50% letal auswirkte, wurde bei den Neuroblasten sogar eine Letalität von etwa 85% registriert (Abb. 36).

A



B

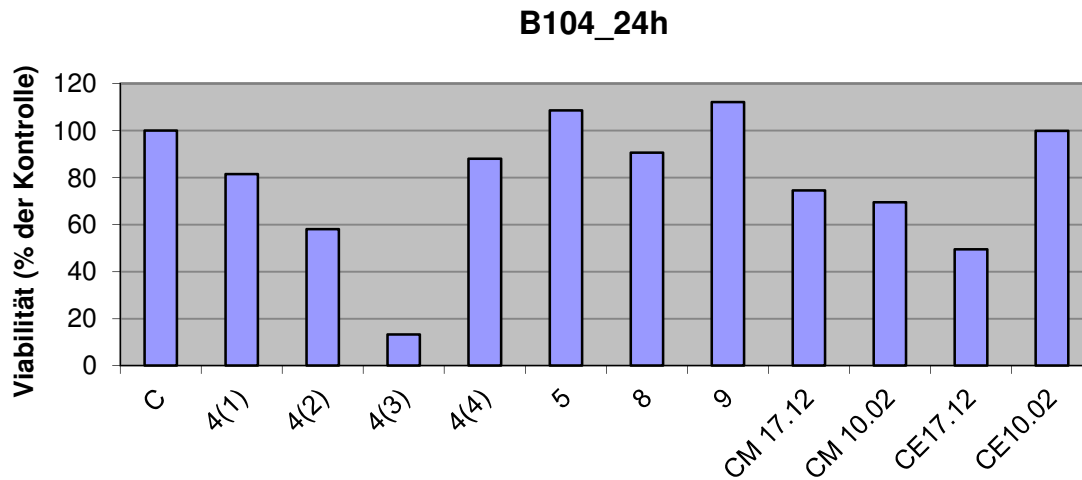


Abb. 36: Toxizitätstest der Flechten- und Cyanobakterienextrakte an Krebszellen (A) und Neuroblasten (B); C, Kontrolle; 4(1), 4(2), 4(3), 4(4), 4(5), 3, 5, 8, 9, 10 verschiedene Fraktionen von Flechtenextrakten; CM17.12 und CM10.02 separiertes Medium zweier Cyanobakterienkulturen; CE17.12 und CE10.02 Cyanobakterienextrakt zweier Kulturen

Eine verminderte, doch ebenfalls markante Sterberate von 50% wurde auch von dem Cyanobakteriumextrakt CE17.12 hinsichtlich der Neuroblasten beobachtet. Jedoch zeigte es eine geringe Wirksamkeit auf die HeLa Zellen. In keiner der Flechtenfraktionen, auch nicht im Rohextrakt der Flechte, konnte bislang Nosperin (45) detektiert werden. Die entsprechenden Messungen zeigten trotz mehrfach wiederholter Extraktionen stets ein negatives Ergebnis. Folglich können mehrere Erklärungen erwogen werden. Es könnte sich bei der cytotoxisch wirkenden Substanz beider Extrakte nicht um ein und dieselbe handeln. In keinem der beiden Fälle kann davon ausgegangen werden, dass es überhaupt das Nosperin (45) ist, das die Zellletalität hervorruft. Denkbar wäre jedoch auch, dass das Nosperin (45) zwar eine cytotoxische Wirkung hat, aber durch den Flechtenmetabolismus weiter modifiziert wird, so dass seine Toxizität gesteigert wird. Hierin würde auch eine Erklärung liegen, warum die mRNA des Nosperins (45) sowohl in Cyanobakterien- als auch in Flechtenextrakten zu finden ist. Dementsprechend hätte es eine andere Masse, und es wäre erklärbar, warum Nosperin (45) in der Flechte nicht mit massenspektrometrischen Methoden detektierbar war. Ein erster Ansatzpunkt, um diese Theorie zu testen, wäre die erfolgreiche Totalsynthese des Nosperins (45) und Cytotoxizitätstests mit diesem. Desweiteren wäre es denkbar, synthetisches Nosperin (45) mit ^{13}C -Atomen zu markieren und in den Flechtenmetabolismus einzubringen. Somit könnte eine anschließende

Verstoffwechslung nachvollzogen werden und zugleich das Stoffwechselendprodukt leicht identifiziert werden.

8.1.7 Zusammenfassende Diskussion

Das in den vorhergehenden Kapiteln beschriebene Projekt war ein Kooperationsprojekt mit den Universitäten Reykjavik in Island und British Columbia in Kanada. Beruhend auf der in Island ermittelten *nsp*-Gensequenz postulierte Prof. Piel mittels bioinformatischer Analyse eine Strukturvorhersage des Produktes. Aufbauend auf dieser wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Strategie zur Entdeckung des Nosperins (**45**) ausgearbeitet. Diese basierte auf der Anwendung der neuartigen Kombination einer ^{13}C -Isotopen-Anreicherung und anschließender LC-SPE-NMR. Damit gelang die Charakterisierung des Symbiose-assoziierten Naturstoffes Nosperin (**45**), der vom kultivierten Photobionten *Nostoc* sp. N6 der Flechte *Peltigera membranacea* gewonnen werden konnte. Der Beitrag zu diesem Projekt in dieser Dissertation belief sich also auf die Detektion, Isolation und Strukturaufklärung des bis dahin unbekanntes Cyanobakterienpolyketids Nosperin (**45**). Die Identifizierung des *nsp*-Genclusters mittels Metagenome mining kombiniert mit der Strukturaufklärung des Produktes führte schließlich zu der Entdeckung und Aufklärung des ersten in Cyanobakterien gefundenen *trans*-AT-PKS-Biosynthesewegs (Abb. 37).

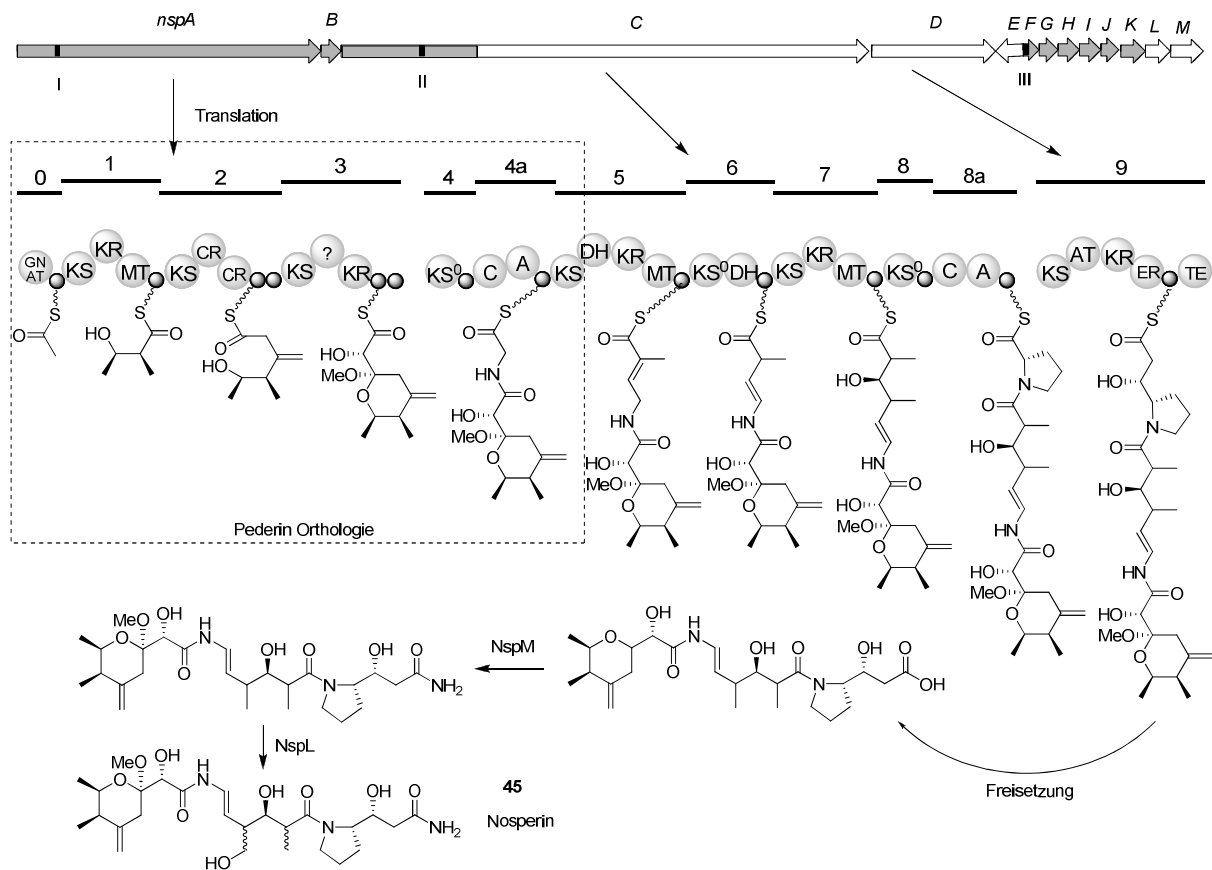


Abb. 37: Die Biosynthese des Nosperins (**45**) wurde aus der Architektur der PKS Proteine NspA, NspC und NspD postuliert. GNAT, GCN5 verwandte *N*-Acetyltransferasenfamilie; KS, β -Ketoacylsynthase; KR, Ketoreduktase; MT, *C*-Methyltransferase; CR, Crotonase Superfamilie (auch bekannt als Enoyl-CoA Hydratase); KS⁰, nicht elongierende KS; C, nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) Kondensations Domäne; A, NRPS Adenylierungsdomäne; DH, Dehydratase; AT, Acyltransferase; ER, Enoylreduktase; TE, Thioesterase. Die Positionen für die zum nsp Screening genutzten Amplikons sind als schwarze Boxen dargestellt und mit römischen Zahlen markiert.

Bislang waren ausschließlich *cis*-AT-PKS-Systeme in Cyanobakterien bekannt. Erst kürzlich wurden z.B. zwei neue konventionelle *cis*-AT-PKS-NRPS-Biosynthesewege in mit Flechten assoziierten Cyanobakterien beschrieben. Der *myc*-Gencluster^{146,147} ist an der Biosynthese von Microcystinen (in vielen Cyanobakterien auftretende Hepatotoxine) beteiligt und der *crp*-Genclusters¹⁴⁸ kodiert für die Cryptophycine, die eine Anti-Krebs-Bioaktivität besitzen. Der für Cyanobakterien bislang ungewöhnliche *trans*-AT-PKS-NRPS-Gencluster fällt jedoch noch durch eine weitere Besonderheit auf. Er zeigt eine regionsweise (*nspA*, *nspB* und Teilsequenzen von *nspC*) enge Verwandtschaft mit *trans*-AT-PKS-Systemen, deren Produkte der Pederinfamilie (Kapitel 6.7) angehören. Diese Symbiose-assoziierten Substanzen zeichnen sich dadurch aus, dass sie oftmals eine toxische Wirkung auf Eukaryoten haben.⁷¹ Einige von ihnen haben jedoch auch das Potential als Vorläufer für Pharmazeutika gegen Krebs eingesetzt zu werden.^{100,149} Eine weitere interessante Gegebenheit ist ihr ausschließliches Vorkommen in Symbiosen. Keine dieser Familie

angehörige Substanz konnte jemals in freilebenden Bakterien gefunden werden. Zudem sind die bakteriellen Symbionten in den meisten Fällen unbekannt. Eine Ausnahme bildet das Pederin (**17**), das von einem eng verwandten Vertreter von *Pseudomonas aeruginosa*^{33,82,150} produziert wird. Jedoch lässt sich dieser Symbiont nicht frei kultivieren. Desto bedeutender erscheint es, dass der Produzent des Nosperins (**45**) nicht nur eindeutig identifiziert werden konnte, sondern auch als erster Symbiont der Pederinfamilie frei kultivierbar ist. Denn auch wenn das Cyanobakterium *Nostoc* sp. für alle Phasen des Thalluswachstums und der Entwicklung desselben essentiell ist, kann es seinerseits vom Wirt unabhängig leben. Es lässt sich relativ leicht in einem Basismedium mit Mineralsalzen kultivieren, was neue Möglichkeiten hinsichtlich der Studien von Biochemie und Physiologie des Biosyntheseweges *in vivo* eröffnet.

Hinsichtlich der Frage nach der ökologischen Bedeutung des Nosperins kann bisher nur gemutmaßt werden. Generell ist die Funktion von einigen *trans*-AT-PKS produzierten Polyketiden, sowie Pederin^{33,132,150} (**17**), Bryostatin^{151,152} (**46**) und Rhizoxin^{127,153} (**47**) bekannt (Abb. 38).

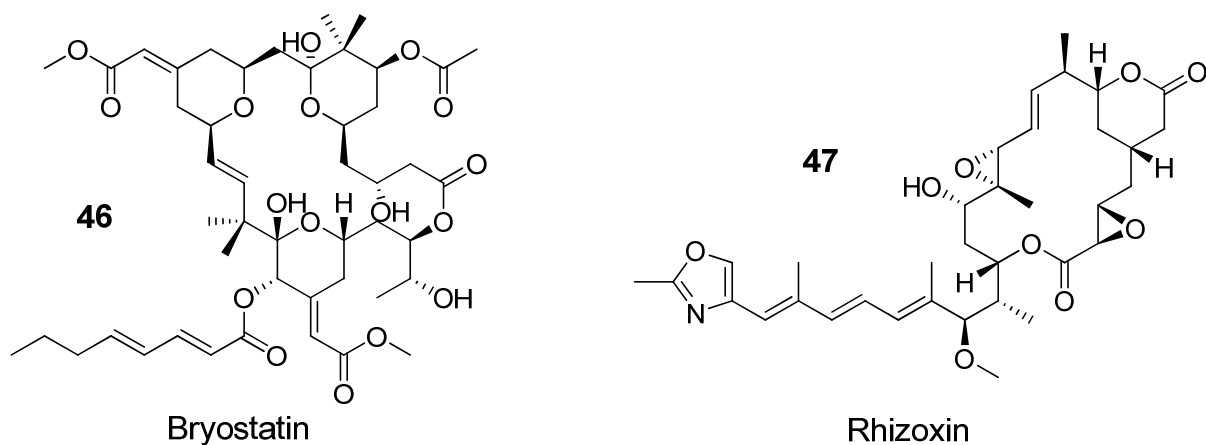


Abb. 38: Der Verteidigung dienende *trans*-AT-Polyketide in Symbiosen.

Diese dienen durch ihre Pathogenität der Verteidigung des Wirtsorganismus. Interessant ist in dieser Hinsicht auch die Betrachtung der Microcystine (**36**), die wie weiter oben im Text bereits erwähnt gehäuft in cyanobakteriellen Symbionten auftreten. Diese ebenfalls PKS-NRPS-Systemen entspringenden Toxine schädigen die Leber und führen damit nicht selten zum Tod.¹⁴⁴ Die weltweite Verbreitung in Flechten und die zahlreich existierenden Varianten von Microcystin (**36**) betonen, wie erfolgreich diese chemische Verteidigung der Flechten gegen Weidegänger ist.¹⁴⁷ Ebenso wie Nosperin (**45**) konnte Microcystin (**36**) in einer

Symbiose von *Nostoc* sp. und *Peltigera* sp. nachgewiesen werden. Dementsprechend wäre eine ähnliche ökologische Rolle des Nosperins (45) denkbar. Weitere Fakten, die dafür sprechen sind neben der Expression der *nsp*-Gene in *Peltigera membranacea* auch die Präsenz in allen isländischen, aber auch in einigen kanadischen Proben. Ein derartig gehäuftes Vorkommen spricht dafür, dass das Nosperin (45) dem Wirt des cyanobakteriellen Symbionten einen Vorteil verschafft. Interessanterweise konnten in *Peltigera membranacea* keine Homologe für den Microcystin-Biosyntheseweg gefunden werden, was möglicherweise bedeutet, dass das Nosperin (45) die Abwehr der Fressfeinde übernimmt. Dass in Kanada auch Populationen von *Peltigera membranacea* gefunden worden sind, bei denen keine *nsp*-Amplikons generiert werden konnten, spricht aber auch dafür, dass das Nosperin (45) keine essentielle Rolle für den Mykobionten spielt. Es ist eher anzunehmen, dass es dem Wirt unter gewissen Konditionen einen Vorteil verschafft, aber nicht überlebensnotwendig ist. In dieser Funktion gleicht es einigen anderen Repräsentanten der Pederinfamilie, wie Pederin (17), Onnamid (35) und Psymberin (37), bei denen die Metazoenwirte sowohl mit als auch ohne die jeweiligen Metabolite existent sind.^{79,80,150} Einen weiteren Anhaltspunkt für die Funktion des Nosperins (45) bietet das in seiner Struktur integrierte *N*-acylierte Dehydropyran. Dieses liegt ebenfalls bei einigen Vertretern der Pederinfamilie vor, darunter z.B. Pederin (17), Psymberin (37), Onnamide und Mycalamide. Es konnte mit Hilfe der Substanzen selbst, aber auch mit synthetischen Analoga, die jene Region vorwiesen, gezeigt werden, dass diese entscheidend für die cytotoxische Wirkung dieser Reihe von Naturstoffen ist.¹⁵⁴ Dem zugrunde liegt die Inhibierung der Proteinsynthese. Ursächlich für diese ist die Bindung der Substanzen an die E-Seite des Ribosoms, die normalerweise von dem tRNA-Ende CCA besetzt wird.¹⁵⁵ Gezeigt werden konnte dies, indem ein radioaktiv markiertes Molekül, das an das Ribosom gebunden war, durch Mycalamid A (38) verdrängt worden ist. Nosperin (45) könnte also ebenfalls eine entsprechende Bioaktivität aufweisen. Bei den durchgeführten Zytotoxizitätstests konnten aufgrund der äußerst geringen zur Verfügung stehenden Menge Nosperin (45) jedoch nur die Auftrennungsfractionen des Flechtenrohextrakts und der Cyanobakterienrohextrakt verwendet werden. Die Studien weisen darauf hin, dass zumindest in einer Flechtenfraktion eine zytotoxische Substanz vorhanden ist. Jedoch konnte man nicht zuverlässig bestimmen, ob es sich dabei um Nosperin (45) handelte. Hier müssten Aktivitätstest mit reinen Nosperin (45) durchgeführt werden. Die Gruppe von Prof. Andrew Phillips der Yale Universität in New Haven arbeitet an einer Totalsynthese des Nosperins (45). Ist diese erfolgreich, so könnte sowohl die Konfigurationsbestimmung der stereogenen Zentren vervollständigt, als auch die Zytotoxizität geprüft werden.

Der Fund des *nsp*-Genclusters in Flechten mit räumlich weit getrennten Habitaten führte zu der Frage nach der Evolution dieses Genclusters. Seine Ähnlichkeit zu *trans*-AT-PKS-NRPS-

Genclustern in diversen Bakteriengruppen deutet auf einen horizontalen Gentransfer dieser Gencluster hin.⁸² Wie im Kapitel 8.1.5 bereits erwähnt lassen sich in beiden flankierenden Regionen des *nsp*-Genclusters IS4-Elemente finden. Insertionssequenzelemente sind bakterielle, transponierbare DNA-Elemente, die kleiner als Transposons sind und für keine enzymatisch aktiven Proteine kodieren. Sie lassen sich in verschiedene Familien einordnen, deren Gliederung auf konservierten Domänen und gemeinsamen strukturellen oder funktionalen Eigenschaften beruht.¹⁵⁶ Das Auftreten dieser Elemente in den flankierenden Regionen des *nsp*-Genclusters unterstützt die Hypothese des horizontalen Gentransfers. Desweiteren spricht das Mosaik aus Homologen innerhalb des Genclusters für einige intergenomische und intragenomische Rekombinationen. NspE und ein Teil von NspD sind homolog zu Proteinen der Ordnung Filament-bildender Cyanobakterien, den Oscillatoriales (Abb. 22). Die flankierenden Regionen von *nspE* und *nspD* zeigen jedoch eine weitreichende Homologie zu Abschnitten des *ped*-Genclusters. Im *ped*-Gencluster ist das von seiner Position her *nspE* entsprechende Gen allerdings entgegengesetzt orientiert. Diese Architektur kombiniert mit der NspA, NspB und teilweisen NspC-Homologie zu Proteinen des *ped*-Genclusters lässt ein evolutionsgeschichtliches Szenario annehmen, bei dem zunächst ein pederinartiges Ur-Operon, das für den konservierten Kernteil des Moleküls kodiert, von den Oscillatoriales aufgenommen und anschließend intragenomisch umstrukturiert worden ist. Ein Transfer in die Nostocales und eine anschließende Rekombination führten zu der jetzigen Domänenorganisation. Eine Besonderheit ist das 3 kb große *cis*-AT-PKS-Fragment, das einem Teil des für Nostopeptolid (**42**) codierenden Genclusters sehr ähnlich ist. Die Integration von *cis*-AT-Domänen in *trans*-AT-PKS ist ungewöhnlich und bisher selten beobachtet worden. In den etwa 40 bisher beschriebenen *trans*-AT-PKS-Systemen sind nur drei weitere Fälle bekannt.³⁴ Die Abweichung der Aminosäure- und Nukleotidsequenz des Genclusterabschnitts des Nostopeptolidtyps im *nsp*-Biosyntheseweg zu dem *nos*-Gencluster ist so gering, dass die Insertion dieses Fragments evolutiv gesehen vermutlich nicht lange zurückliegt. Damit besteht die Möglichkeit, dass *trans*-AT-PKS-Systeme existieren, die dem *nsp*-Biosyntheseweg ähneln, aber die *cis*-AT-Domäne oder andere Regionen noch nicht integriert haben. Umgekehrt wären auch Erweiterungen durch den Einbau anderer Genfragmente denkbar. Ein Hinweis auf die mögliche Existenz solcher phylogenetisch naher Verwandter lieferten *nsp*-Screeningtest für Proben von *Peltigera membranacea*, die nur bei einem oder zwei der getesteten Primerpaare ein negatives Ergebnis zeigten. Die möglichen Erkenntnisse, die durch die Identifizierung derartiger Verwandter des *nsp*-Genclusters gewonnen werden könnten, würden nicht nur bezüglich ihrer Evolution zu neuen Hypothesen führen, sondern wären auch für die industrielle kombinatorische Biosynthese interessant. Sie könnten Aufschluss darüber geben, welche Domänenarchitektur sich als erfolgreich erweisen. Die aus den

verwandten Genclustern resultierenden neuen Varianten des Nosperins (**45**) könnten neben diesem auch potentielle Kandidaten für die Entwicklung von Pharmaka darstellen.

In Hinsicht auf die Entdeckung neuer Metabolite ist auch die als Teil des Projekts verwendete auf ^{13}C -Markierung und LC-SPE-NMR-Analyse basierende Strategie hervorzuheben. Diese hat sich als äußerst wirksam bei der Identifizierung des gesuchten Naturstoffs erwiesen. Die Entwicklung neuer Methoden um Naturstoffe zu detektieren erscheint insbesondere wichtig mit dem Hintergrund, dass viele Naturstoffe, wie im Falle des Nosperins (**45**), in der Natur nur in sehr geringer Konzentration vorliegen und ihre Entdeckung äußerst schwierig ist. Jüngst entwickelte Verfahren, wie z.B. die bildgebende Massenspektrometrie¹⁵⁷, könnten wegweisend für neue Strategien zur Identifizierung von Naturstoffen sein.

8.2 Teil II: KS-Spezifität von *trans*-AT-PKS-Systemen

8.2.1 KS-Spezifitätstest *in vivo*

Um die Substratspezifität und -toleranz der KS in *trans*-AT-PKS-Systemen zu bestimmen, wird in dieser Arbeit die Bacillaen-PKS als Modell verwendet, mit der Annahme, dass die Ergebnisse auf andere PKS-Systeme übertragbar und somit generalisierbar sind. Als Modellorganismus wurde dafür *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 verwendet. Mit Hilfe einer homologen Rekombination sollte ein Knockout der beiden ersten Domänen in *baeJ* erfolgen. Eine Deletionsmutante mit dieser Eigenschaft ist nicht mehr zur Bacillaenproduktion fähig, da durch die fehlende Acyl-CoA-Ligase (AL)- und ACP-Domäne die Bacillaenproduktion nicht mehr initiiert werden kann (Abb. 39).

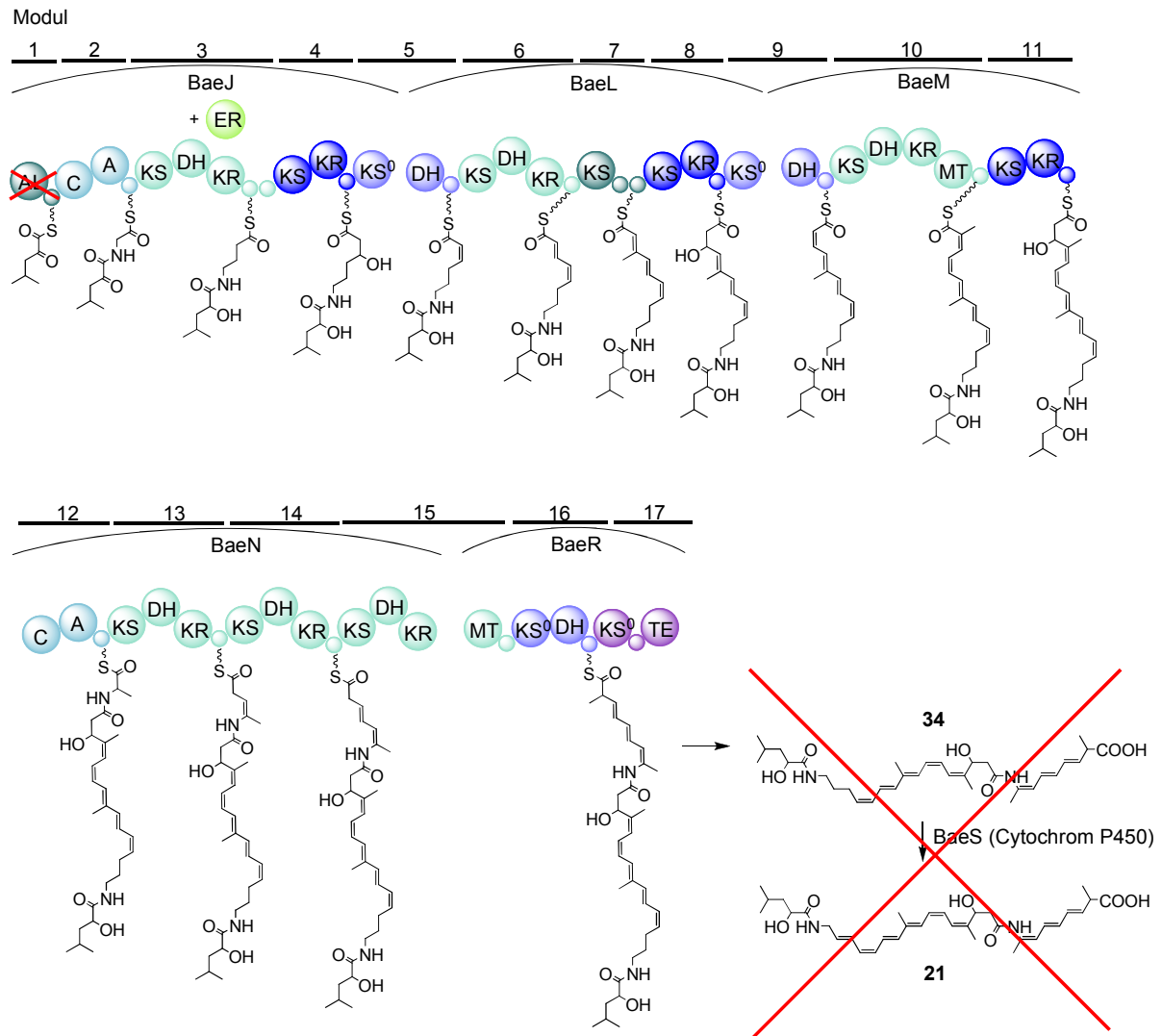


Abb. 39: Deletion im Bacillaen Biosynthesekluster. Das kleine rote Kreuz kennzeichnet die in der Deletionsmutante ausgeknockten Initiationsdomänen des Bacillaen Biosyntheseklusters. Als Folge wird keine Produktion von Bacillaen mehr erwartet.

Die Zugabe von strukturell diverser Analoga der Bacillaenintermediate zu einer Kultur der Deletionsmutante sollten zu neuen funktionellen Erkenntnissen des metabolischen Engineering führen. Diese Derivate wurden von Christoph Kohlhaas als *N*-Acetylcystamin-(SNAC)-Thioester chemisch synthetisiert, um eine Aufladung auf die korrespondierenden Module zu erreichen. Die SNAC-Funktion repräsentiert ein Mimetikum für den Phosphopantetheinyl-Arm eines ACPs. Die Akzeptanz und Weiterprozessierung der SNAC-Thioester durch die Bakterien wurde in vielen Studien ausreichend belegt.^{158–162} Außerdem wird eine gesteigerte Membrangängigkeit dieser Thioester diskutiert.^{163–165}

8.2.2 Generierung einer Deletionsmutante

Zur Erzeugung der Deletionsmutante wurde die in Abb. 40 schematisch dargestellte Strategie gewählt.

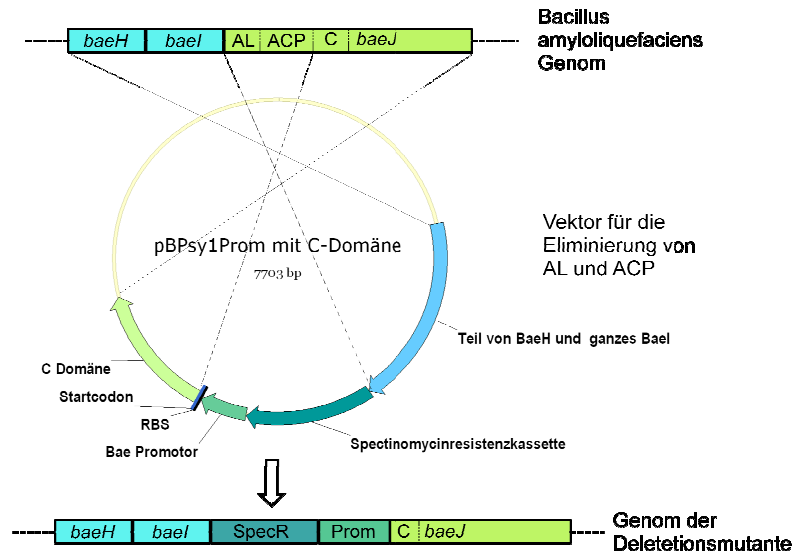


Abb. 40: Strategie zur Erzeugung einer Deletionsmutante mit einem Initiationsdomänenknockout. Mittels einer homologen Rekombination des *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Genoms mit dem pBPsy1Prom mit C-Domäne - Vektor (pAK2) erfolgt eine Deletionsmutante, deren AL- und ACP-Initiationsdomäne ausgeknockt sind. AL, Acyl-CoA-Ligase; ACP, Acetylcarrierprotein; C, Kondensationsdomäne; SpecR, Spectinomycinresistenzkassette; Prom, Bae Promotor; RBS, Ribosombindestelle

Wie aus Abb. 40 hervorgeht, wurde zunächst ein Vektor erstellt, der im Falle einer homologen Rekombination eine Deletion der AL- und ACP-Domäne bewirkt. Dafür besitzt er zwei zum Genom homologe Regionen. Dabei handelt es sich zum einen um einen 1480 bp großen Abschnitt, der fast das gesamte Gen *baeH* und das gesamte Gen *baeI* umspannt und zum anderen um eine homologe Region vom Beginn der C-Domäne in *baeJ*, die 1000 bp groß ist. Der Beginn der C-Domäne in *baeJ* wurde dabei durch ein Alignment mit der C-Domäne von *baeN* bestimmt, deren Beginn leicht zu ermitteln ist, da das Gen *baeJ* mit der C-Domäne beginnt. Zwischen diesen beiden Vektorregionen sind Sequenzen eines Startcodons, einer für *Bacillus amyloliquefaciens* spezifischen Ribosombindestelle, einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym *SbfI*, eines Promotors und einer Spectinomycinresistenzkassette. Um diesen Vektor zu generieren wurde ein bereits im Rahmen einer anderen Arbeit von Dr. Gurgui erstellter Vektor mit einem PCR-Produkt ligiert, das neben dem C-Domänenabschnitt, dem Startcondon und der Ribosombindestelle die

Schnittstellen für *SbfI* und *XbaI* enthält. Abb. 41 zeigt die Strategie zur Generierung des Vektors.

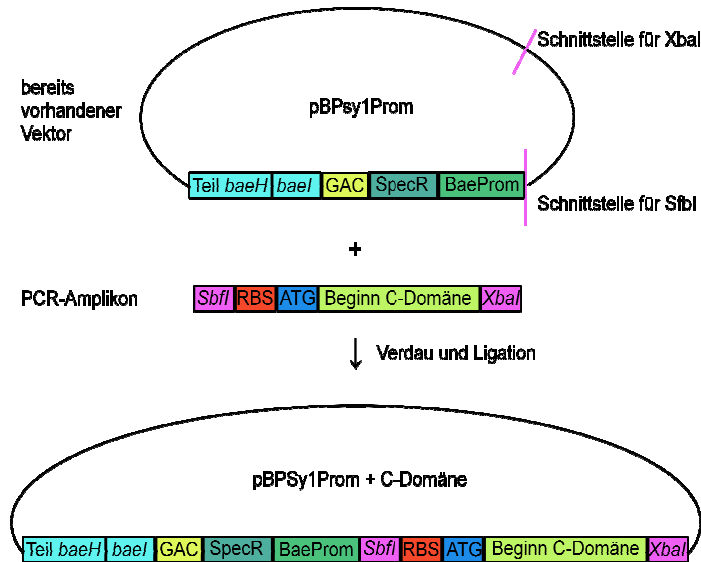


Abb. 41: Strategie zur Generierung des Vektors für die homologe Rekombination. Für die Abkürzungen siehe Text bzw. Abb. 40.

Zur Amplifikation des PCR-Produkts wurden die drei Primer 1CDBaeJSbflfor+RBS, 1CDBaeJXbalrevshort und 1CDBaeJXbalrevlong (9.1) generiert, wobei zwei Rückwärtsprimer entworfen worden sind. Ein Rückwärtsprimer wurde in seiner optimalen Arbeitstemperatur an den Vorwärtsprimer angepasst. Die PCR wurde mit einem Temperaturgradienten durchgeführt (9.3) um die optimale Temperatur zu ermitteln. Die Amplifikation zeigte sich auch erfolgreicher mit dem angepassten Rückwärtsprimer, wie aus Abb. 42 hervorgeht.

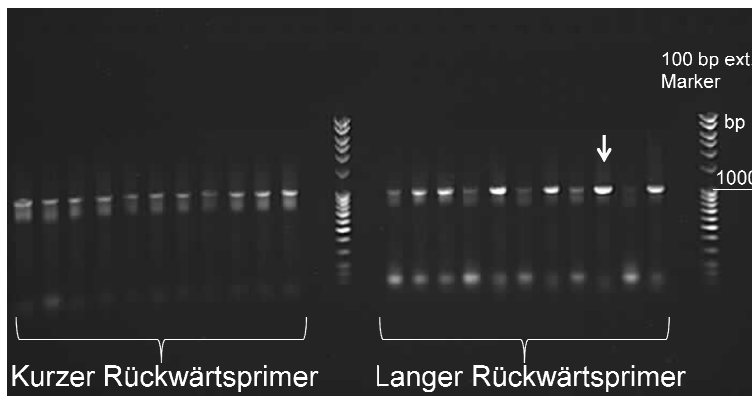


Abb. 42: Amplifikation einer homologen Rekombinationsstelle mittels verschiedener Primerkombinationen und einem Temperaturgradienten. Der Pfeil markiert das weiterverwendete PCR-Amplikon.

Das im Bild markierte 1 kb große PCR-Amplikon wurde im folgenden Schritt auf ein Agarosegel (9.4) aufgetragen und schließlich mit einem PCR-Aufreinigungskit (9.5) aufgereinigt. Das Amplikon wurde mit dem Vektor pBluescript II SK (+) ligiert (9.7), der für die Ligation linearisiert und mit T-Überhängen versehen worden ist (9.6). Für die anschließende Transformation (9.9.2) wurden elektrokompente *E. coli* XL1blue Zellen (9.9.1) verwendet. Eine Blau-Weiß-Selektion (9.10) ermöglichte die Identifizierung der Klone, die einen Vektor samt Insert enthielten. Diese phänotypisch weißen Klone wurden gepickt, kultiviert (9.13.1) und einer Plasmidminipräparation (9.11) unterzogen. Eine Restriktion der Minipräparations-DNA mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Sbf*I (9.12) und eine Agarosegelaufreinigung (9.4) der Restriktionsprodukte lieferten dann fünf aussichtsreiche Kandidaten, wovon vier zur weiteren Analyse ausgewählt worden sind (Abb. 43).

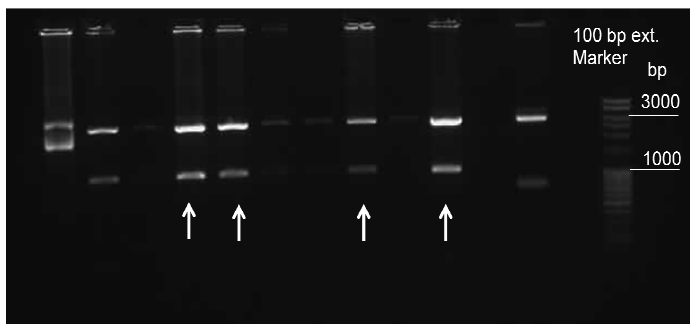


Abb. 43: Restriktionsverdauung des isolierten Vektors. Die weißen Pfeile markieren die weiter analysierten Proben.

Die Restriktionsfragmente dieser vier Klone zeigen die erwarteten Bandengrößen von 1000 bp und 3000 bp, was dem Insert bzw. dem pBluescript-Vektor entspricht. Die Sequenzierung dieser Plasmide zeigte, dass sich unter den vier untersuchten Kolonien ein positiver Klon befand, dessen Plasmid mit pAK1 bezeichnet wurde.

Sowohl die *E. coli* XL1 Blue mit dem pAK1 Plasmid als auch die mit dem pBPsy1Prom Plasmid wurden kultiviert (9.13.1) und ihre Plasmide im Anschluß isoliert (9.11). Beide Vektoren wurden mit *Xba*I und *Sbf*I verdaut (9.12) und die Restriktionsfragmente mittels eines Agarosegels (9.4) aufgetrennt. Die relevanten Banden, die in beiden Fällen zu sehen waren, wurden ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert (9.5). Aufgrund der eingebauten kongruenten Schnittstellen konnten die beiden extrahierten Fragmente miteinander ligiert (9.7) werden. Es folgte eine chemische Transformation (9.9.4) in *E. coli* XL Blue. Die transformierten Zellen konnten nun auf mit Spectinomycin versetzten Agarplatten ausgestrichen und somit positive Klone identifiziert werden, da im pBPsy1Prom-Anteil des

Vektors eine Spectinomycin-Resistenzkassette integriert ist. Die gewachsenen Klone wurden gepickt, kultiviert und einer Plasmidminipräparation (9.11) unterzogen. Ein Restriktionsverdau (9.12) der präparierten Plasmide mit *Xba*I und *Sbf*I und die anschließende Auftrennung des Restriktionsverdaus über ein Agarosegel (9.4) resultierte in einer Vielzahl positiver Klone, die die erwarteten Bandengrößen von etwa 6.5 kb und 1 kb aufwiesen (Abb. 44).

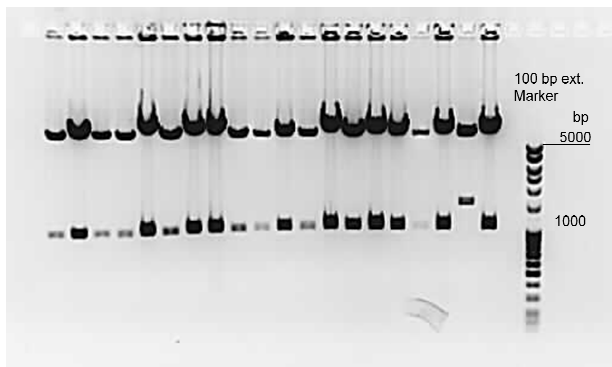


Abb. 44: Restriktionsverdau der isolierten Plasmide.

Der somit neu erstellte und in *E. coli* transformierte Vektor wurde mit pAK2 bezeichnet. Drei der positiven Klone wurden nochmal einer zweiten Runde des oben beschriebenen Prozederes unterzogen, nur wurden für den Restriktionsverdau die Restriktionsenzyme *Xba*I und *Kpn*I (9.12) gewählt, um den Vektor für die homologe Rekombination in *Bacillus amyloliquefaciens* zu linearisieren. Auch in diesem Falle zeigten sich die erwarteten Banden von ca. 4.8 kb und 2.9 kb in allen drei Klonen (Abb. 45).

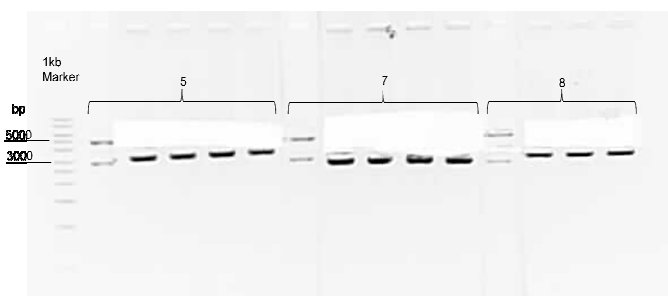


Abb. 45: Linearisierung des Vektors pAK2. Der Vektor pAK2 aus drei verschiedenen Kulturen (mit 5, 7 und 8 beschriftet) wurde isoliert und für die homologe Rekombination linearisiert, wodurch zwei Fragmente entstanden sind. Zu sehen sind sowohl die Testauftragung (jeweils die erste Bahn von 5, 7 und 8) als auch der Rest der Proben, bei denen die entscheidende Bande zur weiteren Verwendung herausgeschnitten wurde.

Die größere Bande enthält die gesamte Information, die in *Bacillus amyloliquefaciens* kloniert werden sollte. Diese wurde demnach aus dem Gel ausgeschnitten (9.4) und durch Gelextraktion isoliert (9.5). Das Konstrukt wurde dann in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 transformiert (9.9.5). Die transformierte Kultur wurde auf einer mit Spectinomycin versetzten Agarplatte ausgestrichen und über Nacht kultiviert (9.13.2). Die gewachsenen Klone wurden auf eine neue mit Spectinomycin versetzte Agarplatte übertragen und auf den Erfolg der homologen Rekombination mittels einer Kolonie-PCR getestet. Hierzu wurden zwei neue Primer generiert (Tab. 6). Um abzuschließen, dass die rekombinante DNA auch ins Genom integriert worden ist und nicht nur in die Zelle aufgenommen wurde, wurde ein Primer erstellt, der im Gen *baeG* ansetzt und somit nicht an dem integrierten DNA-Abschnitt ansetzen kann. Der zweite Primer setzt währenddessen an der Spectinomycinrestistenzkassette an, die wiederum nur bei einer erfolgreichen Rekombination im Genom vorhanden ist. In der Folge wird nur dann ein PCR-Produkt generiert, wenn die homologe Rekombination stattgefunden hat. Unter den 29 geprüften Klonen wurden auf diese Weise drei Deletionsmutanten ausfindig gemacht (Abb. 46), die alle das erwartete PCR-Produkt von ca. 2250 bp zeigten und im weiteren als AK2 bezeichnet worden sind. Die positiven Kolonien unterschieden sich auch phänotypisch von den Kolonien ohne integrierten pAK2 Vektor. Diese Bacilluskolonien zeigten ein fächerartiges Wachstum (Abb. 47).

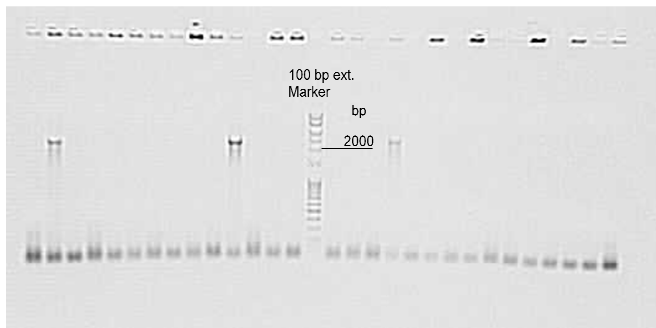


Abb. 46: Kolonie-PCR der transformierten Klone. Die drei amplifizierte Banden, die etwa bei 2250 bp zu sehen sind, zeigten die Klone, bei denen die homologe Rekombination erfolgreich gewesen ist.

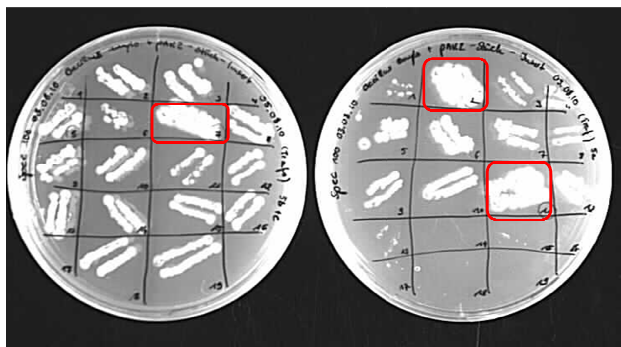


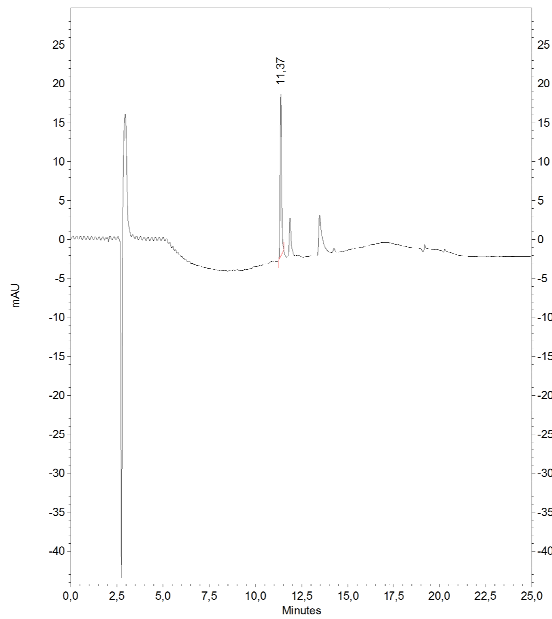
Abb. 47: Phänotyp der Kolonien mit integrierten pAK2 Vektor (rot umrandet).

Zwei dieser Mutanten wurden ausgewählt und ihre Kolonie-PCR Amplikons wurden über Nacht mit dem Vektor pBluescript II SK (+) ligiert, das Ligationsprodukt in *E. coli* XL1 transformiert, die transformierten Zellen kultiviert und anschließend ihre Plasmid-DNA mittels Minipräparation isoliert (9.11). Das vervielfältigte Ligationsprodukt wurde sequenziert, um die fehlerfreie Sequenzabfolge zu überprüfen. Hierfür wurden zusätzliche Primer erstellt (Tab. 6), um die gesamte Länge des zu prüfenden Amplikons abzudecken. Die Sequenzierung ergab eine Sequenzvariation bei zwei Basen. Da die Übersetzung der betroffenen Triplets jedoch zu den gleichen Aminosäuren wie in der Ursprungssequenz führte, blieb die Aminosäuresequenz und damit die entsprechende Proteinstruktur unverändert. Es war also anzunehmen, dass die Variation in der DNA-Sequenzabfolge keine auswirkenden Konsequenzen haben würde.

8.2.3 Fermentation und Fütterungsexperimente *in vivo*

Die erfolgreich klonierte Deletionsmutante sollte der Theorie nach nicht mehr in der Lage sein, Bacillaen (21) zu produzieren. Diese Annahme wurde nachgewiesen, indem sowohl der Wildstamm *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 als auch die Deletionsmutante AK2 bis zu einer bestimmten optischen Dichte kultiviert worden sind, die Zellmaterialien getrennt abzentrifugiert und die Überstände gefriergetrocknet wurden (9.13.2). Die Rückstände wurden in Lösungsmittel gelöst und die Lösungen mittels eines Faltenfilters von unlöslichen Partikeln getrennt und bis auf einen minimalen Rest evaporiert (9.16.1). Die verbleibenden Lösungen wurde mittels HPLC-Analyse auf Bacillaen getestet (Abb. 48 und Abb. 49).

A HPLC-UV-Chromatogramm der *Bacillus amyloliquefaciens*-Extrakte



B UV-Spektrum des Bacillaens

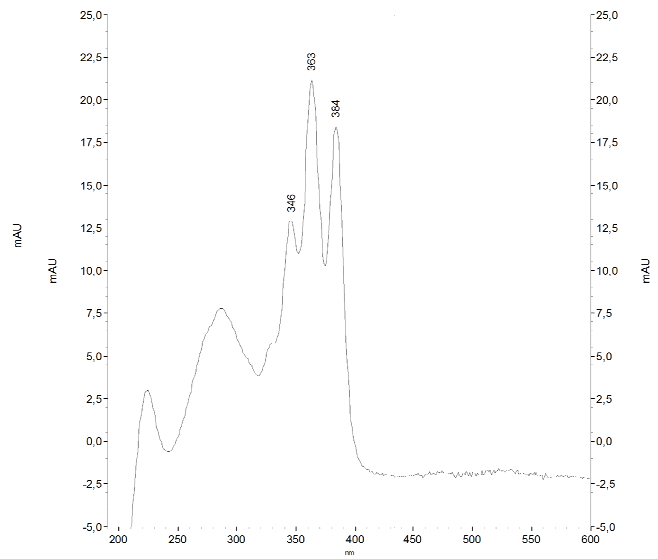


Abb. 48: HPLC-Analyse des Extrakts von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42.

HPLC-UV-Chromatogramm der AK2 Extrakte

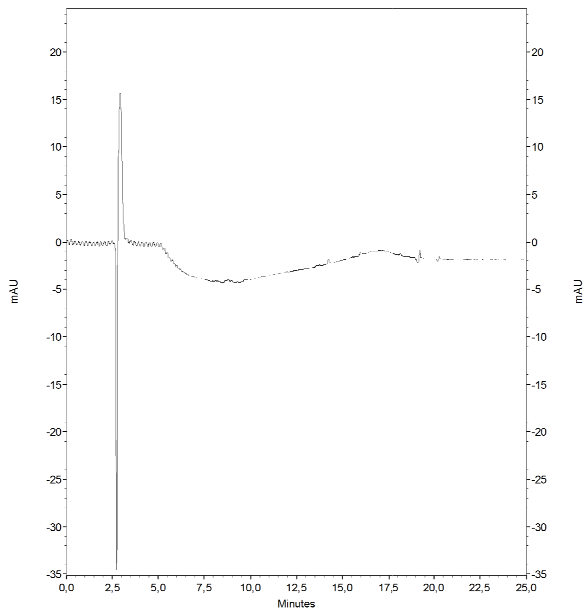


Abb. 49: HPLC-Analyse des Extrakts der Deletionsmutante AK2

Der Wildstamm *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 produzierte Bacillaen (**21**), während die Deletionsmutante AK2 trotz gleicher Kultivierungs- und Weiterprozessierungsmethoden kein **21** synthetisierte. Mit den gewählten HPLC-Konditionen (9.16.1) liegt die Retentionszeit des Bacillaens (**21**) bei etwa 11.5 min. Für dieses Signal konnte das charakteristische Absorptionsspektrum des Bacillaens (**21**) nachgewiesen werden (Abb. 48 B).

Wie anfangs dargelegt, bestand das nächste Ziel darin, der Deletionsmutante AK2 diverse Bacillaenintermediate hinzu zu füttern, in der Annahme, dass diese durch die Membran aufgenommen und von der Bae-KS erkannt, angenommen und weiterprozessiert werden. Um den idealen Zufütterungszeitpunkt zu ermitteln, wurde eine Wachstumskurve (Abb. 50) von *Bacillus amyloliquefaciens* erstellt und die Kultivierung zu unterschiedlichen Zeiten beendet, um den Zeitpunkt festzulegen, an dem die Bacillaenproduktion ihren Anfang nimmt. Diese Wachstumskurve wurde in Zusammenarbeit mit Christoph Kohlhaas und Stefan Künne angefertigt.

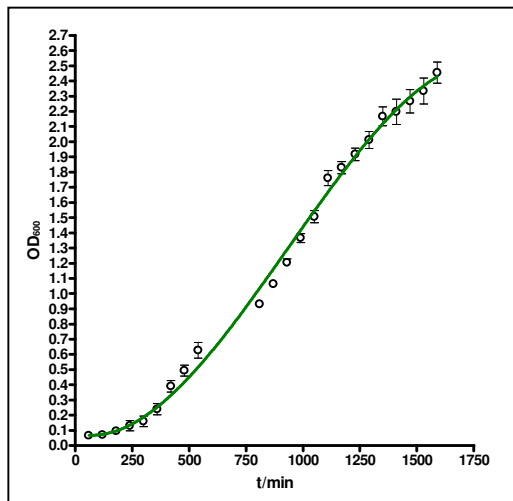


Abb. 50: Wachstumskurve von *Bacillus amyloliquefaciens* über einen Zeitraum von etwa 30h

Sie wurde anhand von Messungen der Zeit und der optischen Dichte generiert. Es wurde in halbstündlichen Intervallen geprüft, ob die Produktion von Bacillaen eingesetzt hat. Dazu wurden die jeweiligen Kulturen wie weiter oben beschrieben extrahiert (9.16.1) und die Extrakte mittels HPLC analysiert (9.16.3). Der Beginn der Bacillaensynthese konnte so auf eine Zeitspanne von 4.5 - 5 h nach Inkubation einhergehend mit einer ungefähren optischen Dichte von $OD_{600} = 0.1$ eingegrenzt werden. Zusätzlich war aus Vorarbeiten von Jana Moldenhauer bekannt, dass mit der Zeit eine Umsetzung des Bacillaens zu einem Glykosidderivat stattfindet.¹⁶⁶ Das Einsetzen dieser Umsetzung konnte auf neun Stunden

nach der Inkubation bei einer optischen Dichte von etwa $OD_{600} = 0.6$ festgelegt werden. Mit diesen Informationen als Grundlage wurden die Fütterungsexperimente gestartet. Wie schon bei den Kontrollversuchen wurde auch in diesem Falle Kulturen von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 als generelle Kontrolle für die erfolgreiche Bacillaenproduktion unter den gegebenen Konditionen und AK2 als Referenz kultiviert (9.13.2). Zusätzlich wurde jedoch noch eine weitere Kultur AK2 kultiviert, der dann in bestimmten Zeitabständen das Bacillaenintermediat der zweiten KS von BaeJ als SNAC-Thioester (Abb. 51) zugegeben wurde.

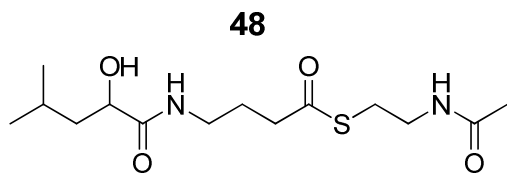


Abb. 51: SNAC-Thioester des natürlichen Intermediats der KS2

Die Versuchskonditionen wurden dabei mehrfach variiert. Die Endkonzentration des SNAC-Thioesters, die Zeitintervalle bei der Zugabe des SNAC-Thioesters, die kontinuierliche Zugabe des SNAC-Thioesters mittels eines Perfusors und auch die Gabe der Startereinheit (Abb. 52) als SNAC-Intermediat waren Faktoren, die verändert worden sind (9.13.2).

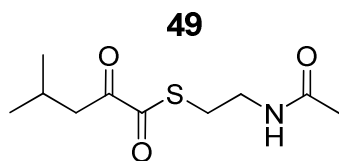


Abb. 52: SNAC-Thioester der Startereinheit der Bacillaenbiosynthese

Jedoch war das Ergebnis stets negativ im Bezug auf die erwartete Produktion von Bacillaen (17). Ebenso konnte kein Hinweis auf etwaige Derivate gefunden werden.

8.2.4 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Eine Überlegung zur möglichen Ursache war, dass die Promotorregion von den Transkriptionsfaktoren nicht erkannt und somit die Transkription der *bae*-Gene durch die RNA-Polymerase in der Mutante nicht initiiert werden könnte. Diskutabel wurde diese Annahme durch die Tatsache, dass die durch die homologe Rekombination eingeführte Promotorregion *Bacillus subtilis* entstammte und somit vielleicht von *Bacillus amyloliquefaciens* nicht akzeptiert wurde. Zustande kam dies durch die Verwendung des von Dr. Gurgui generierten Vektor (9.2.1), der ursprünglich einem anderen Zweck diente und der die Promotorregion von *Bacillus subtilis* trug um unerwünschte Rekombinationen zu vermeiden. Tatsächlich ergab ein Alignment der jeweiligen Promotorregionen in den verschiedenen Arten, dass die Sequenz nicht identisch ist. Zur Prüfung, ob die Promotorregion dennoch erkannt wird, wurde untersucht, ob die mRNA der *bae* Gene vorhanden ist. Dafür wurde zunächst die mRNA isoliert (9.15) und mittels eines Agarosegels überprüft (9.4), ob die Isolation gelungen ist. Wie an den charakteristischen Banden von 1 kb und 700 bp evident war, war die Isolation der 23S- und 16S-RNA erfolgreich (Abb. 53).

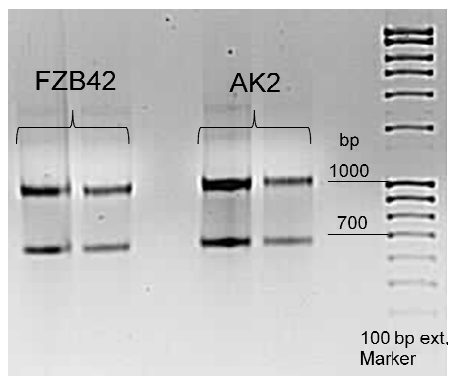


Abb. 53: Isolierte mRNA aus dem Wildtyp (FZB42) von *Bacillus amyloliquefaciens* und der Deletionsmutante (AK2).

Dabei wurde sowohl die mRNA des Wildstamms *Bacillus amyloliquefaciens* als Positivkontrolle als auch die der AK2 Mutante jeweils zweimal isoliert (9.15). Um sicher zu stellen, dass keine DNA mehr in den Proben vorhanden war, die ein falsch positives Ergebnis herbeiführen könnte, wurde eine PCR (9.3.1) durchgeführt zwecks derer vier Primerpaare (9.1) gefertigt wurden. Diese Primerpaare amplifizieren jeweils Sequenzen der Gene *baeB*, *H*, *J* und *R*. Die amplifizierten Sequenzen sollten für *baeB* eine Größe von 650 bp, für *baeH* 750 bp, für *baeJ* 1020 bp und für *baeR* 1010 bp zeigen, jedoch nur, wenn DNA

in den aufgereinigten mRNA-Proben vorhanden wäre, sowie in der Positivkontrolle. Als Positivkontrolle wurde die genomische DNA von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Resultate waren für die mRNA-Proben allsamt negativ und für die Positivkontrolle positiv ausgefallen (Abb. 54).

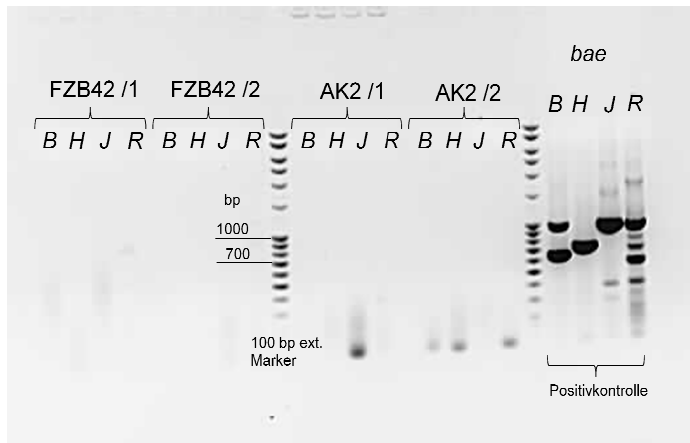


Abb. 54: Reinheitskontrolle der isolierten mRNA aus dem Wildtyp von *Bacillus amyloliquefaciens* (FZB42) und der Deletionsmutante (AK2).

Bei *baeB* der Positivkontrolle, zeigte sich neben der erwarteten Bande eine weitere unerwartete Bande bei etwa 1000 bp und bei *baeR* waren neben der erwarteten Bande bei 1000 bp noch einige kleinere Fragmente zu erkennen, die wahrscheinlich wegen mangelnder Spezifität der Primer amplifiziert wurden. Demgemäß wurde in einer PCR mit Temperaturgradienten die Temperatur angepasst. Bis auf die Positivkontrolle zeigten die Proben jedoch keine Banden, woraus geschlossen werden konnte, dass in der mRNA-Aufbereitung keine DNA mehr vorhanden war. Der Reinheitsgrad der mRNA war folglich hoch genug um eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchzuführen (9.3.3). Bei dieser wird die vorhandene RNA von der reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und die so gewonnen DNA-Stränge können wie in einer normalen PCR amplifiziert werden. Für die RT-PCR wurden die vier oben erwähnten Primerpaare verwendet. Die RT-PCR zeigte die erwarteten Banden sowohl für den Wildstamm, als auch für die Deletionsmutante AK2 und ebenfalls für die Positivkontrolle mit der genomischen DNA des Wildstamms FZB42 (Abb. 55).

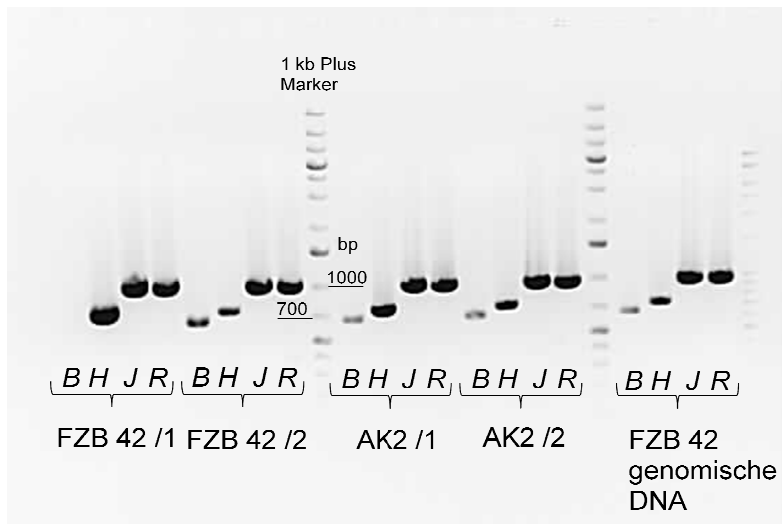


Abb. 55: RT-PCR mit der isolierten mRNA des Wildtyps *Bacillus amyloliquefaciens* (FZB42) und der Deletionsmutante (AK2). Als Positivkontrolle wurde genomische DNA des Wildtyps FZB42 verwendet.

Nur bei einer der beiden *Bacillus amyloliquefaciens* mRNA Proben wurde die Sequenz für *baeB* nicht amplifiziert. Da die beiden Proben aber theoretisch identisch sind, ist es wahrscheinlich, dass hier ein Pipettierfehler unterlaufen ist oder die PCR aus anderen Gründen nicht funktioniert hat. Dieses Resultat belegt, dass die *bae* Gene in der Deletionsmutante AK2 von *Bacillus amyloliquefaciens* transkribiert werden und die nicht erfolgreichen Fütterungsversuche nicht auf den Promotor von *Bacillus subtilis* zurückzuführen sind.

8.2.5 Aufnahme der SNAC-Intermediate in die Zelle

Eine andere mögliche Problemquelle könnte die Aufnahme der SNAC-Thioester in die Zelle sein. Um diese Theorie zu prüfen, wurden wie bereits in Kapitel 8.2.3. beschrieben, wieder drei Kulturen herangezogen und unter gleichen Konditionen (9.13.2) mit dem SNAC-Intermediat der KS2 gefüttert. Die Überstände wurden auf die übliche Weise behandelt. Das Zellpellet der Deletionsmutante AK2 wurde zur Spülung drei mal in 25 ml frisch zugeführtem destillierten H₂O resuspendiert und anschließend wieder abzentrifugiert und gefriergetrocknet. Das trockene Zellmaterial wurde 30 min in Aceton extrahiert, abzentrifugiert und der Überstand auf den SNAC-Thioester hin massenspektrometrisch untersucht. Der SNAC-Thioester konnte in dem Überstand der aufgeschlossenen Zellen nicht nachgewiesen werden. Das lässt vermuten, dass die SNAC-Intermediate von den Zellen nicht aufgenommen werden, was eine Erklärung für die ausbleibende

Weiterprozessierung der SNAC-Intermediate wäre. Dementsprechend wurde die Methodik abgeändert und statt einer *in vivo* Zufütterung die Möglichkeit eines *in vitro*-Assays getestet.

8.2.6 *In vitro*-Studien zur KS-Substratspezifität

Aufgrund der problematischen SNAC-Zufütterung *in vivo* wurde eine neue Strategie ausgearbeitet, bei der die Zugabe *in vitro* stattfinden sollte. Zu diesem Zwecke sollten die KS1, KS2, KS4, KS5 und KS6 exprimiert werden (Abb. 56).

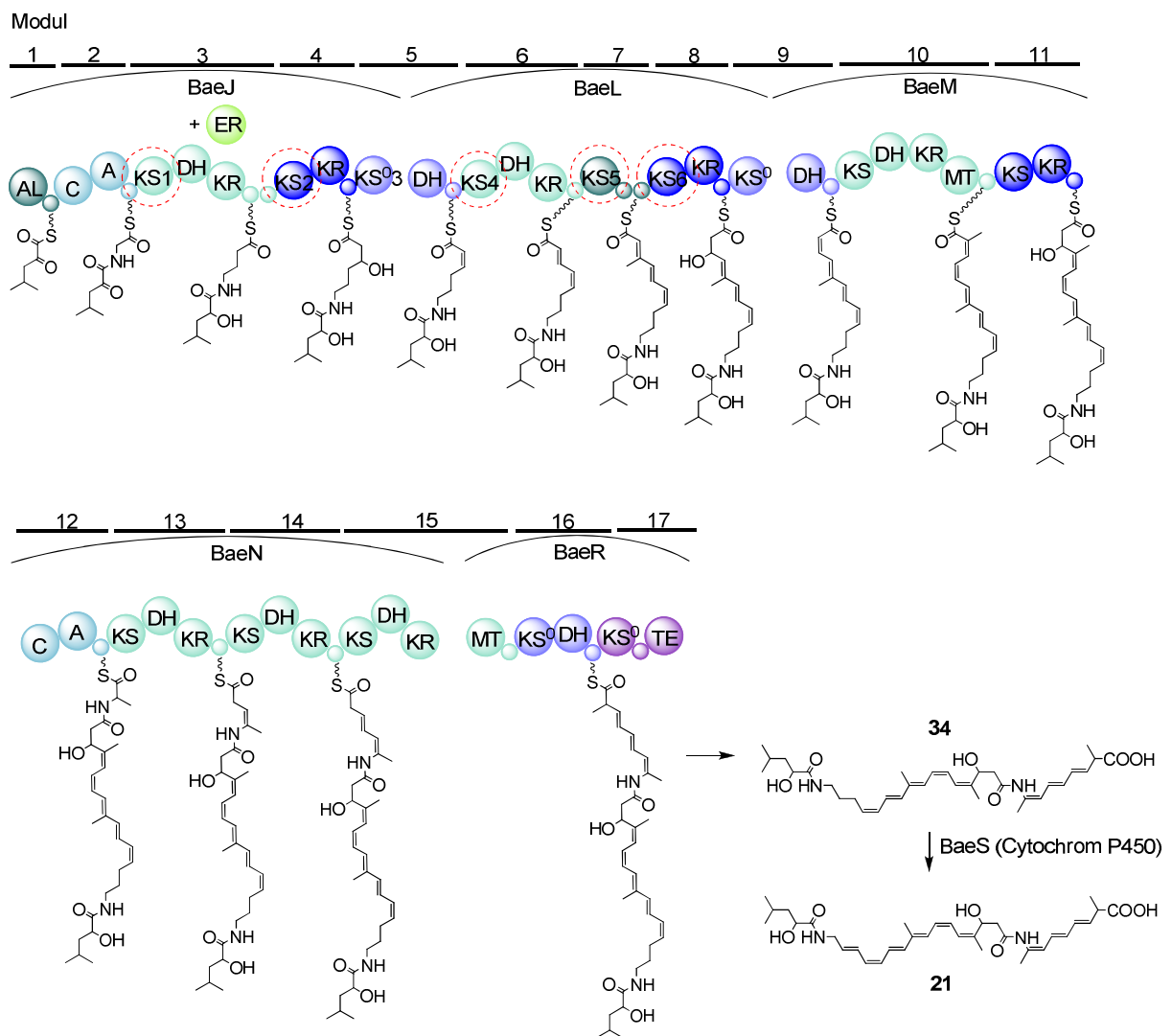


Abb. 56: Bacillaen-Biosynthese. Die rot umrandeten KS markieren die *in vitro* exprimierten KS.

Die KS3 ist inaktiv, weshalb sie bei der Expression nicht berücksichtigt wurde. Anschließend sollte eine Zugabe des SNAC-Thioesters *in vitro* stattfinden und untersucht werden,

inwiefern die KS die SNAC-Intermediate und ihre Derivate akzeptieren und wie schnell ihre Umsetzung ist.

8.2.7 Klonierung der KS-Sequenzen in einen *E. coli* Expressionsstamm

Im Rahmen ihrer Bachelorarbeit versuchte bereits Jana Kundert die KS2, KS4, KS5 und KS6 zu exprimieren. Die Expression der KS5 gelang. Bei der Fortführung in dieser Arbeit wurde die KS5 aber eigenständig, mit leicht veränderten Konditionen exprimiert. Die bereits für die Amplifikation der KS-Sequenzen gefertigten Primerpaare wurden größtenteils übernommen und nur leicht modifiziert (Tab. 6). Sie wurden auf Basis eines Alignments aller zu exprimierenden Bacillaen-KS erstellt, um den Beginn der jeweiligen KS zu bestimmen. Mit dem gleichen Verfahren, also einem vorhergehenden Alignment der KS1-Aminosäuresequenz mit den übrigen KS-Sequenzen, wurde das Primerpaar für die KS1 erstellt (Tab. 6). Die durch die PCR (9.3.1) generierten Sequenzabschnitte sollten für die KS1 1947 bp, KS2 2060 bp, KS4 1984 bp, KS5 2096 bp und für die KS6 2020 bp betragen. Die Amplifikation wurde für die Sequenzen der KS2, 4, 5 und 6 zunächst mit jeweils zwei Ansätzen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Für die drei zuletzt genannten KS war die PCR erfolgreich, wie mittels Geldokumentation (Abb. 57) gezeigt werden konnte, wobei jedoch bei KS6 unspezifische Banden bei zu niedriger Temperatur auftraten.



Abb. 57: Amplifikation der Sequenzen von KS2, 4, 5 und 6.

Die KS2-Sequenz hingegen konnte bei dieser PCR nicht amplifiziert werden. In einer erneuten PCR, die auch für die KS1-Sequenz durchgeführt wurde, konnten die

Gensequenzen beider KS gewonnen werden, wie die anschließende Geldokumentation belegte (Abb. 58).

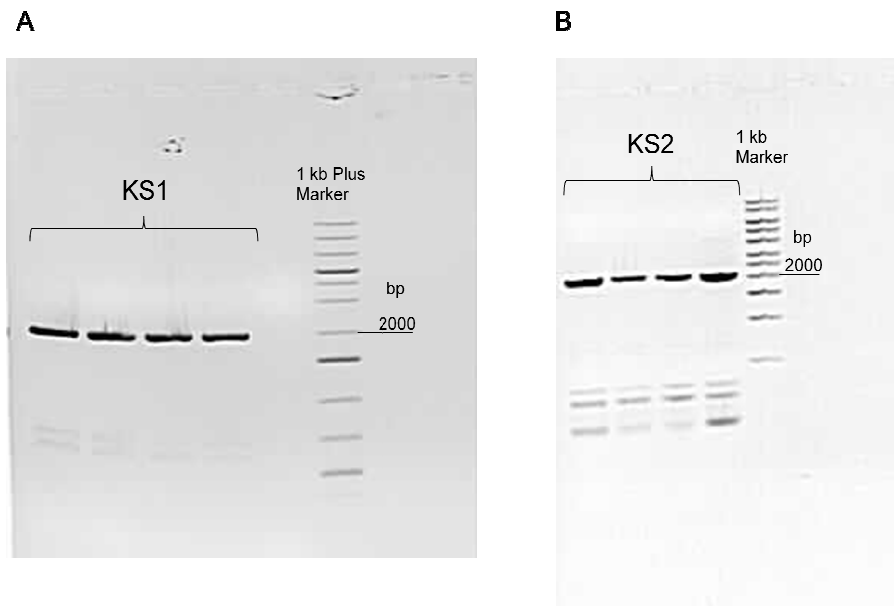


Abb. 58: Amplifikation der Sequenzen von (A) KS1 und (B) KS2

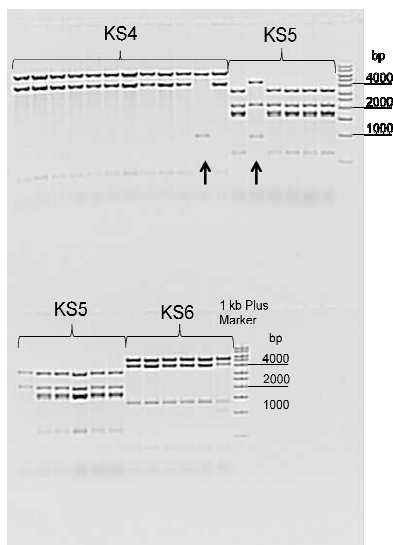
Die so gewonnen KS-Gensequenzen wurden im Anschluss mit Restriktionsenzymen geschnitten (9.12), so dass sie mit dem Expressionsvektor pHis8, der aus *E. coli* XL1 Blue mittels Minipräparation (9.11) gewonnen wurde, ligiert (9.7) werden konnten. Sowohl beim Vektor als auch bei den KS-Sequenzen wurden nach dem Restriktionsverdau die Restriktionsenzyme inaktiviert und bei dem Vektor zusätzlich eine Inkubation mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) durchgeführt, um eine Rezyklisierung des Vektors zu verhindern. Dabei wurden nicht alle KS-Gensequenzen mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt. Die DNA-Sequenzen der KS1, 4 und 6 wurden mit *NcoI* und *NotI* geschnitten, während die der KS2 und 5 mit *BamHI* und *NotI* verdaut worden sind. Dementsprechend wurde auch der Vektor für die Ligation in unterschiedlicher Weise vorbereitet. Die zusammengehörigen KS-Gensequenzen und Vektoren wurden miteinander ligiert (9.7). Das Ligationsprodukt wurde in elektrokompetente *E. coli* BL21 DE3 Zellen transformiert (9.9.2), die eigens dafür hergestellt worden sind (9.9.1). Der pHis8-Vektor (9.2.1) trägt eine Kanamycinresistenzkassette, weswegen die Selektion möglicher positiver Klone über das Ausplattieren auf einer mit Kanamycin versetzten Agarplatte erfolgte. Nach der gängigen Verfahrensweise wurden die gewachsenen Klone gepickt, kultiviert und der Erfolg der Transformation mittels einer Minipräparation der Plasmide kombiniert mit anschließendem Restriktionsverdau untersucht. Die verwendeten Restriktionsenzyme unterschieden sich für die einzelnen KS-Gensequenzen (Tab. 5).

Tab. 5: Verwendete Restriktionsenzyme und erwartete Bandengrößen für die Vektoren mit den KS-Gensequenzinserts

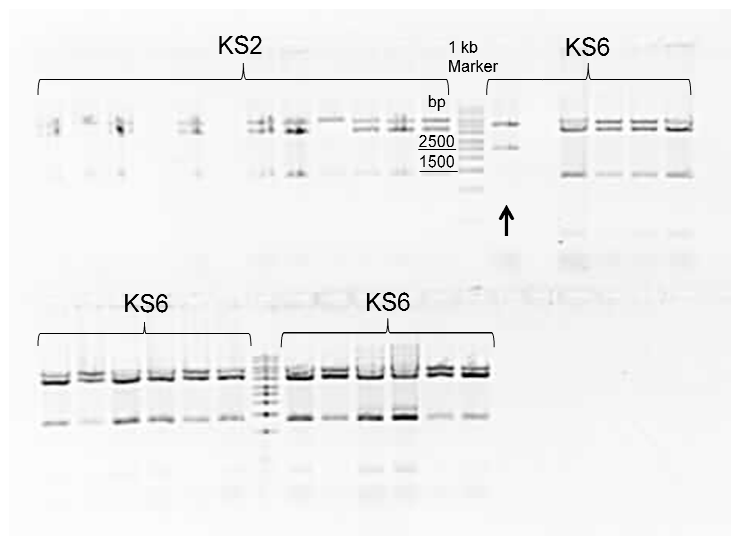
KS-Gensequenzinsert des Vektors	Verwendete Restriktionsenzyme	Erwartete Bandengrößen
KS1	<i>XmaI</i> + <i>NcoI</i>	4061 bp + 3206 bp
	<i>EcoRV</i> + <i>PstI</i>	5259 bp + 2000 bp
KS2	<i>EcoRI</i> + <i>EcoRV</i>	2207 bp + 5159 bp
KS4	<i>BamHI</i> + <i>EcoRI</i>	968 bp + 6287 bp
KS5	<i>AflIII</i> + <i>PstI</i>	4317 bp + 950 bp + 2090 bp
KS6	<i>BamHI</i> + <i>EcoRV</i>	4680 bp + 2431 bp

Es konnte für jede KS mindestens ein positiver Klon gefunden werden (Abb. 59 A-D).

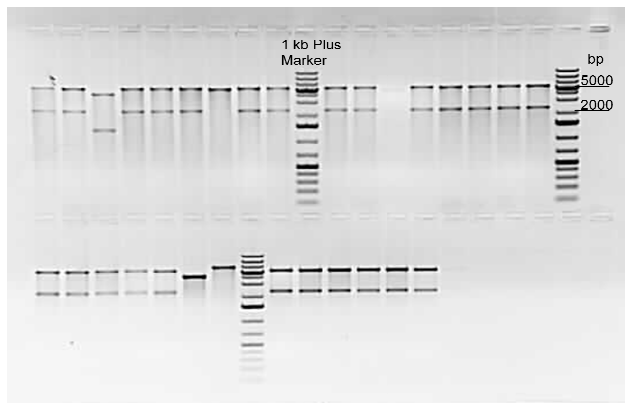
A



B



C



D

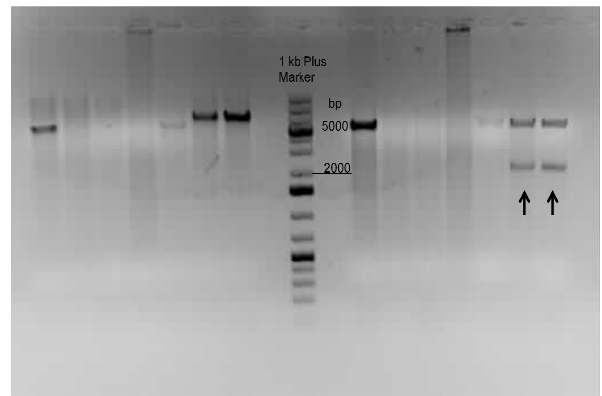


Abb. 59: Restriktionsverdau der isolierten Vektoren von Transformationsklonen. A und B zeigen positive Klone für die KS 4, 5 und 6, die jeweils mit einem Pfeil markiert sind. In C sind lediglich Vektoren mit integrierter KS2-Sequenz gezeigt, wovon bis auf wenige Ausnahmen alle positiv sind. In D sind nur Vektoren mit integrierter KS1 zu sehen, wobei die beiden positiven Klone ebenfalls mit einem Pfeil markiert worden sind.

Die so gewonnen Klone wurden kultiviert (9.13.1) und ihre Plasmid-DNA mittels einer Minipräparation isoliert (9.11) und zum Sequenzieren (9.8) eingeschickt. Mit der Sequenzierung konnte für alle Klone das Vorhandensein der korrekten Sequenzen der KS belegt werden.

8.2.8 KS-Expression

Die Expression der KS erfolgte durch Kultivierung der jeweiligen Klone und deren Induktion mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) bei Erreichen einer OD_{600} zwischen 0.5 - 1 (9.18.1). Der pHis8-Vektor, in den die KS-Sequenzen integriert worden waren, besitzt einen T7-Promotor, der durch einen Repressor inaktiviert wird. Die Zugabe von IPTG führt zu einer Bindung desselben an den Repressor, der dadurch eine Konformationsänderung erfährt und somit nicht mehr an den Operator binden kann. Folglich wird der Promotor nicht mehr behindert und die RNA-Polymerase kann mit der Transkription beginnen. Die Überexpression wird durch den leistungsstarken T7-Promotor ermöglicht. Nach einer Inkubation der Kulturen über Nacht (9.18.1) wurden die Proteine aufgereinigt (9.18.3). Auch bei dieser Aufreinigung half eine speziell integrierte Eigenschaft des pHis8-Vektors. Dieser besitzt die genetische Information für einen octa-Histidin-Tag (His8-Tag), der bei der Expression des Proteins am *N*-Terminus angehängt wird. Dieser His-Tag ermöglichte es, die gewünschten Proteine von anderen Proteinen und Ingredienzien zu trennen. Erreicht

wurde die Trennung durch die Verwendung einer Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Agarosesäule. Das octa-Histidin-getaggte Protein kann mittels Affinitätschromatographie an der Säule gebunden werden, während alle anderen Proteine und Inhaltsstoffe die Säule passieren bzw. eine geringere Affinität besitzen. Die Nickel-Ionen bilden einen Chelatkomplex mit den Imidazolringen der Histidine. Die ans Protein addierten Histidine werden aus dem Chelatkomplex durch einen Imidazolgradienten kompetitiv verdrängt und somit von der Säule eluiert, wobei alle weniger affinen Proteine die Säule vorher verlassen. Mit dieser gängigen Methode (9.18.3) wurden alle KS aufgereinigt und die verschiedenen konzentrierten Eluate anschließend mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (9.18.4) auf den Expressions- bzw. Reinigungserfolg hin geprüft. Das erwartete Molekulargewicht der einzelnen KS lag für KS1 bei etwa 73.5 kDa, für KS2 bei etwa 77.4 kDa, für KS4 bei etwa 75.1 kDa, für KS5 bei etwa 78.7 kDa und für KS6 bei etwa 76.4 kDa. Die in Abb. 60 A-E dargestellten SDS-Gele zeigen, dass die Expression und Aufreinigung aller fünf KS erfolgreich war.

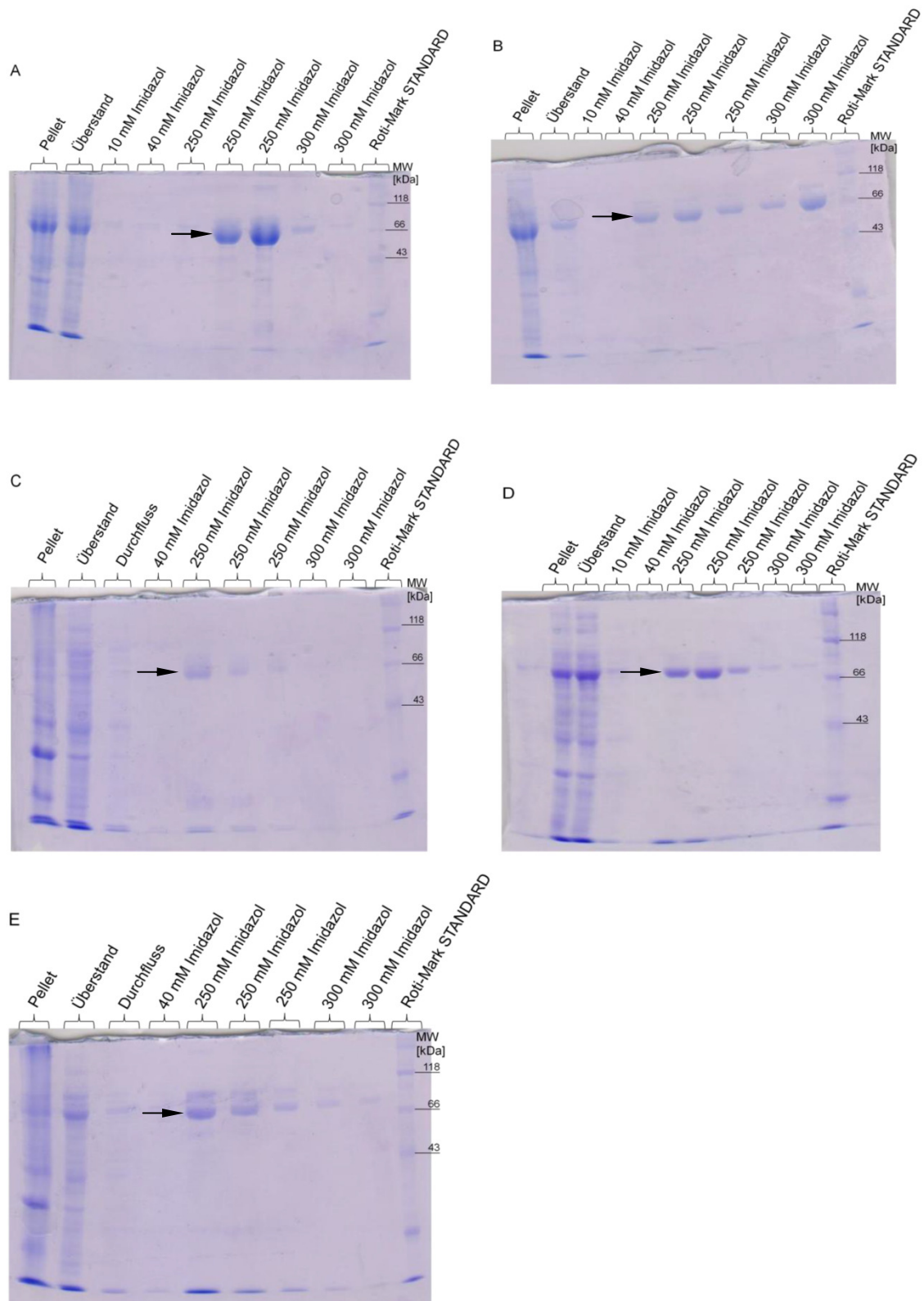


Abb. 60: Expression der ersten fünf aktiven KS des Bacillaen Genclusters. A: Expression der KS1; B: Expression der KS2; C: Expression der KS4; D: Expression der KS5; E: Expression der KS6. Die schwarzen Pfeile markieren die Bandenhöhe bei der, die jeweiligen KS zu sehen waren.

Lediglich die Expression von KS4 blieb trotz Optimierungsversuchen in Form von Wechsel des Mediums, Steigerung des Umfangs der Kultur und Änderung der IPTG Konzentration verhältnismäßig schwach.

8.2.9 *In vitro*-Umsetzung der SNAC-Derivate

Die folgenden Daten und Ergebnisse wurden an der Universität zu Nottingham in der Arbeitsgruppe von Neil Oldham in Zusammenarbeit mit Matthew Jenner erhoben. Alle erwähnten SNAC-Thioester wurden, wenn nicht explizit anders erwähnt, von Christoph Kohlhaas synthetisiert.

Die exprimierten Proteine wurden auf eine Konzentration von etwa 20 μM angereichert (9.18.6). Für die massenspektrometrische Analyse wurde die Proteinlösung direkt vor der Messung einem speziellen Reinigungsverfahren (9.18.8) unterzogen. Mittels ZipTip-Pipettenspitzen wurde die Probe entsalzt, konzentriert und gereinigt. Diese mit kleinen C4-Chromatographiesäulen versehene Pipettenspitzen wurden zunächst angefeuchtet, dann mit dem Protein beladen, gewaschen und das Protein zuletzt eluiert. Das proteinhaltige Eluat wurde in eigens dafür gefertigten, goldüberzogenen Glaskapillaren transferiert, um dann mittels Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) (9.18.9) detektiert zu werden. Die Elektronenspray-Ionisierung hob sich in jüngerer Zeit als wertvolles Werkzeug zur Proteinanalyse hervor. Die Nutzung der Massenspektrometrie und die Entwicklung schonender Ionisierungsmethoden wie ESI, ermöglichten es große und komplexere Proteine zu analysieren. Die Ionisierung und Desolvatisierung der Biomoleküle aus Lösungen in die Gasphase ohne Übertragung von hoher innerer Energie auf die molekularen Ionen ist ein großer Vorteil dieser Methode, die damit den Erhalt von kovalenten und nicht kovalenten Strukturen des Proteins ermöglicht.¹⁵⁹ Mit dieser Methode konnten die erwarteten oben genannten Massen unter Berücksichtigung des Geräte abhängigen Fehlers für alle exprimierten KS (Abb. 60) detektiert werden mit Ausnahme von KS4. Es ist stark anzunehmen, dass die Detektion der KS4 aufgrund ihrer zu niedrigen Konzentration nicht möglich war. Trotz Aufkonzentrierung durch ein Vivaspin Zentrifugalkonzentrator (9.18.6) konnte keine entsprechende Masse detektiert werden. Des Öfteren waren die Proteine nach dem Auftauen auch degradiert, was die KS funktionsunfähig machte. Somit mussten alle KS erneut exprimiert und aufgereinigt werden. Da die technische Ausstattung an der Universität Nottingham es nicht ermöglichte die Expression und Aufreinigung in exakt der selben Weise wie in Bonn durch zu führen, werden in 9.18.1 und 9.18.3 die dortigen Konditionen der

Expression und Aufreinigung, die mittels FPLC (**F**ast **p**rotein **l**iquid **c**hromatography) vorgenommen wurde, näher erläutert.

Die anderen KS konnten in ausreichender Konzentration im intakten Zustand gewonnen werden. Das ermöglichte die Messung der Bindung der jeweils zugesetzten SNAC-Thioester.

8.2.10 *In vitro*-Assays zur Substratspezifitätsanalyse der KS1

Für die KS1 wurden acht SNAC-Thioester synthetisiert (Abb. 61), wobei (**50**) dem natürlichen Intermediat der KS1 entspricht, während es sich bei (**51**) und (**52**) um Derivate des in der Biosynthese vertretenen Intermediats der KS1 handelt.

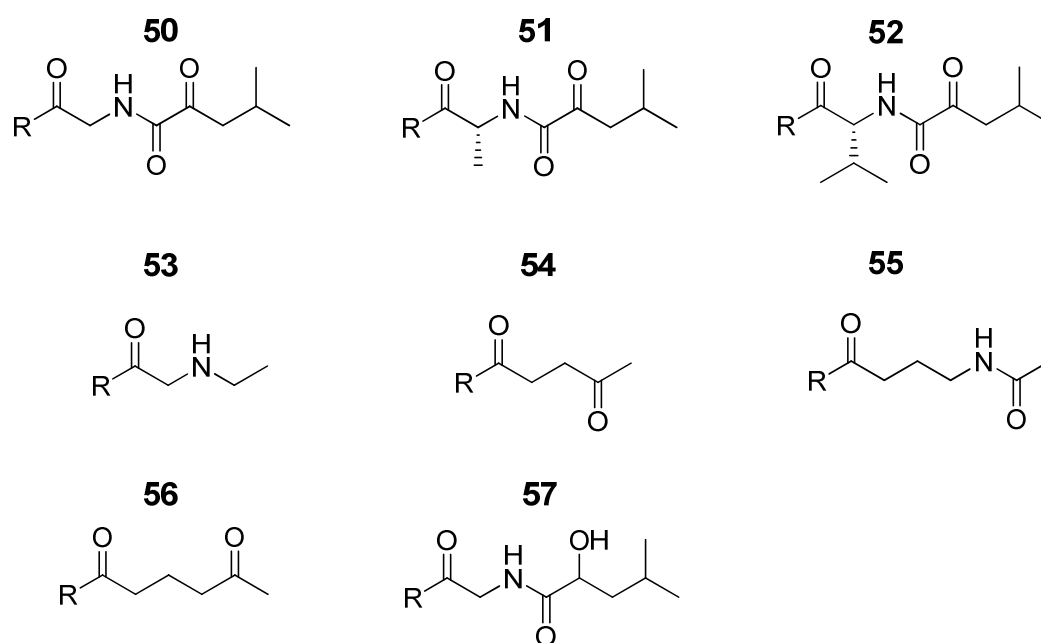


Abb. 61: SNAC-Thioester zur Prüfung der KS1 Spezifität. R = SNAC

Die Proteinlösung wurde nach der in Kapitel 9.18.3 beschriebenen Methode aufgereinigt und 1:20 mit dem jeweiligen SNAC-Thioester versetzt, dessen Endkonzentration auf 0.5 mM eingestellt wurde. Die Dauer der Inkubation mit dem SNAC-Thioester wurde von 30 s bis maximal 45 min, je nach Reaktionsgeschwindigkeit variiert. Die Reaktion wurde dann mittels Trifluoressigsäure (TFA) gestoppt. Mittels ESI-MS konnten nach ausreichender Inkubationszeit zwei Ionen detektiert werden. Ein Beispiel für den Umsatz des SNAC-Thioesters des natürlichen Intermediats der KS1 durch die KS1 ist in Abb. 62 zu sehen.

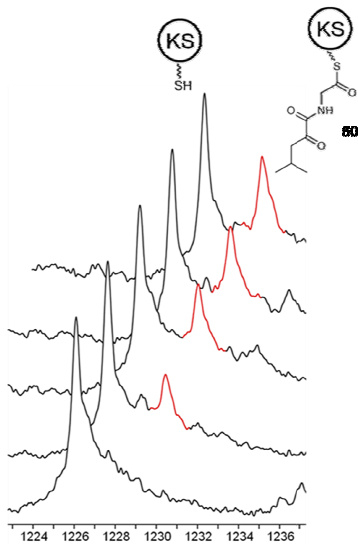


Abb. 62: Acylierung der Bae KS1 mit einem SNAC-Thioester. Die gestaffelten Massenspektren wurden mit zunehmenden Inkubationszeiten aufgenommen. Das Protein trägt eine 60fache positive Ladung.

Ein Signal wurde von der unbeladenen KS und das, mit der Zeit anwachsende, zweite Signal von der mit dem SNAC-Thioester acylierten KS hervorgerufen. Anhand der Relation der beiden Ionen zueinander konnte die Umsatzgeschwindigkeit des SNAC-Thioester ermittelt werden. Die drei SNAC-Thioester **50**, **51**, **52** unterscheiden sich in ihrer α -Position. Dabei trägt der SNAC-Thioester **50** nur Wasserstoff an dieser Position und entspricht somit dem natürlichen Intermediat, das einen Glycinrest enthält. Der SNAC-Thioester **51** weist in dieser Position hingegen eine Methylgruppe, entsprechend dem Alanin-Derivat und der SNAC-Thioester **52** eine Butylgruppe entsprechend dem Valin-Derivat, auf. Das heißt die angehängte Gruppe nimmt in ihrer Dimension zu. Das aus den kinetischen Analysen ermittelte Diagramm (Abb. 63) verdeutlicht die erhaltenen Resultate in Bezug auf die Umsatzrate der drei zuvor genannten SNAC-Thioester.

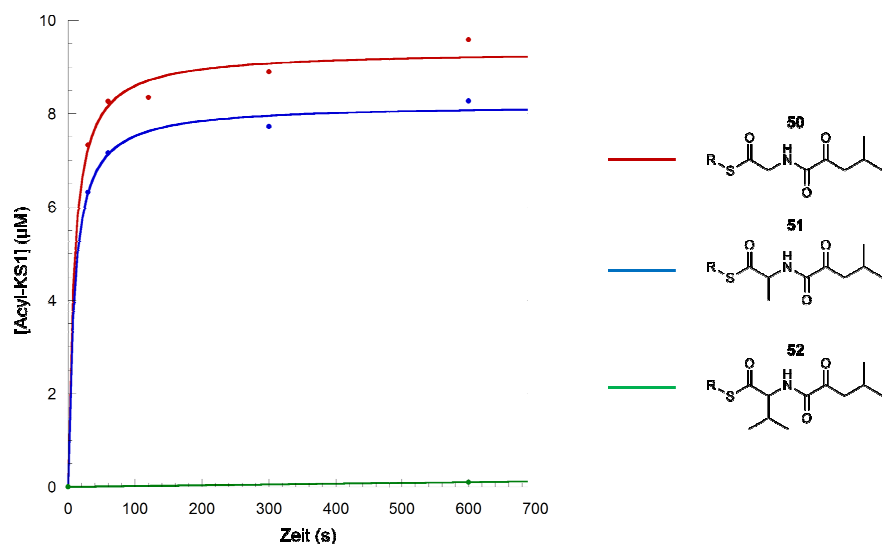


Abb. 63: Kinetische Analyse der Umsatzrate der KS1 diverser SNAC-Thioester

Mit zunehmender Größe der substituierten Gruppe an der α -Position sinkt die Umsatzgeschwindigkeit. Bei dem Valin-Derivat ist keine Acylierung messbar. Eine denkbare Erklärung ist die zunehmende sterische Hinderung, die durch diese Gruppe erzeugt wird. Anzunehmen ist, dass die Tasche mit dem aktiven Zentrum der KS so konzipiert ist, dass eine zunehmende Größe des α -Substituenten eine Behinderung der Aufnahme bedeutet und im Falle des Valin-Derivats die Gruppe eine Größe erreicht hat, bei der das SNAC-Derivat nicht mehr akzeptiert werden kann. Diese Einschränkung könnte ein Grund sein, weshalb bis heute nur Glycin, Alanin und Serin als *trans*-AT-PKS-inkorporierte Aminosäuren bekannt sind, soweit sie nicht durch andere, nicht zur *trans*-AT-PKS zugehörigen Enzymen, bearbeitet wurden.⁷⁹ Auch die Hypothese, dass diese Position für die Spezifität der KS entscheidend ist, wird hier bestätigt.

Messungen mit SNAC-Thioestern, die noch andere funktionelle Eigenschaften besaßen, sollten weitere Erkenntnisse über die Substraterkennung und -spezifität der KS1 aufdecken. Die Strukturen der SNAC-Thioester **53** - **57** (Abb. 61) glichen dabei in weiten Teilen dem natürlichen Acylsubstrat, wies aber eine gezielt veränderte Funktionalität bestimmter Positionen auf. Um die Rolle des Stickstoffs und der Carbonylgruppe der Amidgruppe näher zu untersuchen, wurden die SNAC-Ester **53** und **54** (Abb. 61) synthetisiert. Die Akzeptanz der KS1 für den 2-Amino-SNAC-Thioester und den 4-Keto-SNAC-Thioester war sehr konträr. Während der SNAC-Thioester **53** nicht nur akzeptiert, sondern sogar effizienter als das natürliche Substrat umgesetzt wurde, fand mit dem SNAC-Thioester **54** keine Acylierung statt. Dies impliziert, dass der Stickstoff der Amidfunktion eine zentrale Rolle bei der Erkennung des Substrats spielt, während die Carbonylfunktion von geringerer Bedeutung ist.

Der pK_a des Aminogruppen- und des Amidgruppen-Stickstoffs weichen zwar erheblich voneinander ab, aber in beiden Fällen sollte der Stickstoff ein effektiver H-Brücken-Donator sein. Zwar konnten neben dem Stickstoff keine weiteren günstigen Interaktionen festgestellt werden, was jedoch nicht die Möglichkeit anderer stabilisierender Interaktionen zwischen der KS und dem Substrat ausschließt.

Mit dem SNAC-Thioester **55** sollte eine mögliche Auswirkung beim Verschieben der Amidfunktion in die 4-Position ergründet werden, was den Einbau einer γ -Aminosäure in die Kette entsprechen würde. Es konnte jedoch keine Acylierung der KS1 beobachtet werden, was dafür spricht, dass das Substrat auf einer α -Aminosäure basieren muss. Auch eine mögliche Fernwirkung der Carbonylgruppe des 2-Keto-4-Methylpentanoylteils des natürlichen Intermediats **50** ist untersucht worden. Dafür wurde der SNAC-Ester **56** synthetisiert. Dass diese Carbonylfunktion keine entscheidende Rolle spielt, zeigte die ausbleibende Acylierung. Desweiteren wurde diese Carbonylfunktion im SNAC-Thioester **57** durch eine Hydroxyfunktion ersetzt, was einen leichten Abfall der Acylierungsrate verglichen zum natürlichen Intermediat zur Folge hatte. Dieser Effekt wird möglicherweise durch den Verlust der Planarität an dieser Stelle des Substrats hervorgerufen.

Zusammengenommen belegen die Ergebnisse, dass die α - und β -Position eine zentrale Rolle für die Substraterkennung spielen, aber den darüber hinausreichenden Positionen des Substrats für die Selektivität der KS1 keine offensichtliche Funktion zukommt. Diese Beobachtungen entsprechen der allgemeinen Vorhersage, dass die Substratspezifität der KS-Domänen durch die ersten drei bis vier Atome der Acylkette bestimmt werden.³⁸

In der Arbeit von Jenner *et al.*¹⁶⁷ konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte Position in der Aminosäuresequenz vor einem konservierten Cysteinrest, entscheidend für die Spezifität der Enoylsubstrate erkennenden KS ist (8.2.13). Auch bezüglich der KS1 wurden ähnliche Experimente von Matthew Jenner durchgeführt, um zu sehen, ob diese Position eine Rolle bei der Spezifität spielt. In diesem Fall nimmt ein Asparaginrest die Position vor dem Cysteinrest ein. Unterstützt wird diese Theorie durch ein Alignment mit anderen KS, die bekanntlich Aminosäuren akzeptieren. Ein beträchtlicher Anteil dieser KS enthielt ein Asparagin in dieser Position. Um den Einfluss dieser Aminosäure auf die Substraterkennung zu testen, konstruierte Matthew Jenner eine Mutante, bei der der Asparaginrest durch einen Alaninrest ausgetauscht worden ist. Tatsächlich konnte bei der Acylierung sowohl mit dem SNAC-Thioester des natürlichen Intermediats als auch mit anderen SNAC-Thioestern, bei denen die relevante Position durch einen Stickstoff eingenommen wurde, eine deutliche Senkung der Umsatzrate beobachtet werden. Dementsprechend wird angenommen, dass das Asparagin mit dem 2-Amidoacetylsubstrat Interaktionen eingeht, die sich unterstützend bei der Acylierung auswirken.¹⁶⁸

8.2.11 *In vitro*-Assays zur Substratspezifitätsanalyse der KS2

Alle in diesem Kapitel präsentierten Messungen der Umsetzung der SNAC-Thioester wurden gemeinsam mit Matthew Jenner in Nottingham durchgeführt.

Die KS2 wurde gleichermaßen, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, behandelt. Es wurden lediglich andere SNAC-Thioester verwendet, um die Substratspezifität zu testen. In Abb. 64 sind die verwendeten SNAC-Thioester dargestellt, und Abb. 65 zeigt die Umsatzraten der jeweiligen SNAC-Thioester. Die SNAC-Thioester **58** und **59** wurden von Sarah Frank synthetisiert.

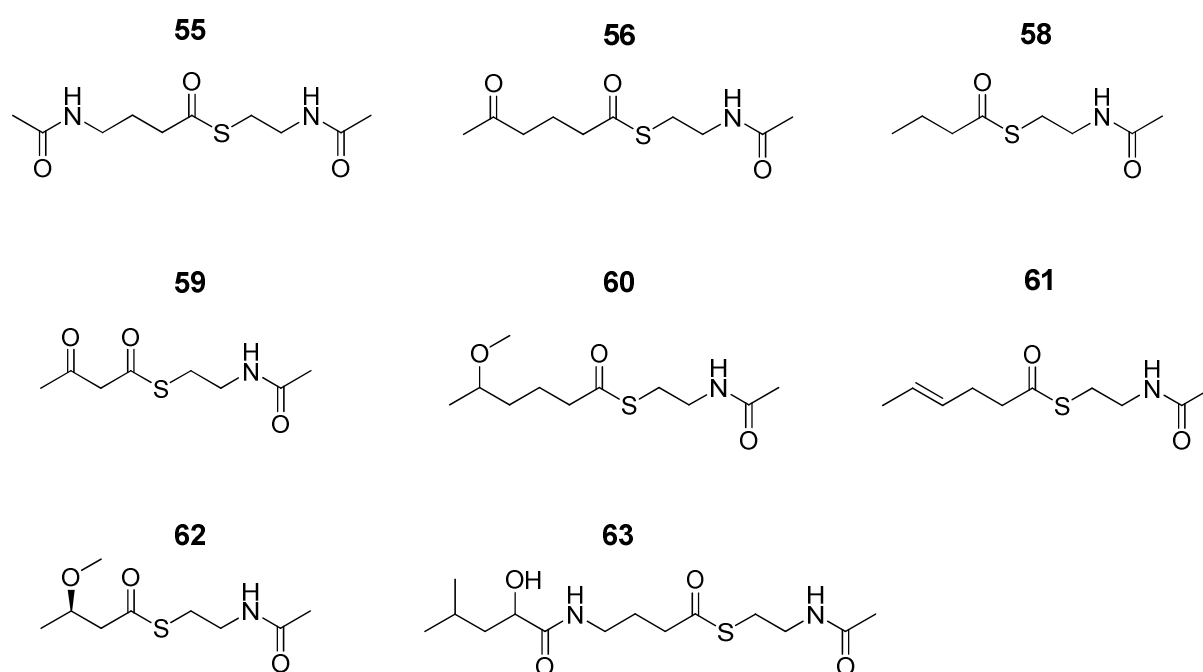


Abb. 64: SNAC-Thioester zur Prüfung der KS2 Spezifität

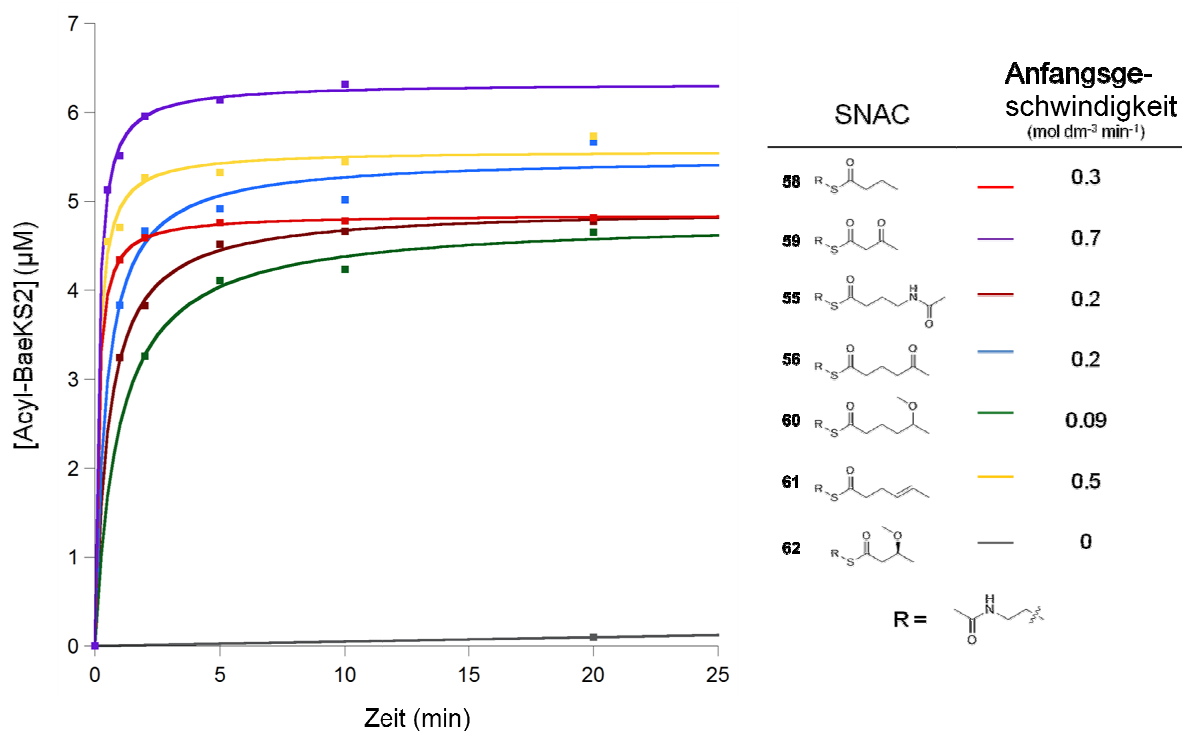


Abb. 65: Kinetische Analyse der Umsatzrate der KS2 diverser SNAC-Thioester. Die Anfangsgeschwindigkeit wurde aus $\ln[\text{KS}]/[\text{KS}_0]$ gegen die Zeit ermittelt.

Bei den SNAC-Thioestern **56**, **60** und **61**, deren Stickstoff der Amidgruppe durch eine andere Funktion ersetzt worden ist, zeigt sich, dass in zwei Fällen **61** und **56** die Umsatzrate sogar schneller ist als bei dem SNAC-Thioester **55**. Dieser gleicht einem Teil des natürlichen Intermediats, aber weist nicht seine komplette Länge auf. Der Stickstoff, der bei der KS1 eine zentrale Rolle für die Substratspezifität gespielt hat, hat nach seiner Verlagerung in die δ -Position also keine tragende Schlüsselrolle mehr. Es ist außerdem anzumerken, dass auch ein SNAC-Thioester des natürlichen Intermediats (**63**) synthetisiert worden ist, dieser jedoch eine Umsatzrate von null zeigte. Eine Erklärung wäre, dass der SNAC-Thioester sich nicht in dem Reaktionspuffer (9.18.7) lösen lässt und somit ausgefallen ist. Jedoch ist anzunehmen, dass die Umsatzrate des SNAC-Thioesters **55** der des natürlichen Intermediats zumindest sehr nahe kommt. Die höchste Umsatzrate wurde durch den SNAC-Thioester **61** erzielt. Dieser hat eine geringe Ausdehnung, da er anstatt der Amidfunktion lediglich eine Alkenfunktion besitzt. Dies führt zu der Annahme, dieser SNAC-Thioester werde möglicherweise schneller umgesetzt, da er die geringsten sterischen Hinderungen aufweist. Der SNAC-Thioester **60**, der an Stelle des Stickstoffs der Amidfunktion eine Methoxygruppe aufweist, zeigte eine verminderte Umsatzrate. Dies spricht ebenso dafür, dass größere Gruppen in dieser Position zur sterischen Hinderung führen und einen geringen Einfluss auf die Umsatzrate haben. Desweiteren kann dieser SNAC-Thioester im Gegensatz zum SNAC-

Thioester **56** keine Wasserstoffbrückenbindungen an dieser Position bilden. Jedoch werden alle diese vier SNAC-Thioester akzeptiert und umgesetzt. Folglich hat diese Position keine entscheidende Schlüsselrolle für die Akzeptanz des Substrats. Die Substratspezifität der KS2 wird also nicht von dieser Position festgelegt und die Amidgruppe ist nicht zwangsläufig notwendig. Wie schon bei der KS1 diskutiert, wurde die These erstellt, dass die ersten Positionen die entscheidenden für die Substratspezifität sind. Dementsprechend wurden die SNAC-Thioester **58**, **59** und **62** auf ihre Umsatzrate getestet. Für SNAC-Thioester **58** zeigte sich dabei eine schnellere Umsatzrate als für den SNAC-Thioester **55**, die beide verkürzte Versionen des natürlichen Intermediats darstellen. Dies ist erklärbar durch die kürzere Kettenlänge. Der SNAC-Thioester **59** zeigt die höchste Umsatzrate, was zum einen an der kurzen Kettenlänge liegen könnte und zum anderen an der Möglichkeit zur Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Carbonylgruppen. Diese sind außerdem zur Keto-/Enolautomerie fähig und somit noch flexibler und anpassungsfähiger. Diese Annahme wird untermauert durch den SNAC-Thioester **62**, der überhaupt nicht umgesetzt wird. Erklärbar wäre dies mit der Methoxygruppe, die keine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann und zudem noch durch ihre Größe eine zunehmende sterische Hinderung darstellt.

Insgesamt liegt hier also ein ähnliches Ergebnis wie für die KS1 vor. Auch hier ist die β -Position eine der entscheidenden Positionen und spielt eine größere Rolle als die nachfolgenden Positionen. Das lässt vermuten, dass die Enzymtasche an der Stelle, wo das Substrat Kontakt mit dem Enzym hat, relativ statisch ist und vor allem größere Funktionen, die dieser Position anhängen, nicht aufnehmen kann.

8.2.12 *In vitro*-Assays zur Substratspezifitätsanalyse der KS4

Wie in Kapitel 8.2.8 dargestellt, gestaltete sich die Expression der KS4 als relativ schwierig. Auch wenn ein Expressionsergebnis zu sehen war, konnte weder mit den Methoden in Bonn noch mit denen in England eine zufriedenstellende Konzentration erreicht werden. Mit Hilfe des Vivaspin Zentrifugalkonzentrators gelang es zumindest die Konzentration auf 14 μM zu heben. Die massenspektrometrische Analyse zeigte jedoch, dass das Protein degradiert war (Anhang Abb. 84). Dementsprechend konnten keine Acylierungsversuche durchgeführt werden. Trotz mehrmaliger Bemühungen blieben die Expressionssteigerungsversuche erfolglos. Eine denkbare Ursache wäre eine falsche Proteinfaltung, die durch zu kurze oder lange Linkerregionen zu Stande gekommen ist. Kapitel 8.2.15 beschreibt diesbezüglich getroffene Maßnahmen um dieses Problem zu beheben.

Für die KS4 wurden neben dem SNAC-Thioester des natürlichen Intermediats, das in *Z*-Konfiguration bezüglich seiner α,β -ungesättigten Carbonylverbindung vorliegt, auch ein Thioester mit der *E*-Konfiguration synthetisiert. Dabei sollte die interessante Frage geklärt werden, ob die Substraterkennung auch Konfigurationsisomere mit einschließt. Darüber hinaus wurden zwei weitere SNAC-Thioester synthetisiert. Der SNAC-Thioester **64** (Abb. 66) weist eine zusätzliche Methylfunktion in der γ -Position auf.

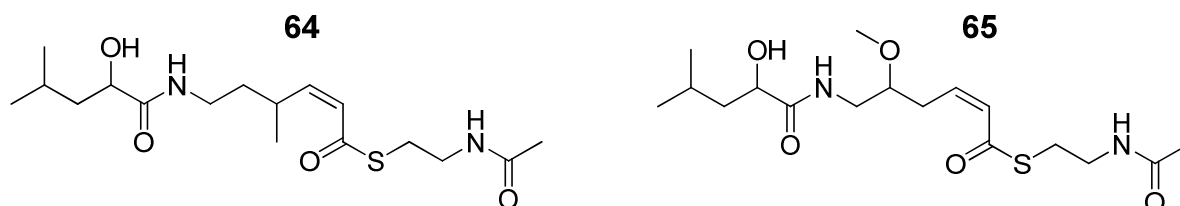


Abb. 66: SNAC-Thioester zur Prüfung der KS4 Spezifität

Acylierungsversuche mit diesem SNAC-Thioester würden Auskunft über die Toleranz gegenüber Angliederung von Funktionen in dieser Position zeigen. Der SNAC-Thioester **65** (Abb. 66) mit seiner Methoxygruppe in der δ -Position hingegen würde Erkenntnisse über Wechselwirkungen mit weiter entfernten Abschnitten der Kette aufdecken.

8.2.13 *In vitro*-Assays zur Substratspezifitätsanalyse der KS5

Die massenspektrometrischen Acylierungsmessungen wurden bei KS5 allein von Matthew Jenner durchgeführt. Generell sind die hier beschriebenen Ergebnisse auf seine Arbeit zurückzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde KS5 lediglich exprimiert und für die massenspektrometrischen Messungen eingereicht. Nur ein paar noch lückenfüllende Messungen wurden zusammen gemessen.

In diesem Fall wurden nur Acylierungsreaktionen mit kurzen SNAC-Thioestern gemessen (Abb. 67).

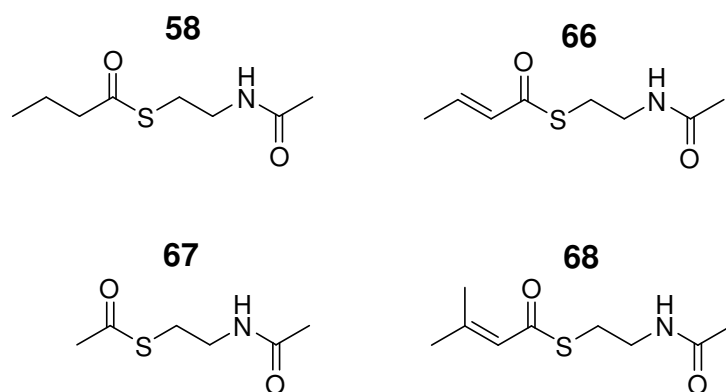


Abb. 67: SNAC-Thioester zur Prüfung der KS5 Spezifität

KS5 gehört dem Modul an, das eine β -Kohlenstoffverzweigung in die wachsende Polyketidkette einführt.⁶⁹ Basierend auf bioinformatischen Analysen wurde für die KS5 vorhergesagt, dass sie ein α,β -ungesättigtes Intermediat akzeptiert.³⁸ Bei den SNAC-Thioestern **66** und **68** handelt es sich um verkürzte Ausgaben der natürlichen Intermediate von KS5 bzw. KS6. Der SNAC-Thioester **66** acylierte die KS5 relativ effizient, wie auch zu erwarten war (Abb. 68).

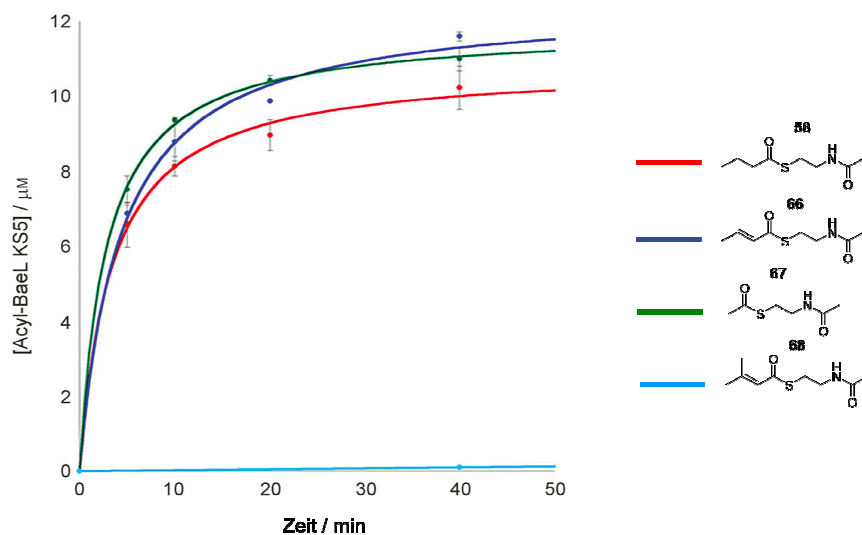


Abb. 68: Kinetische Analyse der Umsatzrate der KS5 diverser SNAC-Thioester

Die beiden SNAC-Thioester **58** und **67** zeigten nahezu gleiche Umsatzraten (Abb. 68). Der SNAC-Thioester **68** hingegen wird nicht als Substrat akzeptiert. Folglich ist die KS5 streng spezifisch für in der β -Position unverzweigte Substrate. Um die Gründe dafür näher zu beleuchten, wurden weitere Untersuchungen von Matthew Jenner durchgeführt, die im

folgenden beschrieben sind. Mit dem Programm "CPHmodel"¹⁶⁹ wurde das aktive Zentrum der KS5 und KS6 mit darin eingebetteten Substrat konstruiert. Dabei zeigte sich, dass eine Aminosäure scheinbar eine eklatante Rolle bei der Akzeptanz des Substrats spielte. Sie liegt in der unmittelbaren Nähe der β -Position des eingebetteten Substrats und unterscheidet sich in der KS5 und KS6. Während bei der KS5 an dieser Stelle ein sperriges Methionin vorliegt, weist die KS6 das kleinere Alanin auf. Das voluminöse Methionin versperrt den ebenfalls sperrigen verzweigten Substraten den Platz im aktiven Zentrum, während das kompakte Alanin den Zutritt freilässt. Belegt werden konnte diese Annahme mit der Erzeugung einer KS, in der das Methionin mittels einer entsprechenden Sequenzänderung durch ein Alanin ersetzt wurde. Es zeigte sich, dass diese Mutation die KS zur Umsetzung der verzweigten Substrate befähigte (Abb. 69).

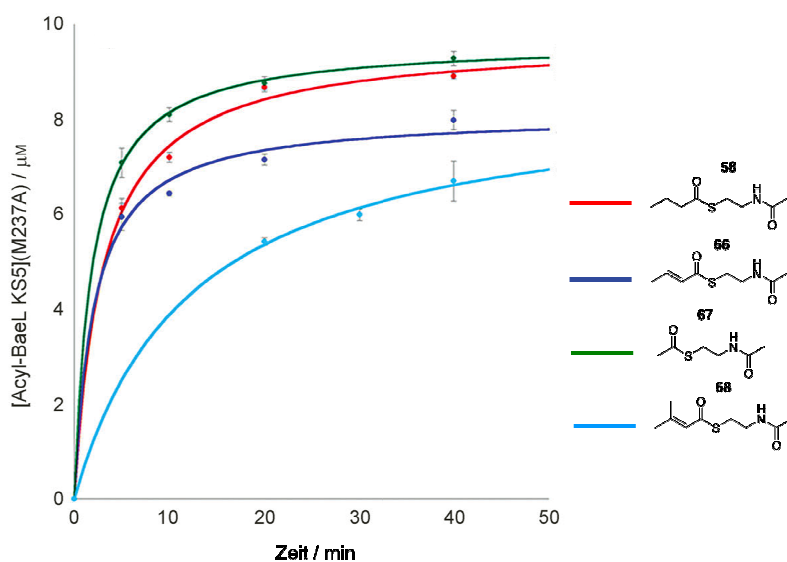


Abb. 69: Kinetische Analyse der Umsatzrate der mutierten KS5 von diversen SNAC-Thioestern

Eine Sequenzanalyse der KS-Domänen, die in der Studie von Nguyen *et al.*³⁸ benutzt worden sind, wurde mit dem Fokus auf die relevante Aminosäure hinzugezogen. Herausgearbeitet wurde, dass ein Großteil der KS-Domänen an dieser Stelle ein Alanin besitzt. Allerdings ließen sich auch davon abweichende Claden finden, die eine offensichtliche Deviation dazu bilden. Zugehörend zu diesen Claden ist z.B. auch die Clade IX, in die die KS fallen, die Enoylsubstrate umsetzen. In diese Gruppe gehört auch die BaeL KS5. 94% dieser KS-Domänen weisen ein Methionin an der relevanten Stelle auf.¹⁶⁷ Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass Methionin entscheidend für die Spezifität für unverzweigte Substrate ist.

Die phylogenetische Analyse^{38,129} würde ein höheres Level an Spezifität der KS-Domänen erwarten lassen. Dies könnte auf die deutlich reduzierte Kettenlänge oder aber auf eine Spezifität, die durch die Funktionalität der Gruppe in der β -Positionumgebung, zurückzuführen sein. Diese Frage ließe sich mit längererkettigen Substraten, die damit nur von einer Richtung in das aktive Zentrum aufgenommen werden können, beantworten.

Auch Rückschlüsse bezüglich der Evolution der *trans*-AT-PKS können aus diesen Ergebnissen gezogen werden. Die derzeit aktuelle Hypothese geht davon aus, dass der evolutionäre Ursprung von *cis*-AT- und *trans*-AT-PKS unterschiedlich ist. Demnach entwickelten sich *trans*-AT-PKS mittels horizontalem Gentransfer, bei dem sich Substratspezifische KS-Domänen aggregierten.^{38,129} Im Gegensatz dazu haben sich *cis*-AT-PKS durch das Duplizieren ganzer Module entwickelt.¹³⁰ Diese evolutive Entwicklung setzt eine relativ geringe Substratspezifität voraus, die für viele KS von *cis*-AT-PKS beobachtet werden konnte.¹⁶⁷ Der Vergleich der relevanten Aminosäure im aktiven Zentrum zeigte, dass bei *trans*-AT-PKS, die Kohlenstoff verzweigte Substrate akzeptieren, an dieser Position eine sterisch wenig anspruchsvolle Aminosäure, wie Alanin oder Glycin, sitzt. Bei Amidfunktion enthaltenden Substraten wird diese Stelle ausschließlich durch ein Asparagin besetzt.¹⁶⁸ Bei den aus der Literatur bisher bekannten *cis*-AT-PKS befindet sich hingegen immer nur ein Alanin an dieser Position. Da die KS der *cis*-AT-PKS die Aminosäure in der ausschlaggebenden X-Position vor dem konservierten Cystein in der aktiven Enzymtasche vermutlich aufgrund ihrer anders gearteten Evolution nicht variieren, zeigen sie diesbezüglich nicht die gleiche Substratspezifität wie die KS von *trans*-AT-PKS. Während die KS von *cis*-AT-PKS also nicht zwischen in der β -Position verzweigten (und damit sperrigen) und unverzweigten Substraten differenzieren kann, sind KS von *trans*-AT-PKS aufgrund der Variation ihrer Aminosäure in der X-Position dazu in der Lage.

8.2.14 *In vitro*-Assays zur Substratspezifitätsanalyse der KS6

Die KS6 konnte zunächst durch die Proteinexpression mit anschließender Aufreinigung über die FPLC nicht gänzlich rein erhalten werden. Das Protein lag zwar in einem undegradierten Zustand vor, jedoch war eine Verunreinigung mit einer Substanz der Masse, die in dem Bereich lag, die für die Acylierungsmessungen entscheidend waren, zu detektieren. Folglich wurde eine weitere Aufreinigung mittels einer Superdex-Säule vorgenommen. Das Resultat war eine gut aufgereinigte, nicht degradierte KS6 (Anhang Abb. 85). Die verzeichnete Masse betrug 76432 +/- 2.03 Da und stimmte damit mit der theoretisch berechneten Masse von 76429 Da überein. Nichtsdestotrotz wurden die angebotenen SNACs **66** und **68** (Abb. 67)

nicht umgesetzt oder so langsam, dass die im Normalfall viel langsamer als die Acylierung stattfindende Konkurrenzreaktion, eine 1,3-Addition¹⁶⁷ (Abb. 70), schneller stattfand.

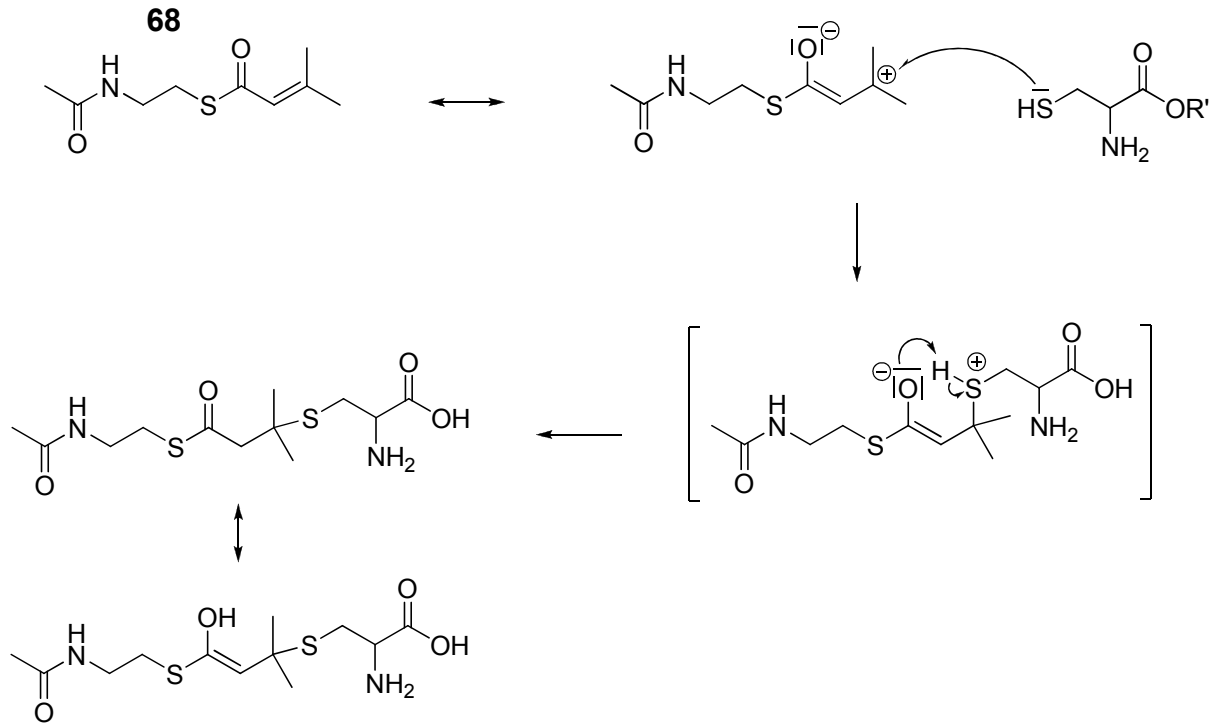


Abb. 70: 1,3-Addition als Konkurrenzreaktion zur Acylierung

Bei dieser wird das Schwefelatom von Cysteinen des Proteins an die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung des SNAC-Thioesters addiert. Damit wird der komplette SNAC-Thioester an das Protein gebunden und die Acylierungsreaktion wird verhindert. Die 1,3-Addition wurde mittels ESI-MS detektiert, da die Masse der KS um die Masse des gesamten SNAC-Thioesters zunahm. Die Zugabe der beiden SNAC-Thioester hätte die Fragestellung klären sollen, ob die KS6 nur spezifisch für eine Methylverzweigung ist, die durch das vorhergehende Modul mittels einer β -Kohlenstoffverzweigung eingeführt wird, oder ob auch in der β -Position unverzweigte Substrate akzeptiert werden. Zur Vermeidung der 1,3-Addition wurden stattdessen die beiden SNAC-Thioester **58** und **69** als jeweiliges ähnliches Substrat der Ausgangssubstrate verwendet, die aber keine 1,3-Addition eingehen können (Abb. 71).

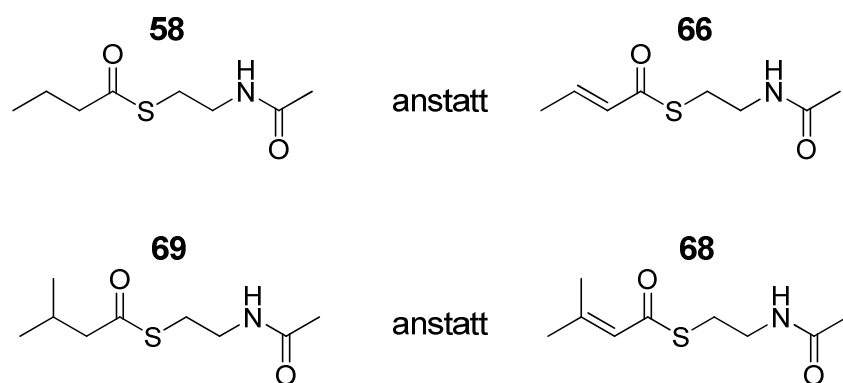


Abb. 71: Austausch der verwendeten Substrate zur Vermeidung der 1,3-Addition

Trotz einstündiger Inkubationszeit konnte jedoch keine Acylierung festgestellt werden. Bei dem SNAC-Thioester **68** handelt es sich um eine verkürzte Version des natürlichen Intermediats. Eine Nichttoleranz dieses Substrats deutet stark darauf hin, dass die KS6 nicht funktionsfähig ist. Denkbar wäre hier, wie auch bei der KS4, eine falsche Proteinfaltung, die durch zu kurze bzw. zu lange Linkerregionen hervorgerufen wurde.

8.2.15 Neuklonierung der KS4 und KS6 in einen *E. coli* Expressionsstamm

Wie in Kapitel 8.2.12 und 8.2.14 erläutert, war es sowohl mit der KS4 als auch mit der KS6 nicht möglich, die verwendeten SNAC-Thioester umzusetzen. Aufgrund möglicher falscher Proteinfaltung wurde für beide KS ein Alignment mit KS aus anderen *trans*-AT-PKS-Systemen durchgeführt, bei denen auch jeweils die stromabwärts and stromaufwärts angrenzenden Domänen einbezogen wurden. Die auf diese Weise ermittelte volle Länge der Linkerregionen wurde benutzt, um Primer zu erstellen, die im Vergleich zu den vorherigen Längen der Linkerregionen kürzer oder länger waren. Hierzu wurden jeweils für beide KS zwei Forwärtssprimer und zwei Rückwärtssprimer konstruiert (Tab. 6). Die unterschiedlich ansetzenden Primer wurden zur Unterscheidung mit A und B bezeichnet. Für die nachfolgende PCR (9.3.1) wurden alle Kombinationen getestet, um die Wahrscheinlichkeit einer Kombination mit der vorgesehenen Proteinfaltung zu steigern. Dementsprechend sollten jeweils vier Varianten der KS generiert werden. Die zu generierenden Amplikons wurden den benutzten Primern entsprechend neben der KS-Nummer mit zwei Großbuchstaben benannt, wobei der erste für den Forwärtss- und der zweite für den Rückwärtssprimer steht. Erwartet wurden für die amplifizierten KS-Sequenzen folgende Größen: KS4 AA mit 1923 bp, KS4 AB mit 1914 bp, KS4 BA mit 1905 bp, KS4 BB mit 1887 bp, KS6 AA 1869 bp, KS6 AB mit 1857 bp, KS6 BA mit 1830 bp und KS6 BB mit 1818 bp.

Nur fünf der erwarteten acht Kombinationen konnten erfolgreich amplifiziert werden, wie mittels Geldokumentation beobachtet werden konnte (Abb. 72).

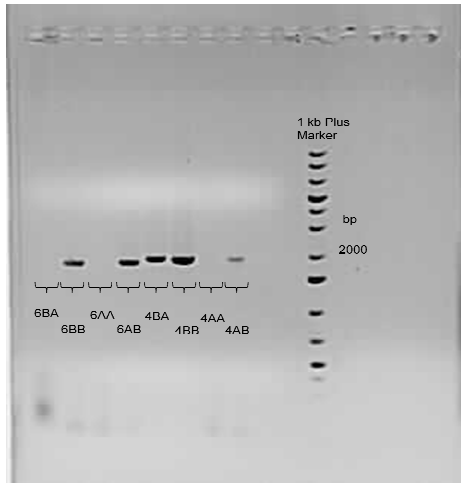


Abb. 72: Amplifikation der KS4- und KS6-Sequenzen mit veränderten Linkerregionlängen

Durch Wiederholung der PCR mit einem Temperaturgradienten, konnte noch eine weitere KS-Sequenz (KS4 AA) mit differenten Linkerregionen amplifiziert werden (Abb. 73).

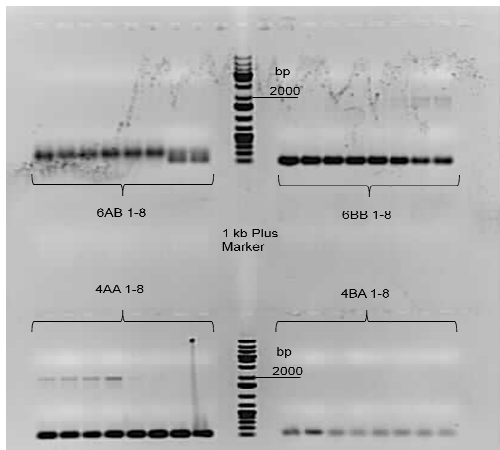


Abb. 73: Amplifikation der KS4 AA-Sequenz

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *NcoI* verdaut (9.12), um sie für die Ligation mit dem ebenso verdauten pHis8-Vektor vorzubereiten. Nach einer Gelaufreinigung und anschließender Gelextraktion wurden die PCR-Produkte mit dem pHis8-Vektor ligiert (9.7). Die so gewonnenen Vektoren mit den verschiedenen Inserts

wurden elektrisch in den *E. coli* BL21 DE3 Expressionsstamm transformiert (9.9.2). Die Selektion positiver Klone wurde durch das Ausplattieren auf mit Kanamycin versetzten Agarplatten erreicht. Mehrere Klone wurden gepickt, kultiviert und ihre Plasmid-DNA mittels Minipräparation isoliert (9.11). Die Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *ApaI* und *XmaI* verdaut (9.12). Es konnten jedoch keine positiven Klone gefunden werden. Trotz zahlreicher Wiederholungen blieb das Ergebnis negativ. Die Ligation wurde mehrmals wiederholt um sicher zustellen, dass dies nicht der kritische Faktor ist. Statt des *E. coli* Stamms BL21 DE3 wurde auch *E. coli* XL als Expressionsstamm eingesetzt, aber auch hier konnte kein positives Resultat erzielt werden. Aufgrund Zeitmangels konnte die Ursache nicht weiter analysiert und behoben werden. Dies sollte jedoch weiterverfolgt werden, da sich mittels der veränderten Linkerregionen der KS möglicherweise funktionsfähige Proteine generieren lassen, die weitere Erkenntnisse bezüglich der Substratspezifität einbrächten.

8.2.16 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Teilprojekt der Dissertation wurde die Substratspezifität der ersten fünf aktiven Ketosynthasen der Bacillaen-PKS untersucht. Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt.

Beim ersten Ansatz wurde die Deletionsmutante AK2 mittels homologer Rekombination mit dem Vektor pAK2 kloniert. Der Vektor pAK2 war so konstruiert, dass als Folge die Initiationsdomänen AL und ACP des Bacillaenbiosyntheseclusters deletiert worden sind. Die Bacillaenbiosynthese konnte infolgedessen nicht initiiert werden, wodurch dessen Produktion ausblieb. Dies konnte mit HPLC- und massenspektrometrischen Methoden nachgewiesen werden. Als Referenz wurde der Stamm *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 unter gleichen Bedingungen kultiviert und das Bacillaen mit den zuvor genannten Methoden nachgewiesen. Im nächsten Schritt wurde versucht mittels Mutasynthese das Bacillaen (**17**) bzw. dessen Derivate von der Mutante AK2 generieren zu lassen. Dem Kultivierungsmedium der Mutante wurden SNAC-Thioester als Intermediatanaloga zugesetzt. Zunächst wurde der SNAC-Thioester des natürlichen Intermediatanalogas der KS2 hinzugefüttert. Dieser sollte theoretisch akzeptiert und dementsprechend Bacillaen (**17**) wieder produziert werden. Trotz mehrfacher Wiederholungen konnte jedoch keine Bacillaenproduktion beobachtet werden. Auch die Variation der Kultivierungsbedingungen führten nicht zum erwarteten Erfolg. Eine mögliche Fehlerursache in Form eines nicht funktionsfähigen *Bacillus subtilis*-Promotors wurde mittels RT-PCR ausgeschlossen, bei der die Transkription des *bae*-Genclusters nachgewiesen werden konnte. Ein Hinweis auf die Problemursache ergab die Untersuchung

des Zellmaterials nach der Fütterung. Die Detektion des SNAC-Thioesters in den aufgeschlossenen Zellen blieb ohne Erfolg, was die Vermutung nahe legt, dass der SNAC-Thioester von den Zellen nicht absorbiert worden ist und infolgedessen keine Bacillaenproduktion erfolgen konnte. In anderen Fütterungsexperimenten konnte der SNAC-Thioester nach der Kultivierung und Zentrifugation jedoch im Überstand nachgewiesen werden, weshalb auch nicht davon auszugehen ist, dass der SNAC-Thioester durch die Zellen oder andere Prozesse zersetzt wird.

Der zweite Ansatz sah vor, die Substratspezifität mittels *in vitro*-Assays zu testen. Die von einem *E. coli* Expressionsstamm exprimierten KS wurden direkt mit den jeweiligen Substraten versetzt. Zwecks dessen wurde eine Vielzahl von SNAC-Thioestern synthetisiert, die entweder den natürlichen Intermediaten der KS glichen oder deren Derivate darstellten. Zwei der fünf untersuchten KS (KS4 und KS6) konnten zwar exprimiert werden, doch KS4 konnte nur in einem degradierten Zustand und in niedriger Konzentration gewonnen werden, während KS6 zwar intakt und in einer ausreichend hohen Konzentration vorlag, jedoch eine Umsatzrate von null zeigte. Infolgedessen war es bei diesen beiden KS soweit nicht möglich Fragen in Hinsicht auf die Substratspezifität zu klären. Da diese beiden KS aber wertvolle Erkenntnisse über die Auswahlkriterien der Ketosynthesen im allgemeinen einbrächten, sollte es weiterverfolgt werden, diese erfolgreich in einem aktiven Zustand zu exprimieren. Die fehlende Aktivität ist möglicherweise auf eine falsche Proteinfaltung zurückzuführen, die ihre Ursache in der Expression von zu kurzen oder langen Linkerregionen hat. Um diese Möglichkeit auszuschließen wurden neue Primer entworfen, die KS-Sequenzen mit variierenden Linkerregionen amplifizieren. Die Transformation konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr erfolgreich durchgeführt werden. Für die KS1, KS2 und KS5 konnten hingegen interessante Resultate gewonnen werden. Studien zur Substratspezifität der KS der Erythromycin-PKS¹⁵ führen zu der Vermutung, dass die α - δ -Positionen des Substrats ausschlaggebend für die Toleranz der PKS sind. Entsprechend wurden diese Positionen bei den verschiedenen Substraten verändert. Für die Bacillaen-KS1 wurde dabei festgestellt, dass die α -Position eine tragende Rolle spielt. Der Austausch des Glycins gegen Alanin und Valin und damit eine Addition einer Methyl- bzw. Butylgruppe in der α -Position zeigte, dass mit zunehmender Substituentengröße die Umsatzrate sinkt bzw. für Valin keine Acylierung mehr beobachtet werden kann. Verantwortlich dafür sind vermutlich sterische Hinderungen, die die Aufnahme des Substrats in die Enzymtasche verhindern. Desweiteren übernimmt der Stickstoff der Amidfunktion eine tragende Rolle. Eine Substitution des Stickstoffs führte zur Nichtakzeptanz des Substrats, während das Fehlen der Carbonylgruppe der Amidfunktion die Umsatzrate nicht negativ beeinflusste. Durch eine Punktmutation in der Aminosäuresequenz der KS1 konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aminosäure vor einem stark konservierten Cystein ebenfalls eine entscheidende Schlüsselfunktion für die

Substratspezifität trägt. Durch Alignments mit anderen Aminosäuren akzeptierenden KS wurde ein überwiegendes Auftreten, eines Asparagins in X-Position vor einem konservierten Cystein in der Enzytasche festgestellt. Ein Austausch dieses Asparagins führte zu stark verminderten Umsatzraten. Denkbar sind hier Interaktionen des Asparagins mit dem Substrat, die sich positiv auf die Substrattoleranz auswirken.

Der Stickstoff der Amidgruppe des Intermediats für die KS1 rückt nach der Kettenverlängerung von der β -Position in die δ -Position. Es wurden SNAC-Thioester generiert, die in der δ -Position variieren. Zwar wurde dabei ein Anheben oder Absenken der Umsatzrate der KS2 bewirkt, aber letztlich wurden alle in dieser Position veränderten Substrate akzeptiert. D.h. der Stickstoff verliert mit dem Aufrücken in distale Positionen seine zentrale Schlüsselrolle, die er bei der KS1 noch hatte. Die β -Position ist jedoch weiterhin ausschlaggebend für die Substratazeptanz. Ein SNAC-Thioester, der in dieser Position eine sperrige und zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindung unfähige Methoxygruppe trägt, wird von der KS nicht akzeptiert.

Auch die KS5 zeigte bezüglich der β -Position eine begrenzte Flexibilität. Die KS5 gehört dem Modul an, das seinerseits die β -Kohlenstoffverzweigung einführt. Ihrerseits ist die KS5 gegen Verzweigung in der β -Position intolerant. Wie bei der KS1 wurde auch hier vor dem konservierten Cystein die Aminosäure näher betrachtet. In diesem Falle liegt ein relativ voluminöses Methionin vor. Verglichen mit der KS6, die die Kondensation von verzweigten Substraten katalysiert, trägt diese ein kleineres Alanin in dieser Position. 3D-Modelle der beiden Proteine zeigen, dass die β -Position des Substrats in beiden Fällen räumlich sehr nah an dieser Aminosäure gelagert ist. Damit wird verständlich, dass die sperrigen verzweigten Substrate von der KS5 nicht akzeptiert werden können, weil die Enzytasche durch das Methionin für diese versperrt ist. Im Gegensatz dazu lässt das kleinere Alanin eine Aufnahme der verzweigten Substrate in das aktive Zentrum zu. Belegt wurde diese Hypothese durch den Austausch des Methionins gegen Alanin. Diese mutierte KS5 zeigte infolgedessen eine Umsatzrate der verzweigten Produkte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Experimente neue Erkenntnisse über den Zusammenhang von der Struktur des Proteins und Substratflexibilität erlangt werden konnten. Wie schon hypothetisch angenommen^{15,38} nimmt vor allem die β -Position des Substrats eine zentrale Schlüsselrolle bei seiner Akzeptanz durch die KS ein. Entsprechend ihres natürlichen Substrats konnte ein Zusammenhang mit der Aminosäure in der Position vor einem konservierten, in der Enzytasche befindlichen Cysteinrest festgestellt werden. Für die Aminosäure einführende KS1 konnte gezeigt werden, dass ein Asparagin an dieser Stelle eine wichtige Rolle einnimmt, wohingegen die Enoylgruppe einführende KS5 ein

Methionin in dieser zentralen Position enthält, um in der β -Position verzweigte Substrate ausschließen zu können.

9. Material und Methoden

9.1 Verwendete Primer

Alle Primer wurden bei der Firma Invitrogen bestellt. Die lyophilisiert gelieferten Primer wurden zunächst in Milli-Q®-Wasser zur einer 500 µM Stammlösung gelöst. Bei der PCR verwendet worden sind weitere 1:10 Verdünnungen mit Milli-Q®-Wasser. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tab. 6 aufgelistet.

Tab. 6: Verwendete Primer in dieser Arbeit. Restriktionsstellen unterstrichen und Stop-Codons fett.

Primername	Sequenz (5' → 3')	Spezifische Informationen
1CDBaeJSbflfor+RBS	<u>CCT GCA GGG</u> TGA AAT GGA GGC AGC GTG ATG GAG CTG CAC AAA AAC CCG	<i>baeJ</i> , Beginn der C-Domäne
1CDBaeJXbalrevshort	<u>TCT AGA</u> GTA TGG GAA GCA TGT TGA GGA AA	<i>baeJ</i> , Beginn der C-Domäne
1CDBaeJXbalrevlong	<u>TCT AGA</u> GTA TGG GAA GCA TGT TGA GGA AAT GGC CGA CCA CTC CGT CAA	<i>baeJ</i> , Beginn der C-Domäne
AK2vorBael_for	CGG AAG CCC TCG TTT GTA TTT GG	Endstück von <i>baeH</i>
AK2vorBael_rev	GTT TGC CAC ATT GCA GCT ACG GT	Spectinomycinresistenzkassette von pAK2
AK2_Insert_Mitte	ACG ACC TTG TTC ATC GTT CGA AAT C	Kontrolle für AK2
AK2_Insert_400_rev	CTA CAC CTC CCG CAT TTA CTT	Kontrolle für AK2
AK2_Insert_870_rev	GTT CAA CTG CGG CGT TCG GCA	Kontrolle für AK2
AK2_Insert_840_for	GAG GAT ATC ATG CCG AAC GCC	Kontrolle für AK2
AK2_Insert_1140_for	CAT TTC CGC CAT GCA GGG CCA	Kontrolle für AK2
AK2_Insert_2040_for	AAA TTC AGG AAC CAA GCT ATG	Kontrolle für AK2
baeB_for_mrna	GCA TCA AAT CAA AAC TTA T	Ansetzend in <i>baeB</i> für mRNA Kontrolle
baeB_rev_mrna	AAT GAA ACA GCC CTT TTT GA	Ansetzend in <i>baeB</i> für mRNA Kontrolle
baeH_for_mrna	CGT CCG TTT TCA GCA AAA TG	Ansetzend in <i>baeH</i> für mRNA Kontrolle
baeH_rev_mrna	CTG TTC TCC GTT TCC CAA GG	Ansetzend in <i>baeH</i> für mRNA Kontrolle

baeJ_for_mrna	GAG CCT GTT AAG AAG AAT CC	Ansetzend in <i>baeJ</i> für mRNA Kontrolle
baeJ_rev_mrna	ACG GTA GAC GGA TTG AAT GG	Ansetzend in <i>baeJ</i> für mRNA Kontrolle
baeR_for_mrna	GGA TCA GGA GAT ATC GGC AT	Ansetzend in <i>baeR</i> für mRNA Kontrolle
baeR_rev_mrna	GCA AGG CCG ATC AAT TCT TT	Ansetzend in <i>baeR</i> für mRNA Kontrolle
baeJ_for_AL_mran	AGT GAT ATG AAG GCA AGC GGG	Beginn <i>baeJ</i> , für Knockoutkontrolle in AKS
baeJ_rev_PCP_mrna	TGC CGT CAG CCG GAT GTG ATA	<i>baeJ</i> , Ende der ACP-Domäne, für Knockoutkontrolle in AK2
BaeKS2_for	AAA <u>GGA TCC</u> GCA AAA GAG CAT CCG GGC CGT TT	<i>baeJ</i> KS2 Domäne
BaeKS2_rev	AAA AAA AAG <u>CGG CCG CTC</u> ACC ATT GTT TCG TCA GAA TAC GTT TCA TCC G	<i>baeJ</i> KS2 Domäne
BaeKS4_for	AAA <u>CCA TGG</u> AAC TGA GCA GTA CGG GAG CCA TTT CAG CGC G	<i>baeL</i> KS4 Domäne
BaeKS4_rev	AAA AAA AAG <u>CGG CCG CTC</u> ATT CAT GCA GGA GCG GAT GCA GCA TGC CT	<i>baeL</i> KS4 Domäne
BaeKS5_for	AAA <u>GGA TCC</u> ATG AAA GCA CAC CGG GAC ACG CTG CTG GAA	<i>baeL</i> KS5 Domäne
BaeKS5_rev	AAA AAA AAG <u>CGG CCG CTC</u> AGG CCG CCG GTG CGA TCG GCG C	<i>baeL</i> KS5 Domäne
BaeKS6_for	AAA <u>CCA TGG</u> ACG TGC GCA GCC GTC CGT CCG	<i>baeL</i> KS6 Domäne
BaeKS6_rev	AAA AAA AAG <u>CGG CCG CTC</u> ACC ATT GCT TTT CTA AAA GCA CAG CCT CGC G	<i>baeL</i> KS6 Domäne
BaeKS1_for	AAA <u>CCA TGG</u> AAC AGA ACA AAA ACC GAA AGA A	<i>baeJ</i> KS1 Domäne
BaeKS1_rev	AAA AAA AGC <u>GGC CGC TCA</u> ATT TTG CTG CAC GAG CGG GTG	<i>baeJ</i> KS1 Domäne
BaeKS4_for_A	ATA <u>CCA TGG</u> ACA TTT CAG CGC GTC TCC GGC AAA A	<i>baeL</i> KS4 Domäne mit divergierenden Linkerregionen
BaeKS4_rev_A	AAT TTA AAG <u>CGG CCG CTC</u> AGC CTG CAT TTT TTT GCG GCA G	<i>baeL</i> KS4 Domäne mit divergierenden Linkerregionen
BaeKS4_for_B	ATA <u>CCA TGG</u> AGA GAA GCA GGT TGA GAC GCA AAC A	<i>baeL</i> KS4 Domäne mit divergierenden Linkerregionen
BaeKS4_rev_B	AAT TAT AAG <u>CGG CCG CTC</u> ACA GCG ATT CTC TTT TCT CCG C	<i>baeL</i> KS4 Domäne mit divergierenden Linkerregionen

BaeKS6_for_A	AAA <u>CCA TGG</u> ACC GAA AGT CAT ACC GCA GGA AAC A	<i>baeL</i> KS6 Domäne mit divergierenden Linkerregionen
BaeKS6_rev_A	AAA AAA <u>AGC GGC CGC TCA</u> TGT TTC CTG CGG TAT GAC TTT CGG	<i>baeL</i> KS6 Domäne mit divergierenden Linkerregionen
BaeKS6_for_B	AAA <u>CCA TGG</u> ACA GGC CAA ACG GGA GCC TAA AGA C	<i>baeL</i> KS4 Domäne mit divergierenden Linkerregionen
BaeKS6_rev_B	AAA AAA <u>AAG CGG CCG CTC</u> ACG GTA TGA CTT TCG GCT CAG G	<i>baeL</i> KS4 Domäne mit divergierenden Linkerregionen

9.2 Verwendete Vektoren und Organismen

9.2.1 Vektoren

Für die Klonierung der *bae*-Gene zur heterologen Genexpression wurde sowohl ein Vektor für die Lagerung und Sequenzierung der PCR-Produkte als auch ein Vektor für die Proteinexpression eingesetzt. Zur homologen Rekombination in *Bacillus amyloliquefaciens* wurde ein zum Teil schon bearbeiteter Vektor von Dr. Cristian Gurgui verwendet (Tab. 7).

Tab. 7: Verwendete Vektoren

Vektor	Resistenz	Verwendung	Herkunft
pBluescript II SK (+)	Ampicillin (100 µg/ml)	Lagerung, Sequenzierung	Fa. Stratagene
pHis8	Kanamycin (50 µg/ml)	Expression	Prof. B. Moore
pBPsy1Prom	Spectinomycin (100 µg/ml)	Homologe Rekombination	Dr. C. Gurgui

Tab. 8: Konstruierte Vektoren

Vektor	Resistenz	Verwendung
pAK1	Spectinomycin (100 µg/ml)	Homologe Stelle zur <i>baeJ</i> C-Domäne
pAK2	Spectinomycin (100 µg/ml)	Knockout von <i>baeJ</i> AL- + ACP-Domäne
pAK3	Kanamycin (100 µg/ml)	Expression BaeL KS4
pAK4	Kanamycin (100 µg/ml)	Expression BaeL KS5
pAK5	Kanamycin (100 µg/ml)	Expression BaeL KS6

pAK6	Kanamycin (100 µg/ml)	Expression BaeJ KS2
pAK7	Kanamycin (100 µg/ml)	Expression BaeJ KS1

9.2.2 Organismen

Tab. 9: Verwendete und konstruierte Organismen

Stamm	Genotyp	Herkunft
<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^f</i> ZΔM15 Tn10 (Tet ^R)]	Fa. Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 DE3	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (r _B -m _B -), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , DE3	Fa. Invitrogen
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	Wildtyp	FZB Berlin
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> AK2	AK2, Knockout <i>baeJ</i> AL-und ACP-Domäne; Sp ^r	A. Kampa

9.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

9.3.1 Standard-PCR

Die PCR wurde zur Amplifikation von DNA-Sequenzen genutzt, die zur Klonierung weiterverwendet wurden, aber auch als Kontrollsystem für das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von bestimmten Gensequenzen. Dabei wurde während der gesamten Arbeit hindurch hauptsächlich mit zwei verschiedenen Polymerasen gearbeitet. Zu einem wurde die Taq-Polymerase und zum anderen die Phusion-Polymerase verwendet. Ein 50 µl Ansatz hatte die folgende Zusammensetzung (Tab. 10).

Tab. 10: Standard-PCR-Ansatz

PCR-Zusatz	Volumen (µl)
Milli-Q®-Wasser (dest.)	39.7
Puffer 10x	5
dNTP-Mix (10 mM pro dNTP)	2
Templat (z.B. genomische DNA)	1
DNA-Polymerase	0.3
Rückwärtsprimer	1
Forwärtsprimer	1

Die in einem Thermocycler durchgeführte PCR wurde unter verschiedenen Konditionen je nach verwendeten Primern, verwendeter Polymerase und der Größe der zu amplifizierenden Sequenz ausgeführt. Das Standard-Temperaturprogramm ist in Tab. 11 zu sehen. Wobei die Annealingtemperatur von den verwendeten Primern abhängig war und die Elongationszeit von der Sequenzlänge. Für die Taq-Polymerase wurde dabei mit 1 min Elongationszeit pro 1000 bp gerechnet und für die Phusion-Polymerase mit 45 sec pro 1000 bp.

Tab. 11: Temperaturprogramm für die PCR

	Taq-Polymerase		Phusion-Polymerase	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Deckel	106 °C	∞	106 °C	∞
Initiale Denaturierung	96 °C	2 min	98 °C	2 min
Denaturierung*	96 °C	1 min	98 °C	1 min
Annealing*	X °C	1 min	X °C	1 min
Elongation*	72 °C	X min	72 °C	X min
Abschließende Elongation	72 °C	10 min	72 °C	10 min
Kühlung	10 °C	∞	10 °C	∞

* Diese Schritte wurden in 34 Zyklen durchlaufen.

9.3.2 Kolonie-PCR

In manchen Fällen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wurde anstatt der genomischen DNA Zellmaterial einer Kolonie als Templat für die PCR eingesetzt. Die Konditionen blieben dabei wie die in Tab. 11 dargelegten. Lediglich die initiale Denaturierungszeit wurde auf 10 min angehoben.

9.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Der Nachweis von mRNA durch eine RT-PCR wurde durchgeführt um die Transkription des *bae* Genclusters durch die Deletionsmutante AK2 zu belegen. Für die reverse Transkription und die Amplifikation der cDNA wurde das SuperScript III One-Step RT-PCR System mit Platinum Taq DNA-Polymerase verwendet. Dabei wird in einem Schritt die mRNA in cDNA umgeschrieben und die cDNA amplifiziert. In Tab. 12 ist der dafür genutzte Reaktionsansatz zu sehen.

Tab. 12: RT-PCR-Ansatz

RT-PCR-Zusatz	Volumen (μ l)
RNase freies Wasser	3.5
2 x Reaktionsmix	5
Super Script III Transkriptase	0.3
mRNA bzw. zur Kontrolle DNA Templat	0.5
Rückwärtsprimer	0.5
Forwärtsprimer	0.5

Das für den Thermocycler verwendete Temperaturprogramm ergibt sich aus Tab. 13.

Tab. 13: Temperaturprogramm für die RT-PCR

	Temperatur	Zeit
Deckel	106 °C	∞
Reverse Transkription	50 °C	30 min
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min
Denaturierung*	94 °C	30 sec
Annealing*	60 °C	45 sec
Elongation*	68 °C	1 min
Abschließende Elongation	68 °C	5 min
Kühlung	10 °C	∞

* Diese Schritte wurden in 40 Zyklen durchlaufen.

9.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde für die Analytik von DNA-Fragmenten und gegebenenfalls für ihre Isolierung aus dem Gel verwendet. Das Agarosegel wurde gewonnen, indem 1% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer (0.12% (v/v) Eisessig, 0.48% (w/v) Tris, 1 mM EDTA, pH 8) in der Mikrowelle erhitzt und nach Abkühlen auf etwa 60 °C mit 0.1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurde. In dieser Phase wurde das noch flüssige Gel in eine Gelkammer gegossen, in der es aushärten konnte. Die Gelkammer wurde samt des auspolymerisierten Gels in eine Elektrophoresekammer übertragen und diese mit 1 x TAE-Puffer gefüllt. Die Geldaschen wurden nun mit den Proben, die vorher mit 6 x Ladepuffer (0.25% (w/v) Bromphenol, 0.25% (w/v) Xylencyanol, 30% (w/w) Glycerin) versetzt worden sind, beladen. Zusätzlich wurden 5 µl Marker als Größenreferenz aufgetragen (Abb. 74). Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer Spannung von 100 - 130 V. Die Analyse der DNA-Banden wurde mittels UV-Licht in der Geldokumentation vorgenommen.

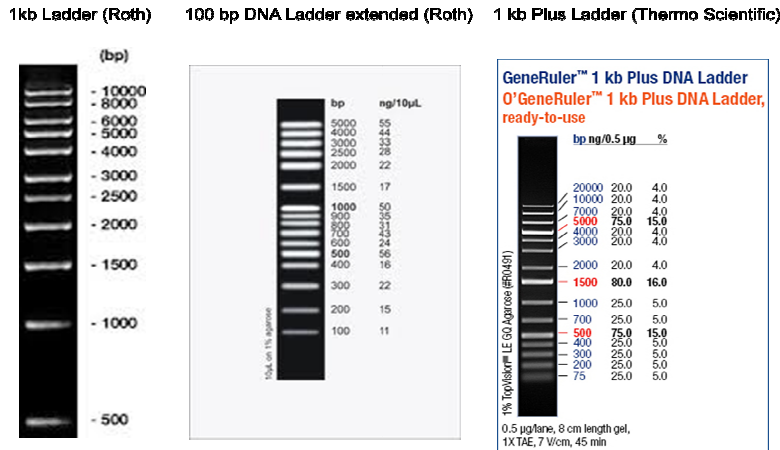


Abb. 74: Verwendete DNA-Marker

9.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die zu weiteren Klonierungszwecken verwendet werden sollten, wurden im größeren Volumen aufgetragen. Bis zu 100 µl wurden in eine Geltasche gefüllt. Eine angrenzende Tasche wurde dabei nur mit 5 µl der zu präparierenden Probe befüllt um die Banden detektieren zu können, ohne sie dem DNA schädlichen UV-Licht aussetzen zu müssen. Dementsprechend wurde das Gel vor der UV-Lichtanalyse mit einem Skalpell so geschnitten, dass die Gelstücke mit den markierenden 5 µl Proben von dem Rest getrennt wurden. Bei der UV-Lichtanalyse wurde die gewünschte Bande markiert und die Gelstücke wieder zusammengesetzt. Somit konnte die Höhe der zu präparierenden Banden ermittelt werden. Diese wurden dann ausgeschnitten und in 2 ml-Reaktionsgefäße übertragen. Die DNA wurde anschließend mittels eines Gelextraktionskits der Firma Analytik-Jena entsprechend den Herstellerangaben aus dem Gel isoliert und aufgereinigt.

9.6 TA-Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Sequenzierung der erhaltenen PCR-Fragmente und zu einer dauerhaften Verfügbarkeit derselben ist die Klonierung in einen Vektor vorgenommen worden. Dafür wurde der TA-Klonierungsvektor pBluescript SK (+) verwendet. Dieser wurde in den folgenden Schritten für die Klonierung vorbereitet. Zunächst wurde eine den Vektor enthaltende *E. coli* XL1 Blue Schüttelkultur über Nacht (9.13.1) inkubiert. 10 µl der mittels Minipräparation (9.11) isolierten Vektor-DNA wurden mit 2.5 µl des Restriktionsenzymzms *EcoRV* unter Zugabe von 5 µl NEB-

Puffer 3, 0.5 µl 10 x BSA und 32 µl MilliQ-H₂O bei 37 °C linearisiert. Auf die zweistündige Inkubationszeit folgte eine 20 minütige Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym bei 80 °C. Für die Ligation mit dem PCR-Produkt, das durch die Amplifikation mit der Taq-Polymerase 3'-dATP-Überhänge aufwies, wurden den Enden des linearisierten Vektors entsprechend 3'-dTTP angehängt. Dies erfolgte, indem der linearisierte Vektor mit 0.5 µl Taq-Polymerase und 10 µl 10 mM dTTPs (2 mM) für zwei Stunden bei 70 °C inkubiert wurde. Um die Vektor-DNA rein zu erhalten wurden 100 µl Chloroform hinzugefügt und nach kräftigem Schütteln 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die in dem Überstand befindliche Vektor-DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und mit 70 µl Isopropanol versehen. Nach erneutem kräftigen Schütteln wurde die Mischung 20 min bei 4 °C und 13000 rpm abzentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde entnommen und das ausgefallene Pellet mit 200 µl eiskalten, 70%igen (v/v) Ethanol gewaschen und nach kurzem Abzentrifugieren wurde erneut der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in einer SpeedVac bei 30 °C getrocknet und in 10 µl MilliQ-Wasser gelöst. Der so hergestellte TA-Vektor konnte bei -20 °C gelagert werden.

9.7 Ligation von PCR-Produkten mit einem TA-Vektor

Für die Ligation von PCR-Produkten mit einem TA-Vektor wurde folgender Ansatz gewählt (Tab. 14).

Tab. 14: Ansatz für die Ligation eines TA-Vektors und PCR-Produktes

Volumen (µl)	Ligationszusatz
7	Vektorinsert
1	T4 DNA-Ligase-Puffer (10 x)
1	TA-Vektor
1	T4 Ligase

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Ligation wurde die Ligase bei 65 °C inaktiviert. Das Ligationsprodukt wurde anschließend mittels einer Elektroporation in *E. coli* Zellen transformiert (9.9).

9.8 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen von DNA-Inserts wurden von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden Vektor spezifische Primer oder selbst erstellte Primer verwendet. Die verwendeten Vektor spezifischen Primer sind in Tab. 15 aufgelistet.

Tab. 15: Verwendete Sequenzierprimer

Vektor	Bezeichnung des Primers	Primersequenz (5'→3')
pBluescript SK(+)	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
pHis8	T7	TAATACGACTCACTATAGGG

9.9 Transformation

9.9.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Im ersten Schritt wurde eine 5 ml Schüttelkultur von *E. coli* XL1 Blue bzw. *E. coli* BL21 DE3 über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die 4 ml der angewachsenen Kultur wurde am darauffolgenden Tag zusammen mit 400 ml LB-Medium in einen 1 l Schikane-Erlenmeyer-Kolben übertragen. Die Bakterienkultur wurde bei 37 °C geschüttelt bis ein OD₆₀₀-Wert zwischen 0.4 und 0.8 erreicht worden ist. Alle nachfolgenden Schritte wurden stets auf Eis ausgeführt und die Kultur wurde ebenfalls während der ganzen Zeit auf Eis gehalten. Die 400 ml Kultur wurde auf sterile 50 ml Röhrchen aufgeteilt und 5 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mehrmals in autoklavierten 10%igem Glycerin (v/v) resuspendiert, miteinander kombiniert und nach jeder Waschung wieder unter den bereits genannten Parametern abzentrifugiert. Dabei wurden zunächst 40 ml, dann zwei mal 25 ml und letztlich 30 ml kaltes Glycerin genommen. Das so gereinigte und während der Waschung kombinierte gesamte Zellpellet wurde dann in 500 µl 10%igem Glycerin gelöst und in 50 µl Aliquots auf 1.5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Nach dem Schockgefrieren der Zellen in flüssigen Stickstoff wurden die elektrokompenten Zellen bei -80 °C gelagert.

9.9.2 Transformation in elektrokompetente *E. coli* Zellen

Durch die Elektroporation von *E. coli* Zellen, bei der für eine sehr kurze Dauer ein starkes elektrisches Feld erzeugt wird, wird die Permeabilität der Zellmembran für DNA-Fragmente erhöht. Für die Elektroporation wurden die elektrokompetenten Zellen (9.9.1) auf Eis aufgetaut. Zu einem 50 µl Aliquot *E. coli* Zellen wurden 2 µl Ligationsansatz (9.7) beigefügt und in eine eisgekühlte, sterile 2 mm Elektroporations-Küvette transferiert. Die im Elektroporator platzierte Küvette unterlag einem kurzen Spannungsimpuls von 2.5 kV. Nach sofortiger Zugabe von einem ml kalten LB-Medium, wurde die Zellsuspension in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert, der Überstand bis auf einen Rest von 300 µl abgenommen und das Zellpellet in den verbliebenen Medium resuspendiert. Die gesamte Resuspension wurde auf einer LB-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

9.9.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden zwei Puffer benötigt, die folgende Zusammensetzung hatten (Tab. 16 und Tab. 17).

Tab. 16: Zusammensetzung von TFB I

Konzentration	Zusatz
30 mM	Kaliumacetat
10 mM	Calciumchlorid
100 mM	Kaliumchlorid
50 mM	Manganchlorid
15% (v/v)	Glycerin

Tab. 17: Zusammensetzung von TFBII

Konzentration	Zusatz
10 mM	Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)
75 mM	Calciumchlorid
10 mM	Kaliumchlorid
15% (v/v)	Glycerin

Zunächst wurde eine Schüttelkultur von *E. coli* XL1 Blue in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 2.5 ml dieser Klutur wurden in 100 ml LB transferiert und bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0.4 bis 0.5 bei 37 °C und 200 rpm im Inkubator geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur auf zwei 50 ml Röhrchen verteilt und 6 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden und das Zellpellet wurde auf Eis in 12.5 ml TBF I resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation von 5 min bei 5000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen und die beiden Pellets in jeweils 2 ml TBF II resuspendiert, vereint und schließlich in 100 µl-Aliquots auf 1.5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Diese wurden im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

9.9.4 Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Zellen

Für die chemische Transformation in *E. coli* Zellen wurden die dafür präparierten Zellen (9.9.3) auf Eis aufgetaut, 10 µl des inaktivierten Ligationsprodukts hinzugefügt und weitere 30 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen bei 42 °C 1 min inkubiert bevor sie wieder 2 min auf Eis gestellt wurden. Es erfolgte eine Zugabe von 900 µl LB-Medium und eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Die Zellen wurden nachfolgend 30 sec bei 6000 rpm abzentrifugiert, der Überstand bis auf einen Rest von 300 µl abgenommen und auf einer mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten LB-Agar-Platte ausgestrichen. Eine Inkubation bei 37 °C fand über Nacht statt.

9.9.5 Transformation in *Bacillus amyloliquefaciens*

Für die Transformation von DNA-Fragmenten in *Bacillus amyloliquefaciens* wurde eine chemische Transformation gewählt. Dazu wurden mehrere Puffer benötigt, die im folgenden aufgelistet sind.

Tab. 18: Zusammensetzung des GCHE-Puffers

Volumen	Zusatz
1 ml	10 x PC-Puffer
0.89 ml	20%ige (w/v) Glucose-Lösung
0.1 ml	L-Tryptophan-Lösung (5 mg/ml)
0.027 ml	FeCl ₃ /Na-Zitrat-Lösung (4 mg/ml)
0.5 ml	K-Glutamat-Lösung (50 mg/ml)
0.03 ml	1 M MgSO ₄ -Lösung
0.2 ml	5%ige (w/v) Casein-Hydrolysat-Lösung
ad 10 ml Wasser	

Tab. 19: Zusammensetzung des GC-Puffers

Volumen	Zusatz
1 ml	10 x PC-Puffer
0.89 ml	20%ige (w/v) Glucose-Lösung
0.1 ml	L-Tryptophan-Lösung (5 mg/ml)
0.027 ml	FeCl ₃ /Na-Zitrat-Lösung (4 mg/ml)
0.03 ml	1 M MgSO ₄ -Lösung
ad 10 ml Wasser	

Tab. 20: Zusammensetzung des Transformations-Puffers

Volumen	Zusatz
1 ml	10 x SMM-Puffer
0.25 ml	20%ige (w/v) Glucose-Lösung
0.05 ml	0.2 M EGTA-Lösung
0.1 ml	2 M MgCl ₂ -Lösung
	ad 10 ml Wasser

Tab. 21: Zusammensetzung des 10 x PC-Puffers (pH 7)

Menge	Zusatz
140.16 g	K ₂ HPO ₄
60 g	KH ₂ PO ₄
8.45 g	Na-Zitrat
	ad 1 l Wasser

Tab. 22: Zusammensetzung des SMM-Puffers (pH 7)

Menge	Zusatz
20 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
140.16 g	K ₂ HPO ₄
60 g	KH ₂ PO ₄
10 g	Na-Zitrat
	ad 1 l Wasser

Zunächst wurde eine Gefrierkultur von *Bacillus amyloliquefaciens* auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Von den auf der Platte gewachsenen Kolonien wurde am drauffolgenden Tag eine Kolonie in 10 ml LB-Medium übertragen und bei 27 °C und 170 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Übernachtskultur mit 10ml des GCHE-Puffers (Tab. 18) in einen 100 ml Kolben transferiert und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert bis ein OD₆₀₀-Wert von 1.2 bis 1.4 erreicht worden ist. Anschließend

wurden 5 ml der Kultur entnommen und mit dem gleichen Volumen an GC-Puffer versetzt. Diese Verdünnung wurde bei 37 °C und 200 rpm für eine Stunde inkubiert. 1 ml der Kultur wurde in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß übertragen und bei 6000 rpm 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen Rest von 100 µl abgenommen, worin das Zellpellet resuspendiert worden ist. Es folgte die Zugabe der linearisierten Plasmid DNA (50 µl) und ein leichtes Schütteln des Gemisches. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen übertragen und mit einem ml Transformations-Puffer versehen. Die anschließende halbstündige Inkubation fand bei 37 °C und 200 rpm statt. Nach dieser Zeitspanne wurden 0.5 ml LB mit 100 fach verdünntem Antibiotikum (in diesem Falle Spectinomycin) hinzugegeben und für 90 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Zellsuspension auf zwei 1.5 ml Gefäße aufgeteilt bei 6000 rpm eine Minute lang zentrifugiert, der Überstand bis auf 200 µl abgenommen, das Zellpellet resuspendiert, die beiden Zellsuspensionen wieder vereint und auf einer mit 100 µg/ml Spectinomycin versetzten LB-Agar-Platte ausgestrichen. Es erfolgte eine eintägige Inkubation bei 37 °C.

9.10 Blau-Weiß-Selektion

Der zur Lagerung von PCR-Fragmenten verwendete TA-Vektor (pBluescript SK (+)) hat eine spezifische Eigenschaft, die es ermöglicht positive Klone von negativen zu unterscheiden. Dafür trägt er das Reportergen *lacZ*, das IPTG-induzierbar ist. Es kodiert für die β -Galactosidase, die X-Gal zu Galactose und einem blauen, wasserunlöslichen Indigo-Farbstoff hydrolysiert. Bei einer Ligation in dieses Gen kann es folglich nicht mehr transkribiert werden und bleibt inaktiv. Phänotypisch äußert sich das in blauen und weißen Kolonien. Dabei besitzen die weißen Kolonien das gewünschte Insert, da hier durch die Deaktivierung des Gens die Fähigkeit zur Hydrolyse von X-Gal und somit zur Blaufärbung abhanden gekommen ist. Damit es zu dieser Färbung kommt, müssen die LB-Agar-Platten einer besonderen Behandlung unterzogen werden. Die Oberfläche der für die Blau-Weiß-Selektion benutzten LB-Agarplatten, wurde vor der Kontamination mit den Transformationskulturen mit 40 µl einer 20 mg/ml X-Gal-Lösung in DMF und mit 100 µl einer 20 mg/ml IPTG-Lösung imprägniert.

9.11 Minipräparation von Plasmiden

Für die Minipräparation von Plasmiden wurden im Vorfeld drei Puffer angesetzt die folgende Zusammensetzung hatten (Tab. 23).

Tab. 23: Zusammensetzung der drei verwendeten Puffer-Lösungen

Puffer	Zusatz
P1	50 mM Tris-HCl pH 8 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
P2	200 mM NaOH 1% SDS
P3	3 M KOAc pH 5.5

Von einer Schüttelkultur über Nacht wurden 1.5 ml entnommen und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Nach einer 30 sekündigen Zentrifugation bei 10000 rpm wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Es folgte eine Zugabe von 200 µl kaltem P1-Puffer und eine Resuspension des Zellpellets in diesem durch vortexen. Auf die Suspension wurden nacheinander 200 µl P2-Puffer mit einer Inkubationszeit von 2 min nach vorsichtigem Schütteln und 200 µl P3-Puffer mit ebenfalls anschließendem vorsichtigem Schütteln gegeben. Ein weißes Präzipitat konnte daraufhin beobachtet werden. Die Probe wurde bei 13000 rpm 3 min abzentrifugiert und der Überstand zusammen mit 500 µl Chloroform in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Nach kräftigem Schütteln wurde die Probe bei 13000 rpm 5min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnten zwei Phasen mit einer dünnen weißen Membran dazwischen beobachtet werden. Die obere Phase wurde vorsichtig entnommen, zusammen mit 350 µl Isopropanol in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß übertragen und kräftig geschüttelt. Es erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und zurück blieb ein kleines DNA-Pellet, das mit 500 µl eiskaltem 70%igen Ethanol versetzt und nochmals bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert wurde. Der Überstand konnte verworfen werden und das gereinigte Pellet wurde

bei 30 °C in der Speedvac getrocknet und anschließend in 50 µl MilliQ-Wasser gelöst. Die so präparierte Plasmid DNA konnte bei -20 °C gelagert werden.

9.12 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau diente sowohl analytischen als auch präparativen Zwecken. Verwendet wurden hierfür die Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB). Die optimalen Konditionen und notwendigen Puffer für die jeweiligen Restriktionsenzyme konnten online auf der Seite von NEB ermittelt werden. Ebenso bot diese Seite die Möglichkeit bei multipler Restriktion mit mehreren Enzymen, die beste Prämisse zu ermitteln. Für die analytische Restriktion wurde folgender Ansatz gewählt (Tab. 24).

Tab. 24: Ansatz für eine analytische Restriktion

Volumen	Zusatz
1 µl	10 x Puffer (je nach Herstellerangaben)
1 µl	10 x BSA (nur bei manchen Enzymen notwendig)
0.3 µl	Enzym (für jedes weitere Enzym die gleiche Menge)
3 µl	Plasmid DNA der Plasmidpräparation
	ad 10 µl MilliQ-Wasser

Die dreistündige Inkubation erfolgte stets bei 37 °C. Für die präparative Restriktion wurde ein 100 µl Ansatz gewählt, wobei 50 µl Plasmid DNA und alle Ingredienzien im 10 fachen Volumen verwendet wurden.

9.13 Bakterienkultivierung

9.13.1 Kultivierung von *E. coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den *E. coli* Stämmen XL1 Blue und BL21 DE3 gearbeitet. Die Kultivierung beider Stämme verlief identisch. Kolonien wurden auf LB-Agar-Platten (9.19.1) mit entsprechendem Antibiotikum bei vorliegenden Resistenzen bei 37 °C über Nacht kultiviert. Flüssigkulturen wurden durch das Animpfen von 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie und das nachfolgende Schütteln bei 200 rpm und 37 °C über Nacht gewonnen. Für größere Kulturmengen wurde mit einer so erhaltenen Flüssigkultur frisches LB-Medium 1 : 100 angeimpft und die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt. Bis zum Erreichen der benötigten Zelldichte wurden diese ebenfalls bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

9.13.2 Kultivierung von *Bacillus*

Bacillus-Stämme wurden zum Erhalt von Einzelkolonien auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Flüssigkulturen wurden durch Animpfen von 10 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie, Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums und durch Schütteln bei 30 °C und 200 rpm über Nacht gewonnen. Großkulturen wurden angelegt um eine Bacillaen- oder Derivatproduktion beobachten zu können. Dabei wurden 10 ml Übernachtkultur mit 400 ml Landy-Medium in ein 1 l Erlenmeyerkolben transferiert und der Kolben mit Alufolie umwickelt um das licht-sensitive Bacillaen zu schützen. Die Fermentation bei 30 °C und 200 rpm wurde beim Erreichen einer optischen Dichte von 3 - 4 beendet.

Fermentationen zu Testzwecken wurden in kleinerem Maßstab getätigt. Dabei wurden nur 50 ml Landy-Medium mit 5 ml Übernachtkultur angeimpft. Bei der Deletionsmutante AK2 wurden zunächst nur 25 ml Landy-Medium verwendet und die übrigen 25 ml zusammen mit 100 µg/ml Spectinomycin und 0.8 ml 250 mM SNAC-Thioester über einen Zeitraum von 24h mit einer Durchflussrate von 1 ml/h mittels eines Perfusorsystems kontinuierlich zugefügt. Die Endkonzentration des SNAC-Thioesters betrug somit 4 mM. Während der 24 stündigen Inkubationszeit, wurde die Probe bei 30 °C und 200 rpm geschüttelt.

Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Zellen für 30 min bei 3600 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Anschließend konnte er für einige Tage bei -20 °C aufbewahrt oder direkt weiter verwendet werden.

9.13.3 Kultivierung von *Nostoc*

Schüttelkulturen von der Cyanobakteriengattung *Nostoc* wurden in 300 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml BG-11 bei 25 °C und 180 rpm und einer durchgängigen Beleuchtung (5200 lumen) kultiviert. Die 25 l umfassende Großkultur wurde unter ständiger Beleuchtung (5200 lumen) in einem Blasensäulenreaktor in BG-11 mit einem Zusatz von 3 mM ¹³C-gelabelten NaHCO₃ bei 25 °C und einem pH von 7.8 gehalten. Alle 5 Wochen wurden 10 l Kultur entnommen und durch 10 l gelabeltes BG-11 ersetzt.

9.13.4 Kryokulturen

Um die Stämme für eine längere Zeit zu konservieren und als Basis für neue Kulturen zu verwenden, wurden Kryokulturen angelegt. Für die *E. coli* und *Bacillus* Stämme wurden dafür jeweils 750 µl einer Übernachtskultur und 750 µl 30%iges Glycerin (w/w) in einem autoklavierten 2 ml Kryokulturröhrchen vereint und gemischt. Für die *Nostoc*-Kulturen wurde statt des Glycerins 2%iges Casiton verwendet. Alle Kulturen wurden bei -80 °C gelagert.

9.14 Isolierung genomischer DNA von *Bacillus amyloliquefaciens*

Zur Isolierung genomischer DNA wurde der folgende Puffer benötigt (Tab. 25).

Tab. 25: Zusammensetzung des STE-Puffers

Menge	Zusatz
0.5 ml	0.5 M EDTA pH 8
2.5 ml	1 M Tris-HCl pH 8
1.46 g	NaCl

Im ersten Schritt wurde eine 10 ml Übernachtskultur von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. 1.5 ml der Übernachtskultur wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß übertragen und bei 6000 rpm 30 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl STE-Puffer mit 5 mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach

dreistündiger Inkubation bei 37 °C wurden 250 µl 2%ige SDS-Lösung addiert und die Lösung für weitere 30 min bei selber Temperatur inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 250 µl Phenol-Chloroform-Lösung und die gesamte Mixtur wurde für 30 sec gevortext. Die resultierende weißliche Lösung wurde 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 600 µl entnommen und mit dem selben Volumen Isopropanol und 60 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.3) in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß übertragen und kräftig geschüttelt. Die Mischung wurde bei 10000 rpm und 4 °C 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl eiskalten 70%igen Ethanol gewaschen. Nach einer Trocknung bei 30 °C in der Speedvac und anschließender Lösung in 50 µl MilliQ-Wasser wurde die genomische DNA bei -20 °C gelagert.

9.15 Isolierung von mRNA

Zur Isolierung von mRNA wurde von dem *Bacillus* Wildtypstamm als auch von der Deletionsmutante AK2 eine 25 ml Schüttelkultur angelegt, die bei 30 °C über Nacht in LB-Medium inkubiert worden ist. Dabei wurde dem Medium von AK2 25 µl Spectinomycin beigefügt. Von den Übernachtskulturen wurden jeweils 0.5 ml für die RNA Isolierung verwendet. Die Isolierung erfolgte mit dem RNA-Isolations-Kit der Firma Qiagen nach den Herstellerangaben. Zur Vermeidung von Kontamination mit RNasen wurde äußerst steril und mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) gearbeitet. Bei der anschließenden Agarosegel-Auftrennung wurde ein 1.75%iges Agarosegel verwendet.

9.16 Extraktions- und Analysemethoden

9.16.1 Extraktion von Bacillaen

Der Wildstamm *Bacillus amyloliquefaciens* und die Deletionsmutante AK2 wurden hinlänglich ihrer Bacillaen- bzw. Bacillaenderivatproduktion untersucht. Die Extraktionsmethoden waren in allen Fällen identisch. Nach der Fermentation wurde die Probe bei 3600 rpm 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Braunglaskolben transferiert und mit flüssigen Stickstoff eingefroren. Dem gefrorenen Überstand wurde mittels Gefriertrocknung das Wasser entzogen. Der getrocknete Rückstand wurde unter 30 minütigen Rühren in 300 ml Ethylacetat und 0.1% Formalinsäure gelöst. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bis

auf einen etwa 20 ml Rückstand evaporiert. Dieser wurde im abgedunkelten Raum durch einen Faltenfilter in einen 50 ml Braunglasrundkolben transferiert und bei 30 °C komplett eingedampft. Der Rückstand wurde mit Argon überblasen und bei -20 °C gelagert. Für die HPLC-Messungen wurde der Rückstand in 1 ml Acetonitril + 0.1% Formalinsäure gelöst.

9.16.2 Extraktion von Nosperin

9.16.2.1 Extraktion aus *Peltigera membranacea*

Die Flechte *Peltigera membranacea* wurde in Island gesammelt und dort an der Luft getrocknet. 30 g des getrockneten Materials wurden im flüssigen Stickstoff mit einem Mörser und einer Pistille zu einem feinen Pulver zerrieben. Das Flechtenmaterial wurde für 24 h bei Raumtemperatur in einem Liter MeOH gerührt. Die Mixtur wurde gefiltert und die unlöslichen Bestandteile ein zweites Mal extrahiert. Die beiden flüssigen MeOH-Extraktionen wurden vereint und unter reduzierten Druck evaporiert. Der resultierende Rohextrakt wurde mit MeOH/H₂O (10:1, 300 ml) versetzt und 3 x mit jeweils 100 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Die beiden Phasen wurden getrennt aufgesammelt und die MeOH Phase unter reduziertem Druck evaporiert. Der getrocknete Rückstand wurde mittels Silicagel-Säulenchromatographie fraktioniert. Die gewählten Lösungsmittel und Lösungsmittelmischungen wurden mit einem Volumen von jeweils 0.5 l zum eluieren verwendet. Es wurden folgende Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische verwendet: Petroleumether, Petroleumether/EtOAc (1:1), EtOAc, EtOAc/MeOH (9:1; 8:2; 7:3, 1:1) und MeOH. Die Fraktionen wurden unter reduziertem Druck evaporiert.

9.16.2.2 Extraktion aus *Nostoc* (gelabelte Kultur)

Nach der Fermentation der Cyanobakterienkultur und der Abnahme von 10 l wurden die Cyanobakterien mittels eines sterilen Tuchs abfiltriert. Das Medium wurde mit 2% (v/v) Amberlite XAD16 (Sigma-Aldrich) versetzt und über Nacht gerührt. 200 g des Amberlite XAD16 wurden dafür am vorhergehenden Tag mit jeweils 300 ml Lösungsmitteln (EtAc und MeOH) nacheinander gewaschen, mit dem selben Volumen destillierten Wassers gespült und über Nacht im Exsikkator über Natriumsulfat getrocknet. Die abfiltrierten Cyanobakterien wurden in zwei 1 l Rundkolben übertragen und mit flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Das getrocknete Zellmaterial wurde 24 Stunden in 2 l MeOH

gerührt. Das Lösungsmittel wurde abfiltriert und das Zellmaterial der gleichen Prozedur mit EtOAc unterworfen. Beide Lösungsmittelextrakte wurden bei 30 °C mittels Evaporation eingengt. Die Rückstände wurden beide in 0.5 l einer MeOH/H₂O-Mischung (10:1) und 0.5 l Cyclohexan geschüttelt und die beiden Phasen getrennt aufgefangen. Alle vier resultierenden Extraktionsprodukte wurden am Evaporator getrocknet und bei -20 °C gelagert.

9.16.2.3 Extraktion aus *Nostoc* (ungelabelte Kultur)

Die gefriergetrockneten Cyanobakterien wurden in 50 ml CH₂Cl₂/MeOH (2:1) homogenisiert und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Biomasse wurde filtriert und erneut in dem gleichen Volumen CH₂Cl₂/MeOH für 30 min bei 30 °C gerührt. Diese Prozedur wurde noch zwei weitere Male wiederholt und die Extrakte anschließend kombiniert und unter reduziertem Druck evaporiert. Der Rohextrakt wurde in MeOH gelöst und mittels HPLC- und LC-MS-Experimenten untersucht.

9.16.3 HPLC-Analyse der Fermentationsprodukte von *Bacillus*

Die Extrakte der Fermentationsprodukte der Bacilluskulturen wurden mit einem Hochdruckgradientensystem der "Wellchrom-Serie" der Firma Knauer (Berlin) untersucht. Dieses System setzte sich zusammen aus zwei Pumpen K-501 mit 10 ml Keramikpumpenköpfen, einer externen, dynamischen Mischkammer, einen Autosampler "Basic Marathon" der Firma Spark (Niederlande) mit einer 20 µl Probenschleife, einem "JetStream" Säulenofen, einem Photodiodenarraydetektor (DAD) K-2800 mit einer Deuteriumlampe (190 - 600 nm) mit 10 mm Flußzelle, einem Brechungsindex-Detektor (Ri) 101 der Firma Shodex (Japan) mit einer nachgeschalteten 8 µl Flußzelle und einer Interfacebox zur Datenaufnahme des externen Detektors. Die Proben wurden auf die C18 Säule Eurospher II 100-5 (5 µl, 4 x 250 mm) mit integrierter Vorsäule der Firma Knauer aufgetragen. Gemessen wurde eine Minute mit 10% ACN : 90% H₂O, folgend von einem linearen Anstieg des Gradienten auf 90% ACN : 10% H₂O innerhalb von 15 min und einer abschließenden mehrminütigen Spülung mit 100% ACN. Zur UV-Detektion wurde die Wellenlänge 361 nm gewählt.

9.16.4 Analyse der Fraktionen des Flechtenextrakts

Die durch Säulenchromatographie gewonnenen Flechtenextraktfraktionen wurden mittels einer LC-MS-Messung an einem micrOTOF-Q-Spektrometer der Firma Bruker Daltonics (Bremen) mit der HPLC-Anlage Agilent 1200 Series und der C18-Chromatographiesäule Phenomenex Luna (5 μm , 250 x 2 mm) bei einem Phasengradienten von 1:9 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ + 0.1% TFA bis hin zu 100% Acetonitril innerhalb von 30 min analysiert. Die Durchflußrate betrug dabei 1 ml/min.

Die einzelnen Fraktionen wurden zudem mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf detektierbare Substanzen hin untersucht. Dabei wurden analytische Kieselgel DC-Platten verwendet und EtAc als Laufmittel bei den polaren und Chloroform/MeOH (1:1) bei den unpolaren Fraktionen gewählt. Die aufgetrennten Substanzen wurden mit Kaliumpermanganat-Lösung angefärbt. Die EtOAc/MeOH (9:1) Fraktion erwies sich hier als interessant und wurde mittels präparativer HPLC in 5 weitere Fraktionen aufgetrennt. Zur näheren Beschreibung der verwendeten HPLC-Anlage und Säule wird auf 9.16.13 verwiesen. Die folgenden Konditionen wurden für die Separation gewählt: 60% ACN + 40% H_2O 5 min, linearer Gradientenanstieg bis 80% ACN + 20% H_2O in zwei Minuten, 8 min Eluation ohne Gradientenveränderung und letztlich in 2 min auf 100% ACN. Die fünf isolierten Eluate und die Fraktionen der Säulenchromatographie wurden auf ihre Zytotoxizität (9.17) getestet.

9.16.5 HPLC-SPE-NMR der *Nostoc*-Extrakte

Das Lösungsmittelsystem bestand aus Eluent A (H_2O + 0.1% deuterierte Formalinsäure) und Eluent B (Acetonitril) mit einem linearen Gradienten startend mit 10% B bis zu 90% B in 30 min. Die Flußrate lag bei 0.8 ml/min bei 25 °C und das Injektionsvolumen betrug 50 μl . Die Chromatographie wurde bei 210, 220 und 254 nm aufgenommen. Diese Wellenlängen wurden gewählt um den Absorptionsgrenzwert für die Bindung an die SPE-Kartusche zu definieren. Das HPLC-Eluat wurde mit H_2O (2.4 ml/min) verdünnt und im Anschluß an die SPE- Kartuschen (Spark Holland) gebunden. Einzelne Peaks wurden 4 mal auf einer Kartusche aufgetragen um die Konzentration auf ihr zu erhöhen. Die Kartuschen wurden 30 min mit unter Druck stehendem Stickstoff getrocknet und die gebundenen Proben mit 190 μl CD_3CN (99.8 Atomprozent, Deutero GmbH, Kastellaun) in 3 mm NMR-Röhrchen von der Firma Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten) eluiert.

Alle NMR Experimente wurden an einem AVANCE III 600 MHz NMR-Spektrometer ausgestattet mit einem Kryoprobenkopf der Firma Bruker Biospin (Rheinstetten) ausgeführt. Es wurden Standardparameter verwendet, die durch das Bruker SELU Programm vorgegeben sind. Gradient COSY und HMBC wurden mit 4k komplexen Datenpunkten in der F2 und 512 Punkten in der F1 Dimension durchgeführt. Die auf die Multiplizität abgestimmte Gradient HSQC wurde mit 2k Datenpunkten in der F2 und 400 Punkten in der F1 Dimension durchgeführt. Die COSY Experimente wurden mit 32 Scans, die HSQC mit 64 Scans und die HMBC mit 128 Scans pro Inkrement durchgeführt, was in Messzeiten von 8 h 46 min (COSY), 12 h 4min (HSQC) und 35 h (HMBC) resultierte.

9.17 Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizität der Flechten- und Cyanobakterienextrakte wurden an, dem Zentralnervensystem entspringenden, Rattenneuroblasten der Zelllinie B104, sowie HeLa-Zellen (Krebszellen) getestet. Diese wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) kultiviert, das zusätzlich mit 10% hitzeinaktivierten fetalen Kalbserum (FCS) und 1% Antibiotikum (Penicillin 100 U/l und Streptomycin 100mg/l) versetzt war. Für die Experimente wurden die Zellen in 8 cm² Petrischalen kultiviert. Das Medium wurde alle 48 Stunden erneuert bis die Zellen einen Zusammenschluß bildeten. Die Experimente wurden in MEM (Modified Eagle Medium) durchgeführt, das mit 0.3% FCS und ebenfalls 1% Penicillin und Streptomycin versetzt war. Am Tag des Experiments wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellmonoschicht zwei mal mit frischen Medium gewaschen und die Zellen wurden für 24 Stunden mit Methanol enthaltenden Medium als Kontrolle oder mit den Flechten- und Cyanobakterienextrakten inkubiert.

Zur Quantifizierung des Zelltodes der kultivierten Zellen wurde der CellTiter-Blue Zellviabilitäts-Assay der Firma BD Bioscience Pharmingen (Heidelberg) benutzt, das auf der Konversion von Resazurin in das fluoreszierende Resorufin basiert. Diese metabolische Reaktion wird nur von aktiven, sprich lebenden, Zellen durchgeführt. Nach Herstellerangaben wurden zu jeder Zellkultur 100 µl CellTiter-Blue Reagenz addiert und diese dann für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 x 100 µl Medium jeder Kultur entnommen und in eine 96-well-Mikrotiterplatte übertragen. Die Fluorescence des Resorufin wurde mit einem Fluorometer der Firma Dynex Hybaid Labsystems (Frankfurt) bei 544_{EX}/590_{EM} gemessen.

9.18 Proteine

9.18.1 Proteinexpression

Für die Expression der KS-Domänen wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21 DE3 benutzt. 10 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Tag zusammen mit dem entsprechenden Antibiotikum in 100 ml TB- oder 2 x YT-Medium (9.19.1) transferiert. Dafür wurde ein Schikanekolben verwendet um die Luftzufuhr für die Bakterien zu optimieren. Bei 37 °C und 200 rpm wurde die Kultur geschüttelt bis ein eine OD₆₀₀ von 1.2 - 1.5 (TB) bzw. 0.6 - 0.8 (2 x YT) erreicht worden ist. Danach wurde die Kultur bei 4 °C auf etwa 16 °C runtergekühlt. Nach dem Absenken der Temperatur wurde durch die Zugabe von 1 M IPTG (Endkonzentration) der Expressionsvorgang induziert. Nach der Induktion wurde die Kultur bei 16 °C und 200 rpm etwa 20 Stunden inkubiert.

An der Universität Nottingham wurde die Expression unter leicht veränderten Konditionen durchgeführt. Die Übernachtskulturen wurden nur bei 180 rpm geschüttelt und es wurden pro Expression jeweils 2 x 1 l LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin und 10 ml Übernachtskultur angeimpft, das bis zur einer OD₆₀₀ von 0.6 - 0.7 wuchs, bevor es mit 1 mM Endkonzentration IPTG angeimpft und bei 16 °C und bei 180 rpm über Nacht inkubiert wurde.

9.18.2 Zellaufschluss mittels Sonifikation

Die durch die Proteinexpression (9.18.1) gewonnene Kultur wurde bei 6000 rpm und 4 °C 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in Lyse-Puffer (Tab. 26) resuspendiert. Dabei wurde pro 1 g Zellpellet 2.5 ml Lysepuffer verwendet. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das resuspendierte Zellpellet wurde im Ultraschallhomogenisator 5 x 10 sec sonifiziert, wobei zwischen den einzelnen Beschallungen jeweils 10 sec Pause eingehalten wurden. Das Homogenisat wurde anschließend bei 11000 rpm und 4 °C 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 50 ml Röhrchen übertragen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lyse-Puffer gevortext.

Tab. 26: Zusammensetzung Lyse-Puffer (pH 7.65)

Konzentration	Zusatz
25 mM	Tris
0.5 M	NaCl
10 mM	Imidazol
10%	Glycerin

An der Universität Nottingham wurden die Zellen unter einem veränderten Protokoll aufgeschlossen. Beginnend mit einer 20 minütigen Zentrifugation bei 4000 rpm wurde das Zellpellet von dem im Anschluß verworfenen Überstand separiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Ladepuffer (25 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.6) resuspendiert und die Suspension in jeweils 2 ml Portionen auf kleine Behälter aufgeteilt. Die Suspension wurde dann jeweils 4 x 30 sec sonifiziert und dabei fortwährend auf Eis gehalten. Die aufgeschlossenen Zellen wurden 30 min bei 4 °C und 37000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Aufreinigung über eine FPLC (Fast Protein Liquid Chromatographie) auf Eis gehalten.

9.18.3 Proteinaufreinigung

Die überexprimierten His-Tag-Fusionsproteine wurden mittels Ni-NTA-Agarose selektiv aufgereinigt. Der durch den Zellaufschluss und die Zentrifugation gewonnene Überstand (9.18.2) der Expressionskulturen wurde mit 150 µl Ni-NTA-Agarose versetzt und eine Stunde auf Eis geschüttelt. Die Proteinlösung wurde auf eine Polyprepsäule aufgetragen und in mehreren Waschschritten gereinigt. Die erste Waschfraktion wurde durch das Spülen mit 5 ml reinem Lyse-Puffer gewonnen. Für die anschließenden Spülungen wurde Lyse-Puffer mit ansteigenden Imidazolkonzentrationen verwendet. Die höchste Imidazolkonzentration wurde mit 300 mM erreicht. Oftmals wurde nur eine 40 mM Konzentration zum eluieren der übrigen Proteine verwendet und dann mit Konzentrationen von 250 mM weitergearbeitet um das gewünschte Protein zu eluieren. Von jeder Elutionsfraktion wurde jeweil 1 ml aufgefangen. Von allen Fraktionen wurden 20 µl entnommen um sie auf ihren Proteingehalt mittels SDS-PAGE-Analytik (9.18.4) zu testen.

An der Universität Nottingham wurde die Proteinaufreinigung automatisiert mittels der FPLC-Anlage Äkta prime durchgeführt. Der durch den Zellaufschluß mit anschließender Zentrifugation gewonnene Überstand (9.18.2) wurde auf eine 5 ml Hitrap Chelat bildende

Säule (GE Healthcare) geladen, deren Füllmaterial 0.1 M NiSO₄ war und die mit dem Ladepuffer (25 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.6) equilibriert worden ist. Die Säule wurden im nächsten Schritt mit einen 2.5 mM Imidazol enthaltenden Ladepuffer gespült. Die Elution des Proteins erfolgte über einen linear ansteigenden Gradienten der Imidazolkonzentration von 2.5 mM bis hin zu 500 mM. Die gesammelten Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und aufkonzentriert (9.18.6). Zur der Proteinlösung wurde 10%iges Glycerin addiert und 50 - 100 µl Aliquots in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

9.18.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum Aufladen der Proben auf ein SDS-Gel wurde ein Probenpuffer hergestellt, dessen Zusammensetzung in Tab. 27 aufgelistet ist.

Tab. 27: Zusammensetzung des 2 x SDS-PAGE Ladepuffer (Probenpuffer)

Konzentration	Zusatz
0.09 M	TrisHCl pH 6.8
20%	Glycerin
2%	SDS
0.02%	Bromophenolblau
0.1 M	1,4-Dithiothreit (DTT)

Zu je 20 µl Probe wurde 20 µl 2 x SDS Ladepuffer addiert. Die Proben wurden anschließend bei 99 °C eine Minute denaturiert. Dann wurden die Proben mittels eines vertikalen Multigel Elektrophoresesystems geprüft. Das dafür gefertigte Gelsystem, bestand aus einem Sammel- und einem anschließenden Trenngel (Tab. 28 und Tab. 29).

Tab. 28: Zusammensetzung des Sammelgels (4.4%)

Volumen	Zusatz
1.25 ml	Sammelgelstocklösung
3.25 ml	H ₂ O _{dest}

0.5 ml	Acrylamid (40%)
5 µl	TEMED
50 µl	10%iges Ammoniumperoxidisulfat (APS)

Die Sammelstocklösung setzt sich hierbei aus 1 M Tris-HCl (pH 6.8) und 10% SDS zusammen.

Tab. 29: Zusammensetzung des Trenngels (12%)

Volumen	Zusatz
3.75 ml	Trenngelstocklösung
6.75 ml	H ₂ Odest
4.5 ml	Acrylamid (40%)
15 µl	TEMED
150 µl	10%iges Ammoniumperoxidisulfat (APS)

Die Trenngelstocklösung setzt sich hierbei aus 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) und 10% SDS zusammen.

Die frisch angemischte Trenngellösung wurde zwischen zwei, mit Klammern fixierten und dreiseitig mit einem Gummi abgedichteten, Glasplatten gegossen und mit etwas Isopropanol überschichtet um einen möglichst geradlinigen Übergang zum Sammelgel zu schaffen. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesteckt. Das auspolymerisierte Gel wurde in eine Gelelektrophoresekammer eingesetzt, der Kamm entfernt und die gesamte Kammer mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt (Tab. 30).

Tab. 30: Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers

Konzentration	Zusatz
250 mM	Tris
2.5 M	Glycin
1%	SDS

Je nach Taschengröße wurden 10 - 30 µl der Proben in die Taschen übertragen. Neben den verschiedenen Fraktionen wurden auch zum Abschätzen des Molekulargewichts der exprimierten Proteine 3 µl des Proteinmarkers Roti-Mark Standard der Firma Roth aufgetragen (Abb. 75).

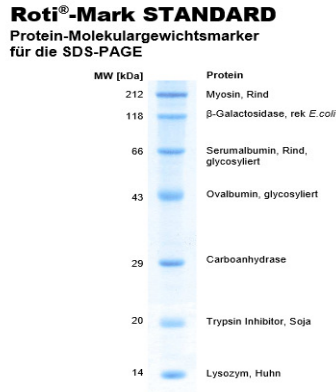


Abb. 75: Verwendeter Proteinmarker für die SDS-PAGE

Bei einer Spannung von 120 V wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt, bis das Bromphenolblau das gesamte Gel durchwandert hatte. Nach der Elektrophorese wurde das Gel über Nacht angefärbt (9.18.5).

9.18.5 Comassie-Färbung

Für das Anfärben der Proteine wurde eine Coomassie Färbelösung verwendet (Tab. 31).

Tab. 31: Zusammensetzung der Coomassie Färbelösung

Konzentration	Zusatz
10%	100%iger Eisessig
30%	Methanol
0.25%	Brilliant-Blau R250

Dabei wurde das Gel mindestens eine Stunde in der Lösung geschüttelt. Nach Beendigung der Färbung wurde das Gel mit destilliertem Wasser gespült und anschließend in einer Entfärbelösung (10% (v/v) Eisessig, 30% (v/v) Methanol) eingelegt und geschüttelt. Nach

einigen Minuten wurde die Entfärberlösung durch Frische ersetzt und solange weiter geschüttelt bis die Proteinbanden zu sehen waren. Zur dauerhaften Erhaltung des Gels wurde dieses in Cellophan-Folie zusammen mit 1 ml Glycerin getrocknet.

9.18.6 Proteinaufkonzentrierung und Konzentrationsbestimmung

Zur Aufkonzentrierung der Proteine auf 20 μ M wurde ein Vivaspin Konzentrador der Firma Vivascience verwendet, dass für Moleküle unter 30 kDa durchlässig war. Bis zur 15 ml des aufgereinigten Proteins wurden in das Filterröhrchen übertragen und bei 13000 rpm solange zentrifugiert bis die gewünschte Endkonzentration erreicht war. Dabei wurde die Konzentration des Proteins mittels Absorptionsmessung bei UV_{280} ermittelt.

9.18.7 Acylierung der KS-Domänen

Die Acylierungsreaktionen wurden in dem Lagerpuffer 25 mM Tris, 0.5 M NaCl, 10% (v/v) Glycerin, pH 7.6) ausgeführt. Die gelösten SNAC-Thioester wurden in einer 2 mM Konzentration zu den KS-Domänen addiert. Um die Löslichkeit der SNAC-Ester zu gewährleisten wurde 5% (v/v) DMSO addiert. Die Reaktionen wurden nach Zeitintervallen zwischen 0 und 40 min mit 0.1 % TFA gestoppt.

9.18.8 Vorbereitung der KS-Proben für die MS-Analyse

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden die Proben mit einem speziellen Aufreinigungssystem behandelt. Es wurden C_4 ZipTipsTM (Millipore) für jede Probe verwendet. Im ersten Schritt wurde das C_4 ZipTip-Säulchen mit 2 x 10 μ l 10% MeCN, gefolgt von 5 x 10 μ l H_2O /0.1% TFA gespült. Anschließend wurde die Proteinlösung auf das ZipTip-Säulchen geladen, indem 15 - 20 x 10 μ l der Proteinlösung in der Pipettenspitze aufgenommen und wieder in das Probenbehältnis zurückpipettiert wurden. Das auf die Säule geladene Protein wurde durch 15 x 10 μ l Spülungen mit H_2O /5% MeOH/0.1% TFA entsalzt, bevor es mit 5 μ l H_2O /80% MeCN/0.1% TFA von der Säule eluiert worden ist.

9.18.9 Massenspektrometrische Analyse der KS-Proben

Die Acylierungsreaktionen wurden alle mit dem Massenspektrometer SYNAPT™HDMS™ der Firma Waters analysiert. Dabei handelt es sich um einen Hybriden aus einem Quadrupol-Massenanalysator und einem Flugzeit-Massenspektrometer mit orthogonaler Beschleunigung (oa TOF). Von den vielfältigen Ionisierungsmöglichkeiten, die das Gerät bietet, wurde für diese Studien das nanoESI benutzt. Um die Geräteparameter des SYNAPT zu kontrollieren, wurde die MassLynx™ 4.1 Software benutzt. Die Spektren wurden aus den Rohdaten bezogen und für die Analyse erfolgte eine Glättung und Zentrierung der Daten sowie eine Milderung der Rauschsignale.

9.19 Medien, Chemikalien und Geräte

9.19.1 Medien

Alle benutzten Flüssig- und Festmedien wurden eigens hergestellt und steril autoklaviert, mit Ausnahme des BG-11 Mediums, das als Fertigprodukt von der Firma Sigma-Aldrich (Seelze) bezogen wurde. Die Medien wurden vor der Anwendung mit einem dem zu kultivierenden Bakterienstamm oder Plasmidvektor entsprechenden Antibiotikum versetzt (9.2).

Tab. 32: LB-Medium (Luria Bertani)¹⁷⁰

Menge	Zusatz
5 g	Hefeextrakt
5 g	Natriumchlorid
10 g	Trypton
	ad 1 l H ₂ O _{dest}

Mit NaOH wurde ein pH von 7 eingestellt. Für LB-Festmedium wurde zu den in Tab. 32 aufgelisteten Ingredienzen noch 15 g Agar addiert und unter sterilen Bedingungen nach dem Erhitzen in Petrischalen gegossen.

Tab. 33: TB-Medium (Terrific broth)¹⁷¹

Menge	Zusatz
12 g	Trypton
24 g	Hefeextrakt
4 ml	Glycerin
	ad 900 ml H ₂ O _{dest}

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen erfolgte die Zugabe von 100 ml sterilfiltrierter Lösung mit 0.17 M KH₂PO₄ und 0.72 M K₂HPO₄ (pH 7.2).

Tab. 34: Landy-Medium¹⁷²

Menge	Zusatz
20 g	Glucose
5 g	L-Glutaminsäure
250 mg	MgSO ₄
250 mg	KCl
500 mg	KH ₂ PO ₄
150 µg	Fe ₂ (SO ₄) ₃
5 mg	MnSO ₄
160 µg	CuSO ₄
	ad 1 l H ₂ O _{dest}

Der pH-Wert wurde nach dem Autoklavieren mit 2 M KOH auf 7 eingestellt.

Tab. 35: 2 x YT Medium (Kieser)¹⁷³

Menge	Zusatz
16 g	Trypton
10 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
ad 1 l H ₂ O	

Nach dem Autoklavieren wurden 100 ml einer sterilen Lösung mit 0.17 M KH₂PO₄ und 0.72 M K₂HPO₄ (pH 7.2) zugegeben.

BG-11 Medium¹⁷⁴

Das BG-11 Medium wurde steril geliefert und musste dementsprechend nicht autoklaviert werden. Es wurde nach Herstellerangaben 1 : 50 mit destilliertem H₂O verdünnt und die Mischung durch einen Filter sterilisiert.

9.19.2 Verwendete Chemikalien

Viele Chemikalien darunter oft verwendete Lösungsmittel zu denen Acetonitril, Chloroform, Dichlormethan, Ethanol, Isopropanol, Aceton, Ethylacetat und andere zählen, wurden von den Firmen Fluka/Riedel-de-Haën (Seelze), Merck (Darmstadt), Fisher Scientific (Schwerte), Sigma-Aldrich (Seelze) und J.T. Baker/Mallinckrodt Baker (Deventer, NL) mit p. A. Qualität bezogen. Für die HPLC wurden entsprechend hochgradig gereinigte Lösungsmittel (HPLC-grade-Lösungsmittel) verwendet.

Tab. 36: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Firma, Sitz
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
Ammoniumperoxodisulfat	(APS) Merck, Darmstadt
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Antarctic Phosphatase + 10x Puffer	NEB, Frankfurt/Main
Bovin Serum Albumin (BSA-Lösung 10 mg/ml)	NEB, Frankfurt/Main
Brilliant-Blau R250	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid	KMF, Lohmar
Chloramphenicol	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxythiamin-5'-triphosphat (dTTP)	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxynukleotide (dNTPs)	Invitrogen, Karlsruhe
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 FidelityPLUS PCR System	Roche, Grenzach-Wyhlen
D(+)-Glucose Monohydrat	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze

Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Fisher-Scientific, Schwerte
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	ABCR; Karlsruhe
Kaliumcarbonat	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Acros Organics, Geel (B)
Kanamycin-Sulfat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Acros Organics, Geel (B)
Natriumbicarbonat (¹³ C, 99%)	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Saarbrücken
Natriumcarbonat	KMF, Lohmar
Natriumchlorid	Grüssing, Filsum
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	KMF, Lohmar
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Ni-NTA Säulchen	Qiagen, Hilden
Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinmarker RotiMark Standard	Roth, Karlsruhe
QIAquick Gelextaktionskit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR purification kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme + 10x Puffer + 100x BSA	NEB, Frankfurt/Main

Ribonuklease A (RNase A)	Roth, Karlsruhe
RNase-Free DNase SEt	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini KIT	Qiagen, Hilden
S-Adenosylmethionin (SAM)	NEB, Frankfurt/Main
Salzsäure	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Schwefelsäure	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Seelze
Superscript One Step RT-PCR System	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase + 10x Puffer	NEB, Frankfurt/Main Jena Bioscience, Jena
Taq DNA Polymerase + 10x Puffer	NEB, Frankfurt/Main
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merk, Darmstadt
Toluol, wasserfrei	Sigma-Aldrich, Seelze
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg

9.19.3 Geräte und Materialien

Tab. 37: Verwendete Geräte und Materialien

Geräte/ Materialien	Firma, Sitz
Agarosegelelektrophorese-Kammer +	Biometra, Göttingen
Spannungsquelle Standard Power Pack P25	
Analysenwaage CP225D	Sartorius, Göttingen
Autoklav V65	Systemec, Wettengel

Cellophan-Folien + Getrocknungsrahmen	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
Geldokumentation Gene Genius	Syngene, Cambridge (UK)
Halb-Mikroküvette (1,6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
HPLC-Säule C18 Nucleodur 100, 125 x 2 mm, 5 µm	Machery-Nagel, Düren
HPLC-Säule C18 Phenomenex Luna 250 x 2 mm, 5 µm	Phenomenex, Aschaffenburg
Inkubationsschüttler Certomat BS-1	Sartorius, Göttingen
Inkubator B12	Thermo, Langenselbold
Kieselgel 60 (0,040- 0,063 mm)	Merck, Darmstadt
Magnetrührer Combimag RCO	IKA, Staufen
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),	Biometra, Göttingen
Multigel Long (Gelelektrophoresesystem vertikal) + Spannungsquelle Standard PowerPack P25	
Photometer (Biofotometer)	Eppendorf, Hamburg
Photometer BioMate 3 mit	Julabo Labortechnik, Seelbach
Kühleinheit FL300	Thermo Electron, Cambridge (UK)

Pipetten Pipetman P2 - P10 ml	Gilson, Middleton (USA)
Poly-Prep Säule	Bio-Rad, München
Probenfläschchen für Autosampler (HPLC-Gefäße mit Deckel und Septum)	Roth, Karlsruhe
ProteanII xi cell (Gelelektrophoresesystem vertikal)	Bio-Rad, München
Rotationsverdampfer VV2000	Heidolph, Kelheim
Schüttler Rotamax 120	Heidolph, Kelheim
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)
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

10. Literatur

1. Collie, J. N., Myers, W. S.; The formation of orcinol and other condensation products from dehydracetic acid. *J. Chem. Soc.* **63**, 122–128 (1893).
2. Staunton, J., Weissman, K. J.; Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 380–416 (2001).
3. Birch, A., Massy-Westropp, R., Moye, C.; Studies in relation to biosynthesis. VII. 2-Hydroxy-6-methylbenzoic acid in *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Aus. J. Chem.* **8**, 539 (1955).
4. Shen, B.; Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 285–295 (2003).
5. Hertweck, C.; Die biosynthetische Grundlage der Polyketid-Vielfalt. *Angew. Chem.* **121**, 4782–4811 (2009).
6. D. O'Hagan. The polyketid metabolites. 86 (1991).
7. Gewirtz, A., Virginia, F. A. F.; Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol. Pharm.* **45**, 649–656 (1994).
8. Bollag, D. M., Mcquaney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., Woods C.; Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res.* **55**, 2325–2333 (1995).
9. Pahlevan, A. A., Wright, D. J., Andrews, C., Georg, K. M., Small, P. L., Foxwell, B. M.; The inhibitory action of *Mycobacterium ulcerans* soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF-kappa B function. *J. immunol.* **163**, 3928–3935 (1999).
10. Cannon, M., Burns, K.; Modes of action of erythromycin and thiostrepton as inhibitors of protein synthesis. *FEBS Lett.* **18**, 1–5 (1971).
11. Liou, G.; Building-block selectivity of polyketide synthases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 279–284 (2003).
12. Smith, S., Tsai, S.-C.; The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 1041–1072 (2007).
13. Lexikon der Biochemie. *Spektrum Akad. Verlag*, 226–227 (2000).
14. Rawlings, B. J.; Biosynthesis of fatty acids and related metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **15**, 275–308 (1998).
15. Khosla, C., Gokhale, R. S., Jacobsen, J. R., Cane, D. E.; Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 219–253 (1999).

16. Lai, J. R., Koglin, A., Walsh C. T.; Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Biochemistry* **45**, 14869–14879 (2006).
17. Cane, D. E., Walsh, C. T.; The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, R319–325 (1999).
18. Fischbach, M. A., Walsh, C. T.; Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery and mechanisms. *Chem. Rev.* **106**, 3468–3496 (2006).
19. Walsh, C. T.; Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science* **303**, 1805–1810 (2004).
20. Hopwood, D. A.; Cracking the polyketide code. *PLoS Biol.* **2**, 166–169 (2004).
21. Hopwood, D. A.; Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem. Rev.* **97**, 2465–2498 (1997).
22. Hendrickson, L.; Davis, C. R., Roach, C., Nguyen, D. K., Aldrich T., Mcada, P. C., Reeves, D.; Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and multifunctional polyketide synthase gene. *Chem. Biol.* **6**, 429–439 (1999).
23. Shoolingin-Jordan, P. M., Campuzano D. I.; Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives. *Elsevier, Oxford.* (2009).
24. 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. USA* **96**, 1846–1851 (1999).
25. McAlpine, J. B., Bachmann, B. O., Pirae, M., Tremblay, S., Alarco, A.-M., Zazopoulos, E.; Microbial genomics as a guide to drug discovery and structural elucidation: ECO-02301, a novel antifungal agent, as an example. *J. Nat. Prod.* **68**, 493–496 (2005).
26. Meurer, G., Gerlitz, M., Wendt-pienkowskli, E., Rohr, J.-G., Hutchinson, C. R., Vining, L. C.; Iterative type II polyketide synthases, cyclases and ketoreductases exhibit context-dependent behavior in the biosynthesis of linear and angular decapolyketides. *Chem. Biol.* **4**, 433–443 (1997).
27. Okamoto, S., Taguchi, T., Ochi, K., Ichinose, K.; Biosynthesis of actinorhodin and related antibiotics: discovery of alternative routes for quinone formation encoded in the *act* gene cluster. *Chem. Biol.* **16**, 226–236 (2009).
28. Resmi, M. S. S. R., Verma, P., Gokhale, R. S., Soniya, E. V.; Identification and characterization of a type III polyketide synthase involved in quinolone alkaloid biosynthesis from *Aegle marmelos* *Corr. J. Biol. Chem.*, 1-20 (2013). doi:10.1074/jbc.M112.429886
29. Austin, M. B., Noel, J. P.; The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 79–110 (2003).

30. Jez, J. M., Bowman, M. E., Noel, J. P.; Expanding the biosynthetic repertoire of plant type III polyketide synthases by altering starter molecule specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5319–5324 (2002).
31. Moss, S. J., Martin, C. J., Wilkinson, B.; Loss of co-linearity by modular polyketide synthases: a mechanism for the evolution of chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.* **21**, 575–593 (2004).
32. Piel, J., Hui, D., Fusetani, N., Matsunaga, S.; Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Env. Microbiol.* **6**, 921–927 (2004).
33. Piel, J.; A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14002–14007 (2002).
34. Piel, J.; Biosynthesis of polyketides by *trans*-AT polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 996–1047 (2010).
35. Cheng, Y., Tang, G., Shen, B.; Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 3149–3154 (2003).
36. Scotti, C., Piatti, M., Cuzzonia, A., Perania, P., Tognonib, A., Grandib, G., Galizzi, A., Albertini, A. M.; A *Bacillus subtilis* large ORF coding for a polypeptide highly similar to polyketide synthases. *Gene* **130**, 65–71 (1993).
37. Jenke-Kodama, H., Börner, T., Dittmann, E.; Natural biocombinatorics in the polyketide synthase genes of the actinobacterium *Streptomyces avermitilis*. *PLoS Comput. Biol.* **2**, 1210–1218 (2006).
38. Nguyen, T., Ishida, K., Jenke-Kodama, H., Dittmann, E., Gurgui, C., Hochmuth, T., Taudien, S., Platzner, M., Hertweck, C., Piel, J.; Exploiting the mosaic structure of *trans*-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection. *Nat. Biotechnol.* **26**, 225–233 (2008).
39. Stachelhaus, T., Mootz, D., Marahiel, A.; The specificity-conferring code of adenylation nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, 493–505 (1999).
40. Laland, S. G., Zimmer, T. L.; The protein thiotemplate mechanism of synthesis for the peptide antibiotics produced by *Bacillus brevis*. *Essays Biochem.* **9**, 31–57 (1973).
41. Challis, G. L., Ravel, J., Townsend, C. A.; Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* **7**, 211–224 (2000).
42. Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., Mootz, H. D.; Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**, 2651–2674 (1997).
43. Von Döhren, H., Keller, U., Vater, J., Zocher, R.; Multifunctional peptide synthetases. *Chem. Rev.* **97**, 2675–2706 (1997).
44. Cane, D. E.; Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282**, 63–68 (1998).

45. Finking, R., Marahiel, M. A.; Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 453–88 (2004).
46. Schwecke, T., Aparicio, J. F., Molnár, I., König, A., Khaw, L. E., Haydocks, S. F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortés, J., Lester J. B.; The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7839–7843 (1995).
47. Chen, X.-H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsi, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A. W., Gottschalk, G., Süssmuth, R. D., Borriss, R.; Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* **188**, 4024–36 (2006).
48. Ehrenreich, I. M., Waterbury, J. B., Webb, E. A.; Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. *Appl. Env. Microbiol.* **71**, 7401–7413 (2005).
49. Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P. R., Vater, J., Süssmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Borriss, R.; Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1007–1014 (2007).
50. Koumoutsi, A., Chen, X., Henne, A., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R., Liesegang, H.; Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* **186**, 1084–1096 (2004).
51. Chen, X.-H., Koumoutsi, A., Scholz, R. & Borriss, R.; More than anticipated - production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 14–24 (2009).
52. Chen, X.-H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsi, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A. W., Gottschalk, G., Süssmuth, R. D., Borriss, R.; Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* **188**, 4024–4036 (2006).
53. Scholz, R., Molohon, K. J., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A. L., Süssmuth, R. D., Mitchell, D. A., Borriss, R.; Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* **193**, 215–224 (2011).
54. Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süssmuth, R., Piel, J., Borriss, R.; Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol.* **140**, 27–37 (2009).
55. Chen, X. H., Scholz, R., Borriss M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., Borriss, R.; Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J. Biotechnol.* **140**, 38–44 (2009).
56. Idriss, E. E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., Borriss, R.; Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*. **148**, 2097–2109 (2002).

57. Straight, P. D., Fischbach, M. A., Walsh, C. T., Rudner, D. Z., Kolter, R.; A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 305–310 (2007).
58. Butcher, R. A., Schroeder, F. C., Fischbach, M. A., Straight, P. D., Kolter, R., Walsh, C. T., Clardy, J.; The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 1506–1509 (2007).
59. Dorrestein, P. C., Blackhall, J., Straight, P. D., Fischbach, M. A., Garneau-Tsodikova, S., Edwards, D. J., Mclaughlin, S., Lin, M., Gerwick, W. H., Kolter, R., Walsh, C. T., Kelleher, N. L.; Activity screening of carrier domains within nonribosomal peptide synthetases using complex substrate mixtures and large molecule mass spectrometry. *Biochemistry* **45**, 1537–1546 (2006).
60. Bumpus, S. B., Magarvey, N. A., Kelleher, N. L., Walsh, C. T., Calderone, C. T.; Polyunsaturated fatty-acid-like *trans*-enoyl reductases utilized in polyketide biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11614–6 (2008).
61. Calderone, C. T., Kowtoniuk, W. E., Kelleher, N. L., Walsh, C. T., Dorrestein, P. C.; Convergence of isoprene and polyketide biosynthetic machinery: isoprenyl-S-carrier proteins in the pksX pathway of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 8977–8982 (2006).
62. Gu, L., Junyong, J., Liu, H., Håkansson, K., Gerwick, W. H., Sherman, D. H.; Metabolic coupling of dehydration and decarboxylation in the curacin A pathway: functional identification of a mechanistically diverse enzyme pair. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9014–9015 (2006).
63. Calderone, C. T.; Isoprenoid-like alkylations in polyketide biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **25**, 845–53 (2008).
64. Dorrestein, P. C., Bumpus, S. B., Calderone, C. T., Garneau-Tsodikova, S., Aron, Z. D., Straight, P. D., Kolter, R., Walsh, C. T., Kelleher, N. L.; Facile detection of acyl and peptidyl intermediates on thiotemplate carrier domains via phosphopantetheinyl elimination reactions during tandem mass spectrometry. *Biochemistry* **45**, 12756–12766 (2006).
65. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A.; The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249–256 (1997).
66. Moszer, I., Glaser, P., Danchin, A.; SubtiList: a relational database for the *Bacillus subtilis* genome. *Microbiology* **141**, 261–268 (1995).
67. Moszer, I.; The complete genome of *Bacillus subtilis*: from sequence annotation to data management and analysis. *FEBS Lett.* **430**, 28–36 (1998).
68. Reddick, J. J., Antolak, S. A., Raner, G. M.; PksS from *Bacillus subtilis* is a cytochrome P450 involved in bacillaene metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 363–367 (2007).

69. Moldenhauer, J., Chen, X.-H., Borriss, R., Piel, J.; Biosynthesis of the antibiotic bacillaene, the product of a giant polyketide synthase complex of the *trans*-AT family. *Angew. Chem.* **119**, 8343–8345 (2007).
70. Moldenhauer, J., Götz, D. C. G., Albert, C. R., Bischof, S. K., Schneider, K., Süssmuth, R. D., Engeser, M., Gross, H., Bringmann, G., Piel, J.; The final steps of bacillaene biosynthesis in *Bacillus amyoliquefaciens* FZB42: direct Evidence for β,γ dehydration by a *trans*-acyltransferase polyketide synthase. *Angew. Chem.* **122**, 1507–1509 (2010).
71. Cichewicz, R. H., Valeriote, F. A., Crews, P.; Psymberin, a potent sponge-derived cytotoxin from *Psammocinia* distantly related to the pederin family. *Org Lett* **6**, 1951–1954 (2004).
72. 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.* **68**, 472–479 (2005).
73. Kador, M. N.; *Dissertation* (2007).
74. Kellner, R. L. L., Dettner, K.; Allocation of pederin during lifetime of *Paederus* rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae): evidence for polymorphism of hemolymph toxin. *J. Chem. Ecol.* **21**, 1719–1733 (1995).
75. Kellner, R. L. L., Dettner, K.; Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. *Oecol.* **107**, 293–300 (1996).
76. Jacobs-Lorena, M., Brega, A., Baglioni, C.; Inhibition of protein synthesis in reticulocytes by antibiotics v. mechanism of action of pederine, an inhibitor of initiation and elongation. *Bioenergetics* **240**, 263–272 (1971).
77. Nishimura, S., Matsunaga, S., Yoshida, M., Hirota, H., Yokoyama, S., Fusetani, N.; 13-Deoxytedanolide, a marine sponge-derived antitumor macrolide, binds to the 60S large ribosomal subunit. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 449–454 (2005).
78. Lee, K.-H., Nishimura, S., Matsunaga, S., Fusetani, N., Horinouchi, S., Yoshida, M.; Inhibition of protein synthesis and activation of stress-activated protein kinases by onnamide A and theopederin B, antitumor marine natural products. *Cancer. Sci.* **96**, 357–364 (2005).
79. 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. USA* **101**, 16222–16227 (2004).
80. Fisch, K. M., Gurgui, C., Heycke, N., Van Der Sar, S. A., Anderson, S. A., Webb, V. L., Taudien, S., Platzer, M., Rubio, B. K., Robinson, S. J., Crews, P.; Polyketide assembly lines of uncultivated sponge symbionts from structure-based gene targeting. *Nat. Chem. Biol.* **176**, 1–8 (2009). doi:10.1038/nchembio.176
81. Nakabachi, A., Ueoka, R., Oshima, K., Teta, R., Mangoni, A., Gurgui, M., Oldham, N. J., Van Echten-Deckert, G., Okamura, K., Yamamoto, K., Inoue, H., Ohkuma, M., Hongoh, Y., Miyagishima, S.-Y., Hattori, M., Piel, J., Fukatsu, T.; Defensive bacteriome symbiont with a drastically reduced genome. *Curr. Biol.* **23**, 1–7 (2013).

82. Piel, J., Höfer, I., Hui, D., Ho, I.; Evidence for a symbiosis island involved in horizontal acquisition of pederin biosynthetic capabilities by the bacterial symbiont of *Paederus fuscipes* beetles. *J. Bacteriol.* **186**, 1280–1286 (2004).
83. Rippka, R.; Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzym.* **167**, 3–27 (1988).
84. Dittmann, E., Wiegand, C.; Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, 7–17 (2006).
85. Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K. & Shirai, M.; Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem.* **126**, 520–529 (1999).
86. Nishizawa, T., Ueda, A., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K., Ochi, K., Shirai, M.; Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *J. Biochem.* **127**, 779–789 (2000).
87. Tillett, D., Dittmann, E. M., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., Neilan, B. A.; Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* **7**, 753–764 (2000).
88. Patterson, G. M. L., Larsen, L. K., Moore, R. E.; Bioactive natural products from blue-green algae. *J. Appl. Phycol.* **6**, 151–157 (1994).
89. Dittmann, E., Neilan, B., Börner, T.; Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 467–473 (2001).
90. Welker, M., von Döhren, H.; Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis. *FFEMS Microbiol. Rev.* **30**, 530–563 (2006).
91. Gerwick, W., Tan, L., Sitachitta, N.; Nitrogen-containing metabolites from marine cyanobacteria. *Alkaloids Chem. Biol.* **57**, 75–184 (2001).
92. Jones, A. C., Gu, L., Sorrels, C. M., Sherman, D. H., Gerwick, W. H.; New tricks from ancient algae: natural products biosynthesis in marine cyanobacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 216–223 (2009).
93. Christiansen, G., Dittmann, E., Via, O. L., Rippka, R., Herdman, M., Börner, T.; Nonribosomal peptide synthetase genes occur in most cyanobacterial genera as evidenced by their distribution in axenic strains of the PCC. *Arch. Mikrobiol.* **176**, 452–458 (2001).
94. Burns, B. P., Seifert, A., Goh, F., Pomati, F., Jungblut, A.-D., Serhat, A., Neilan, B. A.; Genetic potential for secondary metabolite production in stromatolite communities. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**, 293–301 (2005).
95. Dembitsky, V. M., Rezanka, T.; Metabolites produced by nitrogen-fixing *Nostoc* species. *Folia Microbiol.* **50**, 363–391 (2005).
96. Bui, H. T. N., Jansen, R., Pham, H. T. L., Mundt, S.; Carbamidocyclophanes A-E, chlorinated paracyclophanes with cytotoxic and antibiotic activity from the vietnamese cyanobacterium *Nostoc* sp. *J. Nat. Prod.* **70**, 499–503 (2007).

97. Kajiyama, S., Kanzakt, H., Kawazu, K., Kobayashi, A.; Nostofungicidine, an antifungal lipopeptide from the field-grown terrestrial blue-green alga *Nostoc commune*. *Tetrahedron Lett.* **39**, 3737–3740 (1998).
98. Jaki, B., Heilmann, J., Sticher, O.; New antibacterial metabolites from the cyanobacterium *Nostoc commune*(EAWAG 122b). *J. Nat. Prod.* **63**, 1283–5 (2000).
99. Nowruzi, B., Sivonen, K., Kazemi, B., Najafi, F., Nejadstattari, T.; A gene expression study on strains of *Nostoc* (cyanobacteria) revealing antimicrobial activity under mixotrophic conditions. *Afr. J. Biotechnol.* **11**, 11296–11308 (2012).
100. Kanekiyo, K., Lee, J.-B., Hayashi, K., Takenaka, H., Hayakawa, Y., Endo, S., Hayashi, T.; Isolation of an antiviral polysaccharide, nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. *J. Nat. Prod.* **68**, 1037–1041 (2005).
101. Zainuddin, E. N., Mundt, S., Wegner, U., Mentel, R.; Cyanobacteria a potential source of antiviral substances against influenza virus. *Med. Microbiol. Immunol.* **191**, 181–182 (2002).
102. Hoffmann, D., Hevel, J. M., Moore, R. E., Moore, B. S.; Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptolide A biosynthetic gene cluster from *Nostoc* sp. GSV224. *Gene* **311**, 171–180 (2003).
103. Hunsucker, S. W., Klage, K., Slaughter, S. M., Potts, M., Helm, R. F.; A preliminary investigation of the *Nostoc punctiforme* proteome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **317**, 1121–1127 (2004).
104. Kehr, J. C., Picchi, D. G., Dittmann, E.; Natural product biosyntheses in cyanobacteria: a treasure trove of unique enzymes. *Beilstein J. Org. Chem* **7**, 1622–1635 (2011).
105. Panda, D., DeLuca, K., Williams, D., Jordan, M. A., Wilson, L.; Antiproliferative mechanism of action of cryptophycin-52: kinetic stabilization of microtubule dynamics by high-affinity binding to microtubule ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9313–9318 (1998).
106. Smith, C. D., Zhang, X., Mooberry, S. L.; Cryptophycin: a new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells. *Cancer Res.* **54**, 3779–3784 (1994).
107. Svenning, M. M., Eriksson, T., Rasmussen, U.; Phylogeny of symbiotic cyanobacteria within the genus *Nostoc* based on 16S rDNA sequence analyses. *Arch. Microbiol.* **183**, 19–26 (2005).
108. Rikkinen, J., Oksanen, I., Lohtander, K.; Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. *Science* **297**, 357 (2002).
109. Paulsrud, P., Rikkinen, J., Lindblad, P.; Spatial patterns of photobiont diversity in some *Nostoc*-containing lichens. *New Phytol.* **146**, 291–299 (2000).
110. Zerikly, M., Challis, G. L.; Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem.* **10**, 625–33 (2009).
111. Corre, C., Challis, G. L.; New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 977–986 (2009).

112. Van Lanen, S. G., Shen, B.; Microbial genomics for the improvement of natural product discovery. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 252–260 (2006).
113. Bergmann, S., Schümann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A. A., Hertweck, C.; Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 213–217 (2007).
114. Bode, H. B., Müller, R.; The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angew. Chem.* **44**, 6828–6846 (2005).
115. Gross, H.; Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 267–77 (2007).
116. Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O’Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., Hopwood, D. A.; Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **3417**, 141–147 (2002).
117. Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T., Chater, K. F.; PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 1541–1546 (2003).
118. Lautru, S., Deeth, R. J., Bailey, L. M., Challis, G. L.; Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 265–269 (2005).
119. Song, L., Barona-Gomez, F., Corre, C., Xiang, L., Udvary, D. W., Austin, M. B., Noel, J. P., Moore, B. S., Challis, G. L.; Type III polyketide synthase β -ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 14754–14755 (2006).
120. Corre, C., Song, L., Rourke, S. O., Chater, K. F., Challis, G. L.; 2-Alkyl-4-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 17510–17515 (2008).
121. Fazio, G. C., Xu, R., Matsuda, S. P. T.; Genome mining to identify new plant triterpenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 5678–5679 (2004).
122. Teta, R., Gurgui, M., Helfrich, E. J. N., Künne, S., Schneider, A., Van Echten-Deckert, G., Mangoni, A., Piel, J.; Genome mining reveals *trans*-AT polyketide synthase directed antibiotic biosynthesis in the bacterial phylum bacteroidetes. *Chembiochem.* **11**, 2506–2512 (2010).
123. Hutchinson, C. R.; Combinatorial biosynthesis for new drug discovery. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 319–329 (1998).

124. Xavier, B. B., Miao, V. P. W., Jónsson, Z. O., Andrésón, Ó. S.; Mitochondrial genomes from the lichenized fungi *Peltigera membranacea* and *Peltigera malacea*: features and phylogeny. *Fungal Biol.* **116**, 802–814 (2012).
125. Awai, K., Wolk, C. P.; Identification of the glycosyl transferase required for synthesis of the principal glycolipid characteristic of heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *FEMS Microbiol. Lett.* **266**, 98–102 (2007).
126. Kampa, A., Gagunashvili, A. N., Gulder, T. A. M., Morinaka, B. I., Daolio, C., Godejohann, Ma., Miao, V. P. W., Piel, J., Andrésón, Ó. S.; Metagenomic natural product discovery in lichen provides evidence for a family of biosynthetic pathways in diverse symbioses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 1–9 (2013). doi:10.1073/pnas.1305867110
127. Partida-Martinez, L. P., Hertweck, C.; A gene cluster encoding rhizoxin biosynthesis in “*Burkholderia rhizoxina*”, the bacterial endosymbiont of the fungus *Rhizopus microsporus*. *Chembiochem.* **8**, 41–45 (2007).
128. Brendel, N., Partida-Martinez, L. P., Scherlach, K., Hertweck, C.; A cryptic PKS-NRPS gene locus in the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 codes for the biosynthesis of an antimitotic rhizoxin complex. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 2211–2213 (2007).
129. Hochmuth, T., Piel, J.; Polyketide synthases of bacterial symbionts in sponges-- evolution-based applications in natural products research. *Phytochemistry* **70**, 1841–1849 (2009).
130. Jenke-Kodama, H., Sandmann, A., Müller, R., Dittmann, E.; Evolutionary implications of bacterial polyketide synthases. *Mol. Bio. Evol.* **22**, 2027–2039 (2005).
131. Gu, L., Geders, T. W., Wang, B., Gerwick, W. H., Håkansson, K., Smith, J. L., Sherman, D. H.; GNAT-like strategy for polyketide chain initiation. *Science* **318**, 970–974 (2007).
132. Piel, J., Wen, G., Platzer, M., Hui, D.; Unprecedented diversity of catalytic domains in the first four modules of the putative pederin polyketide synthase. *Chembiochem.* **5**, 93–98 (2004).
133. Kusebauch, B., Busch, B., Scherlach, K., Roth, M., Hertweck, C.; Functionally distinct modules operate two consecutive $\alpha,\beta \rightarrow \beta,\gamma$ double-bond shifts in the rhizoxin polyketide assembly line. *Angew. Chem.* **49**, 1460–1464 (2010).
134. Keatinge-Clay, A.; Crystal structure of the erythromycin polyketide synthase dehydratase. *J. Mol. Biol.* **384**, 941–953 (2008).
135. Khosla, C., Tang, Y., Chen, A. Y., Schnarr, N. A., Cane, D. E.; Structure and mechanism of the 6-deoxyerythronolide B synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 195–221 (2007).
136. Zimmermann, K., Engeser, M., Blunt, J. W., Munro, M. H. G., Piel, J.; Pederin-type pathways of uncultivated bacterial symbionts: analysis of O-methyltransferases and generation of a biosynthetic hybrid. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2780–1 (2009).

137. Aronsson, H., Schöttler, M. A., Kelly, A. A., Sundqvist, C., Dörmann, P., Karim, S., Jarvis, P.; Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in *Arabidopsis* affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves. *Plant Physiol.* **148**, 580–92 (2008).
138. Nash, T.; *Cambridge Univ. Press* (2008).
139. Wu, F., Green, M. E., Floreancig, P. E.; Total synthesis of pederin and analogues. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 1131–4 (2011).
140. Reid, R., Piagentini, M., Rodriguez, E., Ashley, G., Viswanathan, N., Carney, J., Santi, D. V., Hutchinson, C. R., McDaniel, R.; A model of structure and catalysis for ketoreductase domains in modular polyketide synthases. *Biochemistry* **42**, 72–9 (2003).
141. Caffrey, P. Conserved amino acid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases. *ChemBiochem.* **4**, 654–7 (2003).
142. Eppelmann, K., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A.; Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry* **41**, 9718–26 (2002).
143. Kampa, A., Gagunashvili, A. N., Gulder, T. A. M., Morinaka, B. I., Daolio, C., Godejohann, M., Miao, V. P. W., Piel, J., Andrésson, Ó. S.; Metagenomic natural product discovery in lichen provides evidence for a family of biosynthetic pathways in diverse symbioses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 1–9 (2013). doi:10.1073/pnas.1305867110
144. Miao V., Rabenau A., L. A.; Cultural and molecular characterization of photobionts of *Peltigera membranacea*. *Lichenol.* **29**, 571–586 (1997).
145. Wastlhuber, R., Loos, E.; Differences between cultured and freshly isolated cyanobiont from *Peltigera* – Is there symbiosis-specific regulation of a glucose carrier? *Lichenol.* **28**, 67–78 (1996).
146. Kaasalainen, U., Jokela, J., Fewer, D. P., Sivonen, K., Rikkinen, J.; Microcystin production in the tripartite cyanolichen *Peltigera leucophlebia*. *MPMI* **22**, 695–702 (2009).
147. Kaasalainen, U., Fewer, D. P., Jokela, J., Wahlsten, M., Sivonen, K., Rikkinen, J.; Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 5886–5891 (2012).
148. Magarvey, N. A., Beck, Z. Q., Golakoti, T., Ding, Y., Huber, U., Hemscheidt, T. K., Abelson, D., Moore, R. E., Sherman, D. H.; Biosynthetic characterization and chemoenzymatic assembly of the cryptophycins. Potent anticancer agents from cyanobionts. *ACS Chem. Biol.* **1**, 766–779 (2006).
149. Narquizian, R., Kocienski, P. J.; The pederin family of antitumor agents: structures, synthesis and biological activity. In: Mulzer, J., Bohlmann, R.; The role of natural products in drug discovery. *Ernst Schering Research Foundation Workshop* **32**, Springer: New York, 25-56 (2000).

50. Kellner, R. L. L.; Molecular identification of an endosymbiotic bacterium associated with pederin biosynthesis in *Paederus sabaesus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 389–395 (2002).
151. Lopanik, N., Lindquist, N., Targett, N.; Potent cytotoxins produced by a microbial symbiont protect host larvae from predation. *Oecol.* **139**, 131–139 (2004).
152. Sudek, S., Lopanik, N. B., Waggoner, L. E., Hildebrand, M., Anderson, C., Liu, H., Patel, A., Sherman, D. H., Haygood, M. G.; Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from “Candidatus *Endobugula sertula*”, the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *J. Nat. Prod.* **70**, 67–74 (2007).
153. Partida-Martinez, L. P., Hertweck, C.; Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature* **437**, 884–888 (2005).
154. Wan, S., Wu, F., Rech, J. C., Green, M. E., Balachandran, R., Horne, W. S., Day, B. W., Floreancig, P. E.; Total synthesis and biological evaluation of pederin, psymberin, and highly potent analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16668–16679 (2011).
155. Gürel, G., Blaha, G., Steitz, T. A., Moore, P. B.; Structures of triacetyloleandomycin and mycalamide A bind to the large ribosomal subunit of *Haloarcula marismortui*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 5010–5014 (2009).
156. Rezsöhazy, R., Hallet, B., Delcour, J., Mahillon, J.; The IS4 family of insertion sequences: evidence for a conserved transposase motif. *Mol. Microbiol.* **9**, 1283–1295 (1993).
157. Dorrestein, P. C.; Imaging mass spectrometry and molecular network guided genome mining of microbial systems. *Planta Med.* **78**, 1030 (2012).
158. Kirschning, A., Taft, F., Knobloch, T.; Total synthesis approaches to natural product derivatives based on the combination of chemical synthesis and metabolic engineering. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 3245–3259 (2007).
159. Knobloch, T., Harmrolfs, K., Taft, F., Thomaszewski, B., Sasse, F., Kirschning, A.; Mutational biosynthesis of ansamitocin antibiotics: a diversity-oriented approach to exploit biosynthetic flexibility. *Chembiochem.* **12**, 540–547 (2011).
160. Taft, F., Brünjes, M., Floss, H. G., Czempinski, N., Grond, S., Sasse, F., Kirschning, A.; Highly active ansamitocin derivatives: mutasynthesis using an AHBA-blocked mutant. *Chembiochem.* **9**, 1057–1060 (2008).
161. Kirschning, A., Hahn, F.; Vereinigung von chemischer Synthese und Biosynthese: ein neues Kapitel in der Totalsynthese von Naturstoffen und Naturstoffbibliotheken. *Angew. Chem.* **124**, 4086–4096 (2012).
162. Taft, F., Harmrolfs, K., Nickleit, I., Heutling, A., Kiene, M., Malek, N., Sasse, F., Kirschning, A.; Combined muta- and semisynthesis: a powerful synthetic hybrid approach to access target specific antitumor agents based on ansamitocin P3. *Chem. Eur. J.* **18**, 880–6 (2012).

163. Yue, S., Duncan, J. S., Yamamoto, Y., Hutchinson, C. R.; Macrolide biosynthesis. ty lactone formation involves the processive addition of three carbon units. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 1253–1255 (1986).
164. Pohl, N. L., Gokhale, R. S., Cane, D. E.; Synthesis and incorporation of an N-acetylcysteamine analogue of methylmalonyl-CoA by a modular polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 11206–11207 (1998).
165. Cane, D. E., Kudo, F., Kinoshita, K., Khosla, C.; Precursor-directed biosynthesis: biochemical basis of the remarkable selectivity of the erythromycin polyketide synthase toward unsaturated triketides. *Chem. Biol.* **9**, 131–142 (2002).
166. Moldenhauer, J.; Biosynthetische Studien von *trans*-AT Polyketidsynthesen. *Dissertation* 32-34 (2009).
167. Jenner, M., Frank, S., Kampa, A., Kohlhaas, C., Pöplau, P., Briggs, G. S., Piel, J., Oldham, N. J.; Substrate specificity in ketosynthase domains from *trans*-AT polyketide synthases. *Angew. Chem.* **25**, 1181–1185 (2013).
168. Kohlhaas, C., Jenner, M., Kampa, A., Briggs, G., Afonso, J., Piel, J., Oldham, N. J.; Amino acid-accepting ketosynthase domain from a *trans*-AT polyketide synthase exhibits high selectivity for predicted intermediate. *Chem. Sci.* **4**, 3212-3217 (2013). doi:10.1039/c3sc50540e
169. Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O., Petersen, T. N.; CPHmodels-3.0--remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. *Nucleic Acids Res.* **38**, W576–581 (2010).
170. Sambrook J, Russell, D. W.; Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (2001)
171. Tartoff, K. D., Hobbs C. A.; Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res Labs Focus* **9**, (1987).
172. Landy, M., Warren, G. H., Rosenman, S. B., Colio L. G.; Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Exp. Biol. Med.* **67**, 539–541 (1948).
173. Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A.; Practical *Streptomyces* genetics. *The John Innes Foundation: Norwich, UK* (2000).
174. RW, C.; Culturing of cyanobacteria. *Methods Enzym.* **167**, 68–93 (1988).

11. Anhang

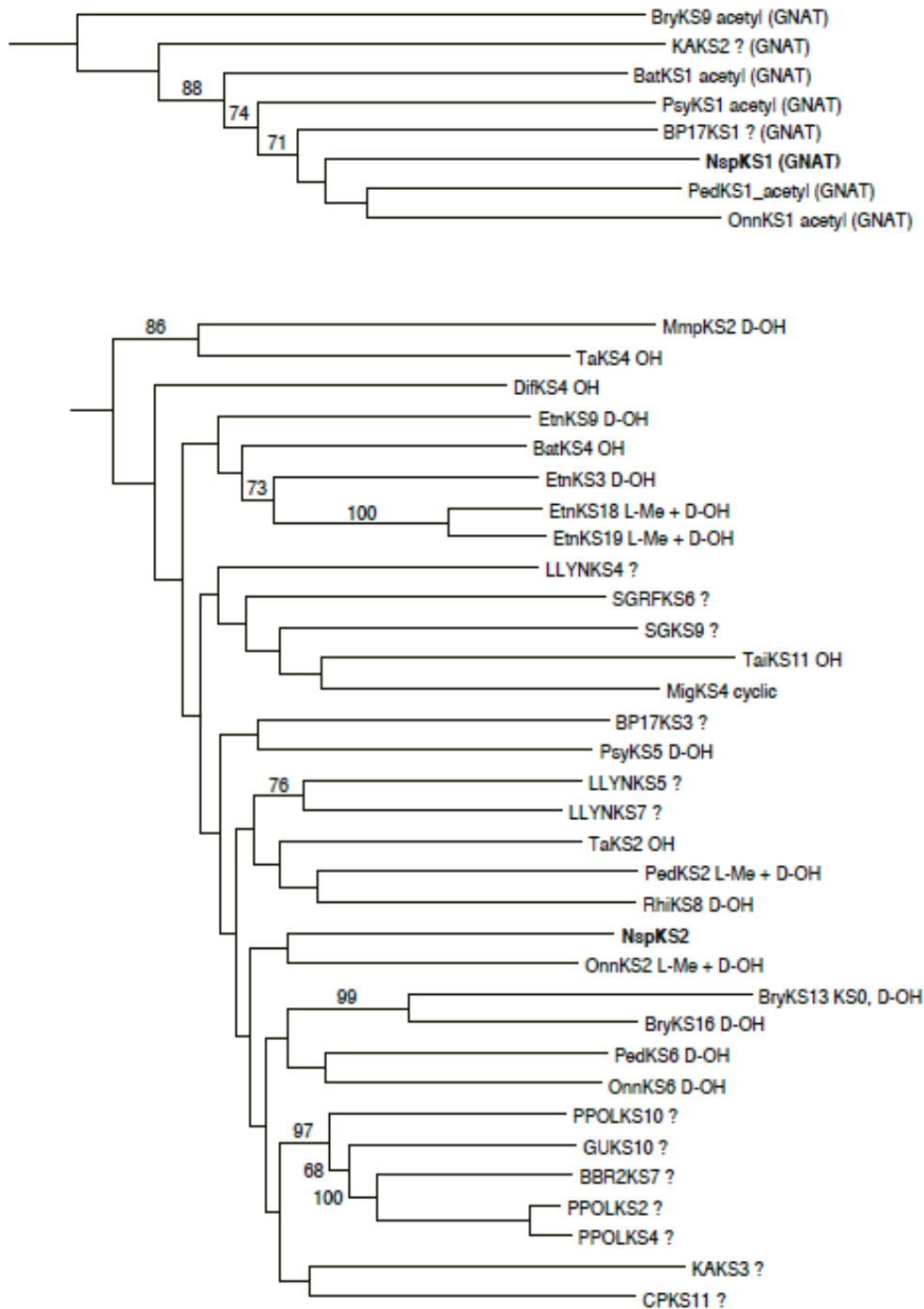


Abb. 76: Kladogramm der *nsp* KS1 und KS2 enthaltenden Kladen (in fett markiert). Bootstrap values, die mehr als 60% betragen sind an den Knotenpunkten dargestellt. Die Fragezeichen markieren unbekannte Substrate. Abkürzungen für Mitglieder dieser Klade und der Kladen aus Abb. 77 und Abb. 78: Alb, Albicidin, *Xanthomonas albilineans*; Bae, Bacillaen, *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42; Bat, Batumin/Kalimantacin, *Pseudomonas fluorescens* BCCM ID9359; Bry, Bryostatin, "*Candidatus Endobugula sertula*", der Endosymbiont des marinen Bryozoen *Bugula neritina*; BBR1 and BBR2,

Brevibacillus brevis NBRC 100599 Cluster BBR47 31930-32020 und BBR47 39780-39920; BCER, *Bac. cereus* BSGC 6E1 cluster; BP, *Burkholderia pseudomallei* Cluster (mehrere Stämme); BTP, *Bac. thuringiensis pondicheriensis* BGSC 4BA1 Cluster; CACI, *Catenulispora acidiphila* DSM 44928; CC, CC2, CC3, *Clostridium cellulolyticum* H10 Cluster Ccel 0858-0868, Ccel 2373-2386 and Ccel 0965-0980; Chi, Chivosazol, *Sorangium cellulosum* 'So ce 56'; CJA, *Cellvibrio japonicus* Ueda107; CP, *Chitinophaga pinensis* Cluster; Cor, Corallopyronin, *Corallocccoccus coralloides* B035; DDAN, *Dickeya dadantii* Ech703 Cluster; Dif, Difficidin, *Bac. amyloliquefaciens* FZB 42; Dsz, Disorazol, *Sor. cellulosum* 'So ce 12'; Etn, Etnangien, *Sor. cellulosum* 'So ce 56'; GU, *Geobacter uraniireducens* Rf4; KA, *Kordia algicida* OT-1; Kir, Kirromycin, *Streptomyces collinus*; Lkc, Lankacidin, *Str. rochei* 7434AN; LLYN, *Leptolyngbya* sp. PCC7375 cluster; Lnm, Leinamycin, *Str. atroolivaceus*; Mgs, Migrastatin, *Str. platensis*; Mis, Misakinolide, der Endosymbiont des Schwamms *Theonella* sp.; Mmp, Mupirocin, *P. fluorescens* NCIMB 10586; Mln, Macrolactin, *Bac. amyloliquefaciens* FZB 42; Onn, Onnamid, der Endosymbiont des Schwamms *T. swinhoei*; Ped, Pederin, der *Pseudomonas* sp. Endosymbiont des *Paederus fuscipes* Käfers; PksX, Bacillaen, *Bac. subtilis*; PPOL, *Paenibacillus polymyxa* E681 Cluster; Psy, Psymberin, der Endosymbiont des Schwamms *Psammocinia* aff. *bulbosa*; Rhi, rhizoxin, *Burk. rhizoxinica*; SG, *Str. griseus* NPRC 13350 Cluster; SGRF, *Str. riseoflavus* Tü4000 Cluster; Tai, Thailandamid, *Bac. thailandensis*; Vir, Virginiamycin M, *Str. virginiae*.

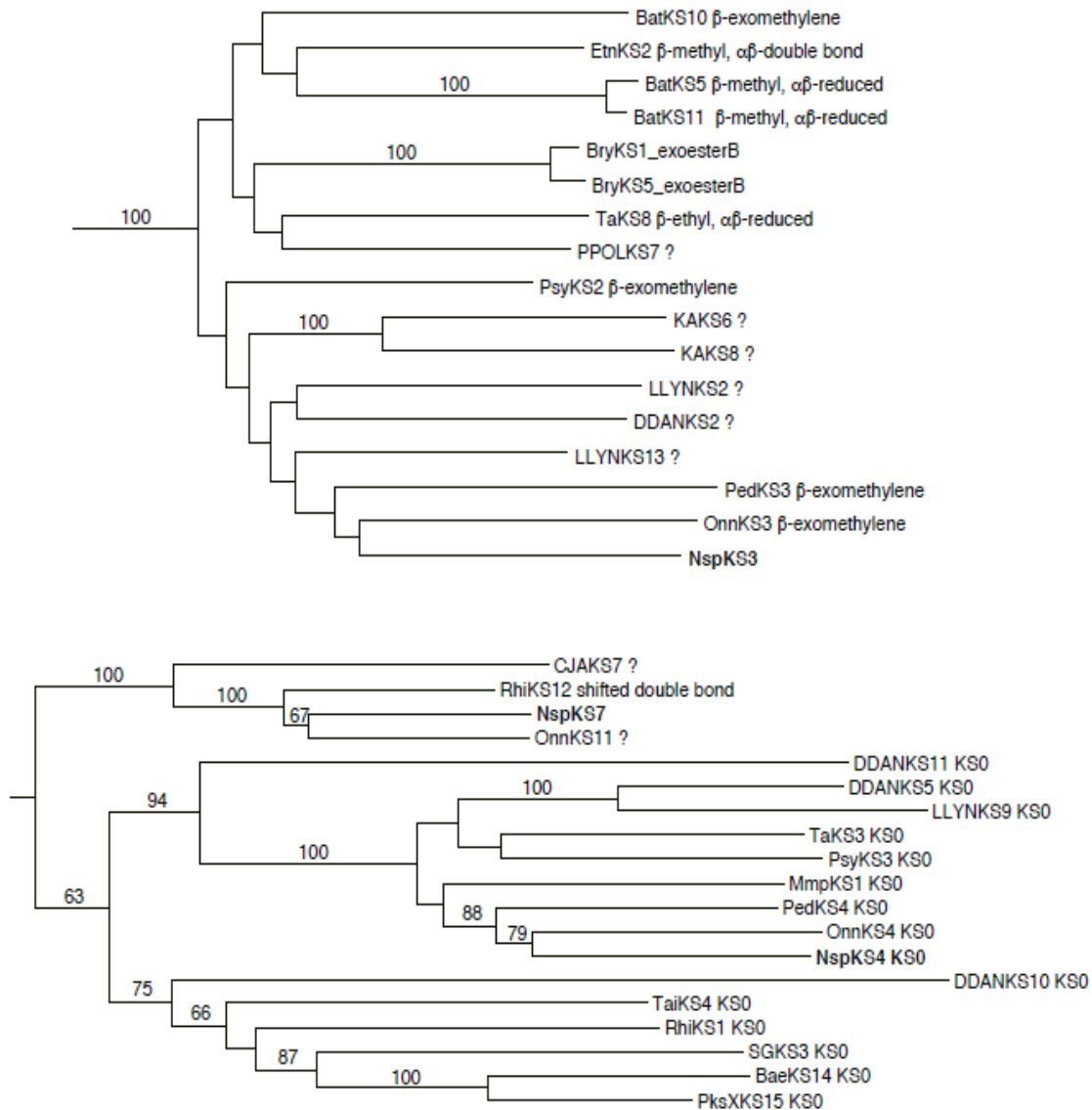


Abb. 77: Kladogramm der *nsp* KS3, 4 und 7 enthaltenden Klade. Abkürzungen sind der

Abb. 76 zu entnehmen.

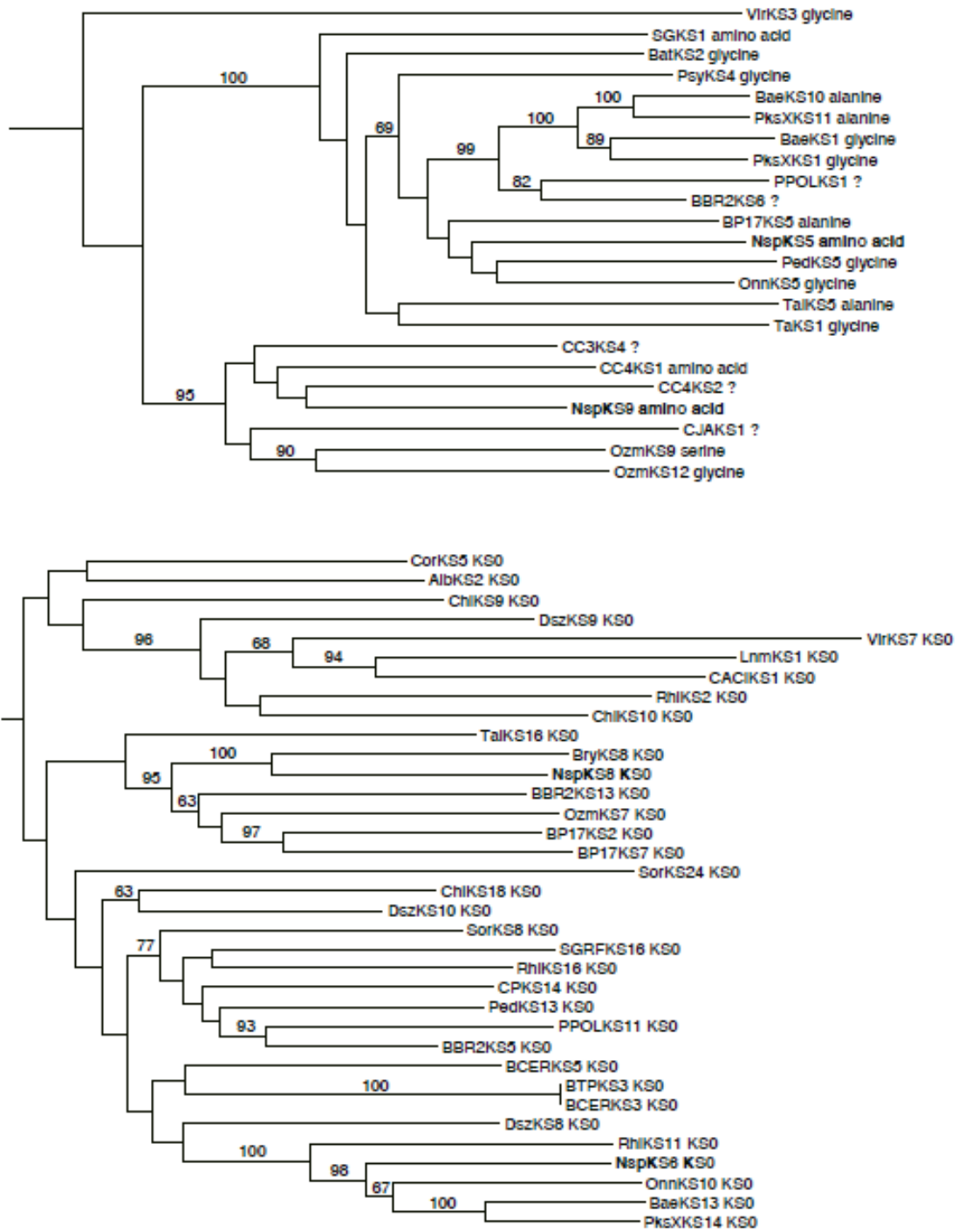


Abb. 78: Kladogramm der *nsp* KS5, 6, 8 und 9 enthaltenden Klade. Abkürzungen sind der Abb. 76 zu entnehmen.

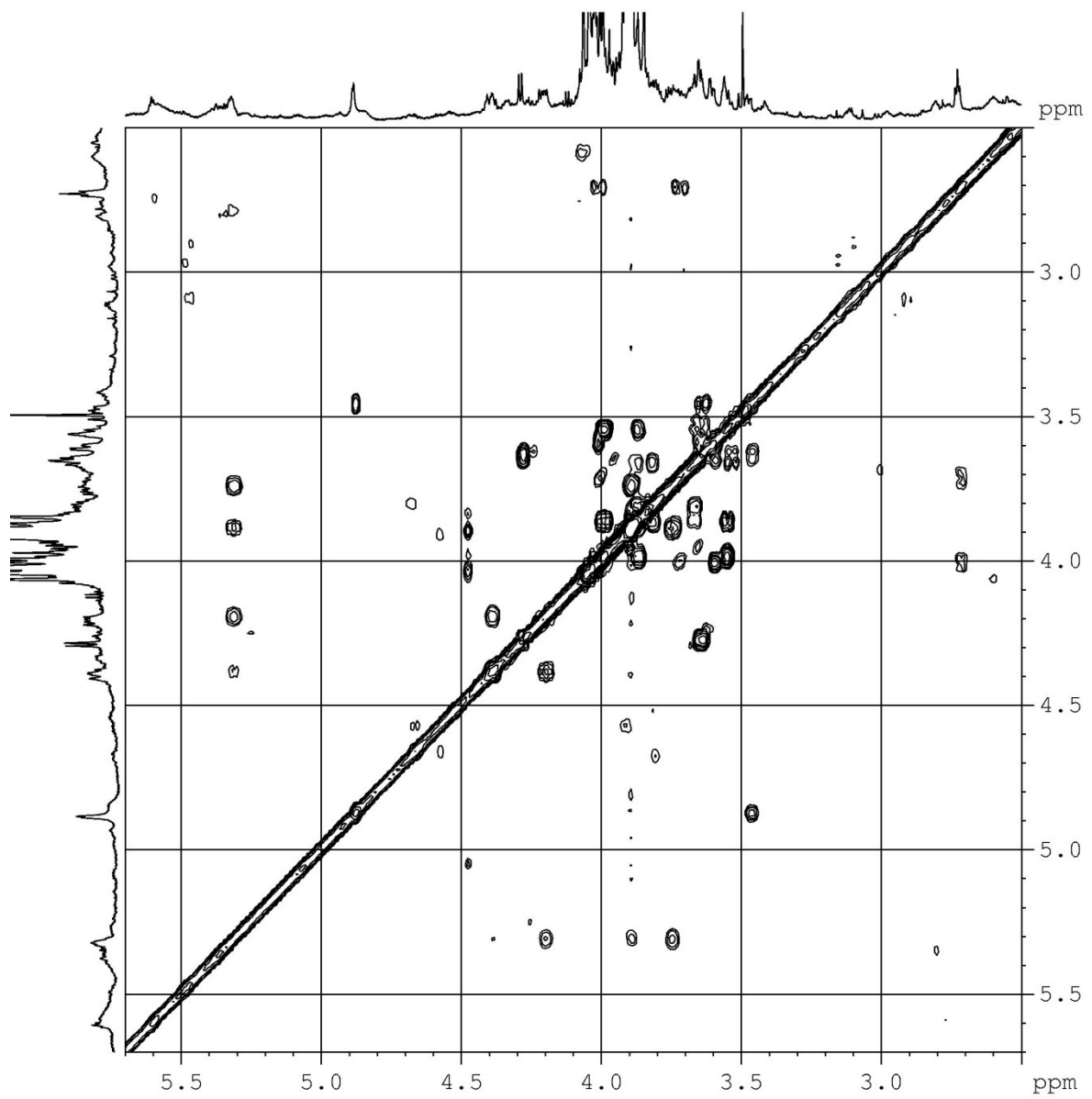


Abb. 79: COSY-NMR-Spektrum des in der Flechte gefundenen MGDG

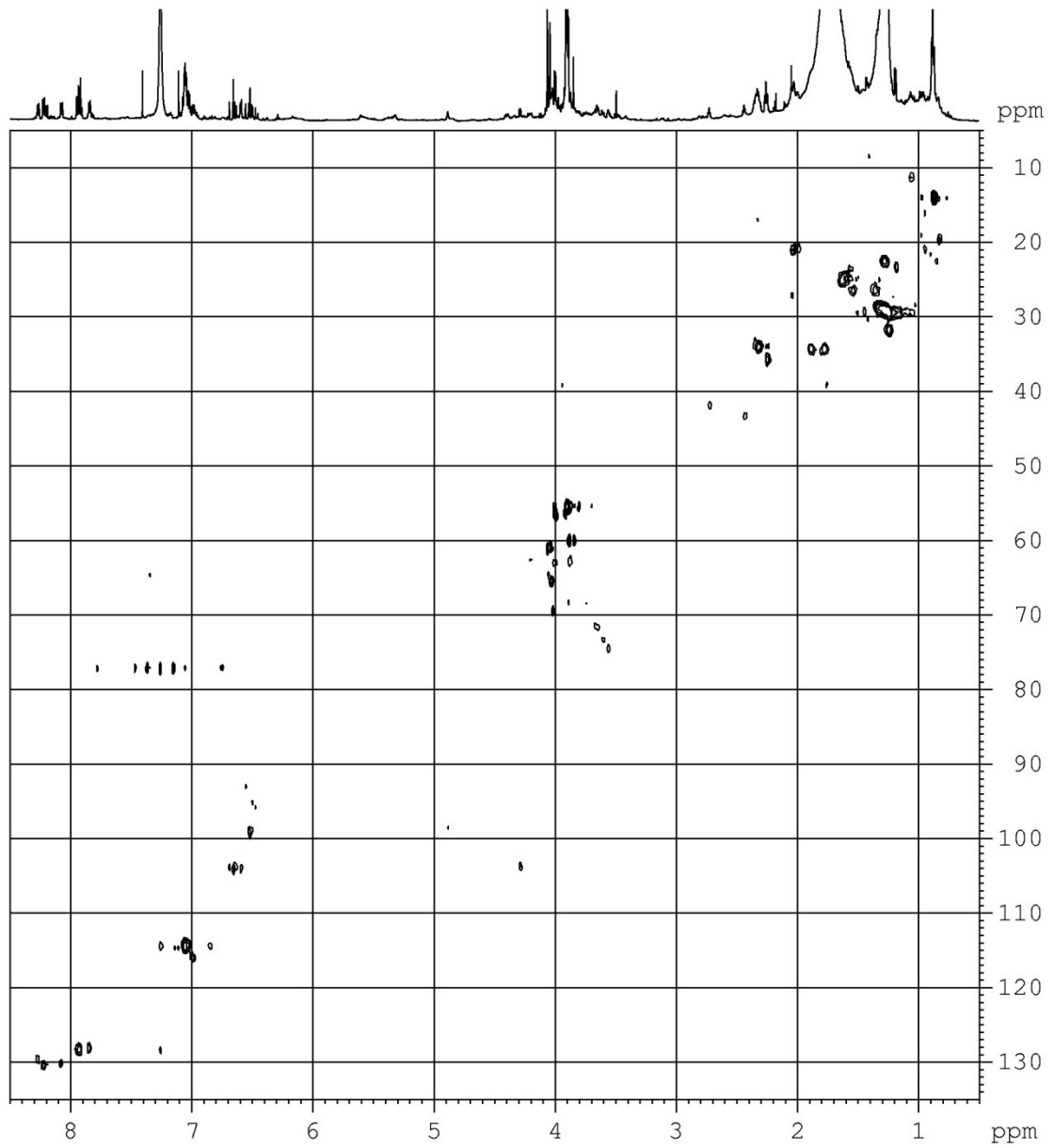


Abb. 80: gHSQC-NMR-Spektrum des in der Flechte gefundenen MGDG

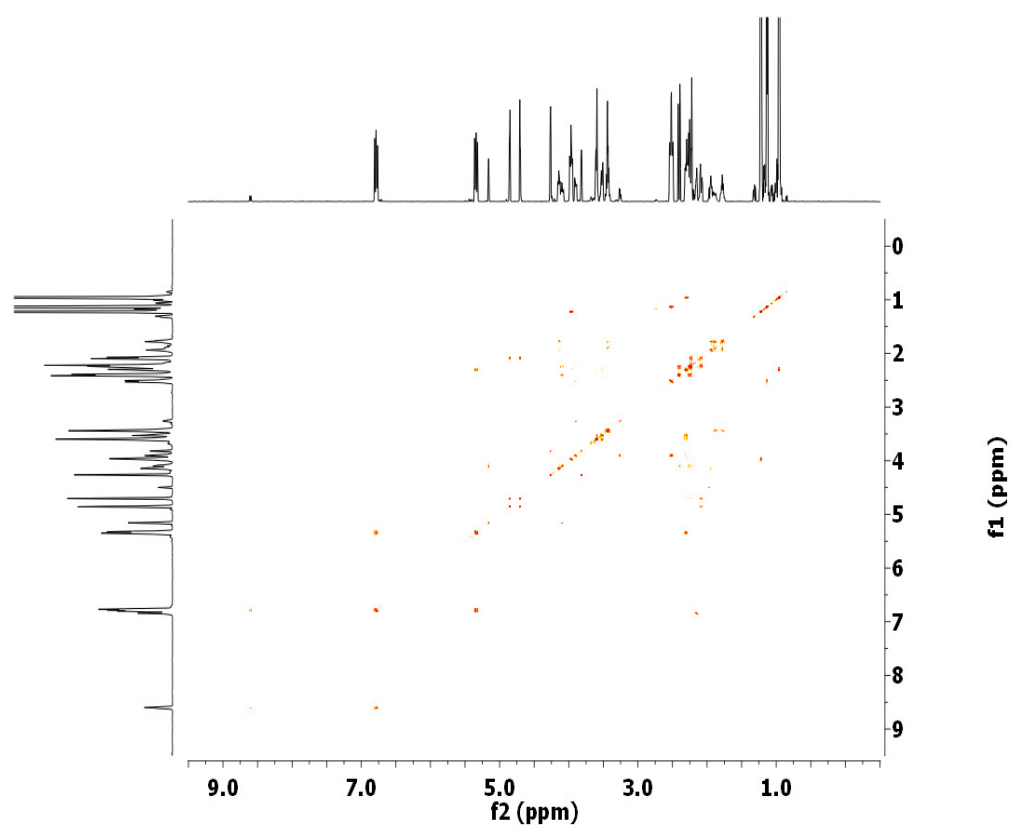


Abb. 81: Mit HPLC-SPE-NMR gemessenes COSY-Spektrum des Nosperins

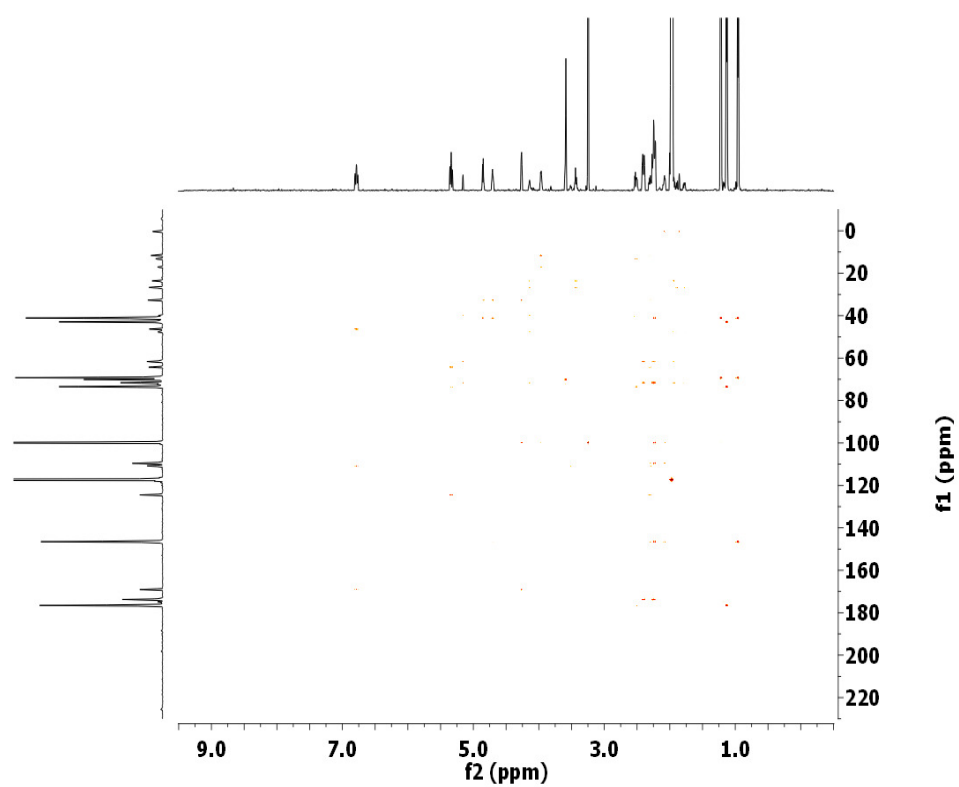


Abb. 82: Mit HPLC-SPE-NMR gemessenes HMBC-Spektrum des Nosperins

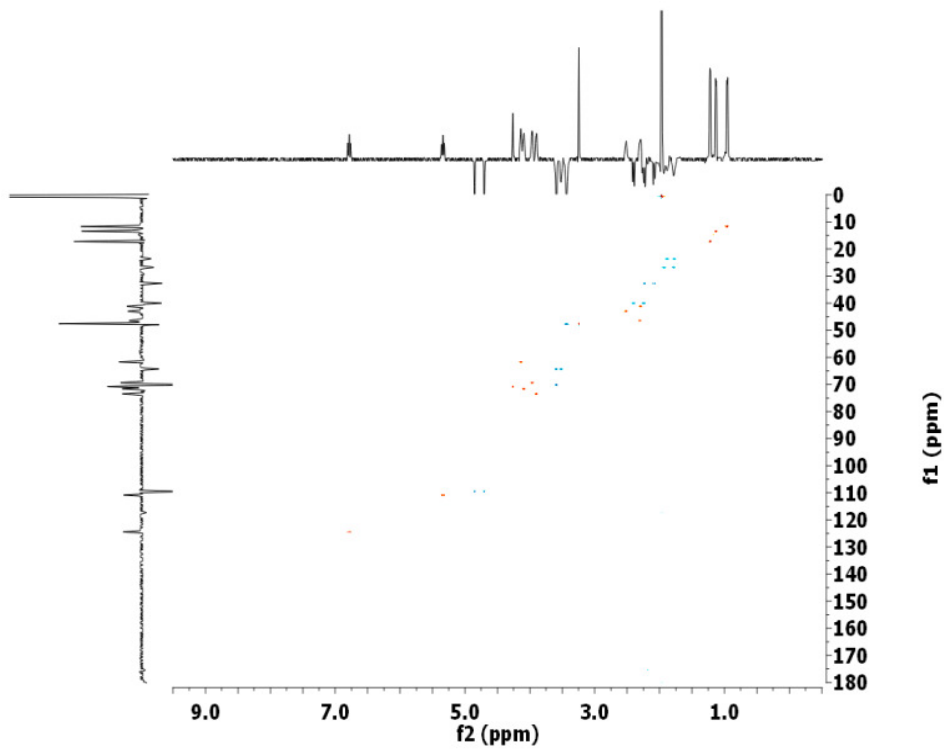


Abb. 83: Mit HPLC-SPE-NMR gemessenes HSQC-Spektrum des Nosperins

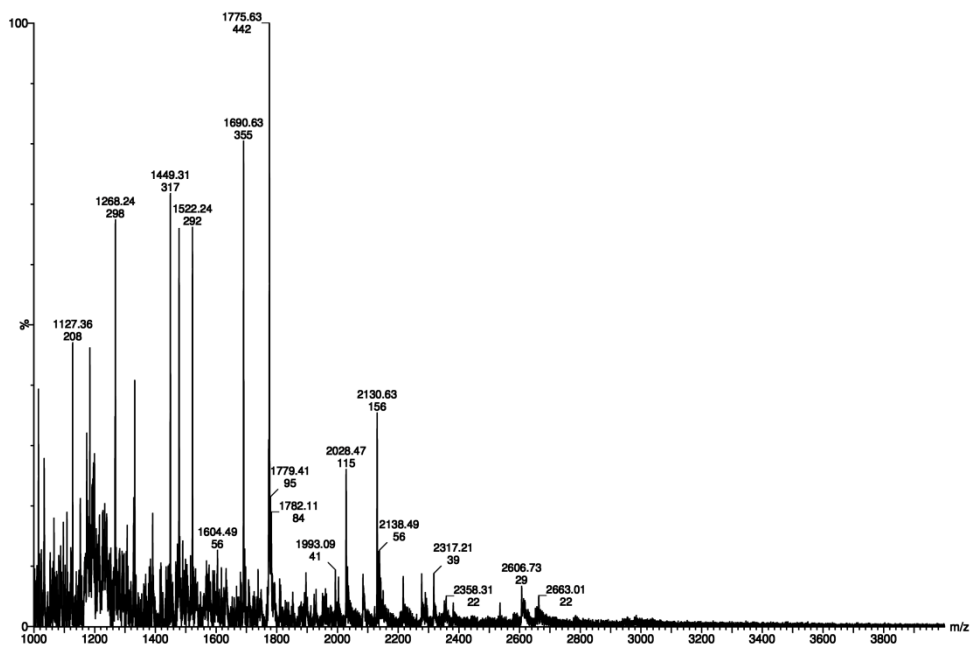


Abb. 84: Massenspektrum der KS4-Domäne. Diese liegt hier in einem degradierten Zustand vor. Die theoretische Masse von 75143 Da konnte nicht detektiert werden.

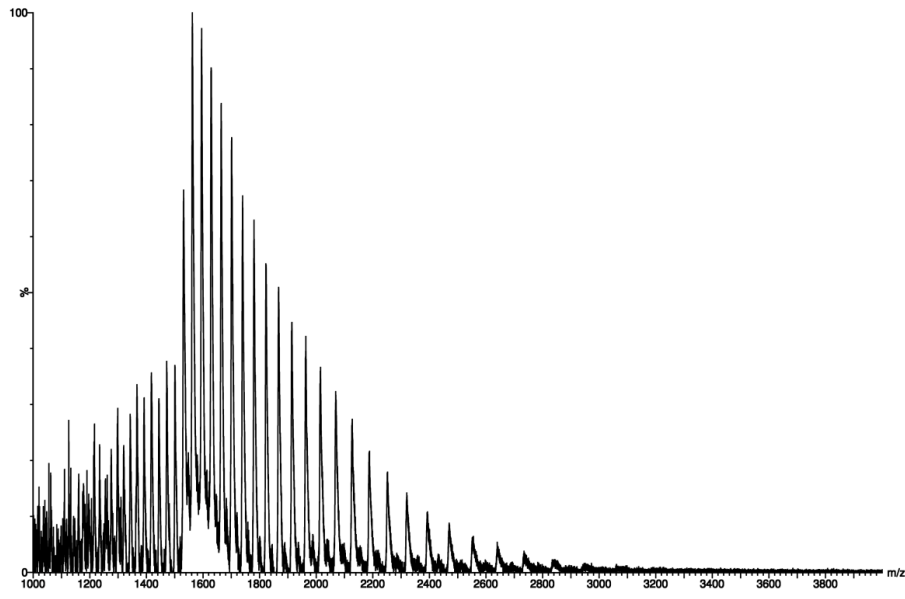


Abb. 85: Massenspektrum der KS6-Domäne

12. Publikationen

Veröffentlichungen:

- A. Kampa, A. N. Gagunashvili, T. A. M. Gulder, B. I. Morinaka, C. Daolio, M. Godejohann, V. P. W. Miao, J. Piel, Ó. S. Andrésón; Metagenomic natural product discovery in lichen provides evidence for a family of biosynthetic pathways in diverse symbioses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110* (33), E3129-E3137
- M. Jenner, S. Frank, A. Kampa, C. Kohlhaas, P. Pöplau, G. S. Briggs, J. Piel, N. J. Oldham; Substrate specificity in ketosynthase domains from *trans*-AT polyketide synthases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1143-1147
- C. Kohlhaas, M. Jenner, A. Kampa, G. S. Briggs, J. P. Afonso, J. Piel, N. J. Oldham; Amino acid-accepting ketosynthase domain from a *trans*-AT polyketide synthase exhibits high selectivity for predicted intermediate. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3212-3217
- C. Gay, G. Gay, A. J. Axelrod, M. Jenner, C. Kohlhaas, A. Kampa, B. Demeler, N. J. Oldham, J. Piel, A. Keatinge-Clay; A close look at a ketosynthase from a transacyltransferase modular polyketide synthase, *eingereicht*

Vorträge:

- Workshop SFB 624, 17.06.2010, Bad Honnef; A. Kampa: Erzeugung neuartiger Polyketidgerüste durch maßgeschneiderte Enzymtemplate.
- Doktorandenworkshop "Naturstoffe: Chemie, Biologie, Ökologie", 26.10.2012, Jena; A. Kampa, R. Ueoka: New polyketides from unexpected sources.

Poster:

- N. Gagunashvili, A. Kampa, C. Gurgui, V. Miao, J. Piel, Ó. S. Andrésón; *Discovery of trans-AT PKS gene clusters from a lichen metagenome*. Conference "Directing biosynthesis: discovery, evolution, function". Durham University, UK. 15.-17.09.2010
- M. Jenner, S. Frank, A. Kampa, C. Kohlhaas, J. Piel, N. J. Oldham; *Determining the specificity of ketosynthase domains from trans-AT polyketide synthases by*

electrospray ionisation mass spectrometry: tolerance and tunability. ASMS Annual Meeting. Vancouver. Mai 2012

- M. Jenner, S. Frank, A. Kampa, C. Kohlhaas, G. S. Briggs, J. Piel, N. J. Oldham; *Determining the specificity of ketosynthase domains from trans-AT polyketide synthases by electrospray ionisation mass spectrometry: tolerance and tunability*. Directing biosynthesis III. Nottingham. September 2012
- A. Kampa, A. N. Gagunashvili, C. Daolio, M. Godejohann, Ó. S. Andrésón, J. Piel; *Symbiotically privileged biosynthetic gene clusters of pederin family in lichen metagenomes*. International VAAM Workshop, "Biology and chemistry of antibiotic-producing bacteria and fungi". Braunschweig. 27.-29.11.2012
- C. Kohlhaas, A. Kampa, S. Frank, M. Jenner, N. Oldham, J. Piel; *Investigation of KS domains in trans-AT polyketide synthases*. International VAAM workshop, "Biology and chemistry of antibiotic-producing bacteria and fungi". Braunschweig. 27.-29.11.2012

13. 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 teilentworfen 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.

Annette Kampa

Köln, den