



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

HETEROLOGE EXPRESSION UND FUNKTIONELLE
CHARAKTERISIERUNG VON PUTATIVEN
PKS/NRPS-GENKLUSTERN IN
Bacillus subtilis

MASTERARBEIT

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

MASTER OF SCIENCE

angefertigt am
Institut für marine Biotechnologie

vorgelegt von
Lena Hiddemann

unter der wissenschaftlichen
Betreuung von:
Herrn Prof. Dr. K. Steffens
Herrn Prof. Dr. T. Schweder

Hochschule Neubrandenburg
Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften
Lebensmittel- und Bioprodukttechnologie

urn:ubn:de:gbv:519-thesis2012-0196-5

Erklärung zur Masterarbeit

Ich versichere, dass ich die anliegende Diplomarbeit mit dem Thema:

**“ Heterologe Expression und funktionelle Charakterisierung
putativer PKS / NRPS - Genkluster in *Bacillus subtilis* ”**

selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem Falle durch Angabe der Quelle, auch der Sekundärliteratur, als Entlehnung kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

1 Abstract

Two PKS / NRPS - gene clusters of the marine bacteria *Rhodopirellula baltica* were investigated. With the help of bioinformatics a functional characterisation of the genes RB11975 and RB6500 was performed. In the case of RB6500 it was possible to forecast the structure of the metabolite. The integration of the two genes was successful. In contrast a heterologous expression wasn't successful until now. Whilst the protein RB11975 was successfully detected, no metabolites could be determined in the extracts. The choice of *B. subtilis* as the expression host was confirmed by the presence of RB11975. In order to establish why heterologous expression failed, more investigations are needed.

Inhaltsverzeichnis

1 Abstract	V
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
2 Einleitung	1
2.1 Biogene Wirkstoffe	1
2.2 Stoffwechselwege	3
2.2.1 Polyketidsynthasen	3
2.2.2 Nichtribosomale Peptidsynthetasen	5
2.2.3 Hybride PKS / NRPS	8
2.2.4 Enzymaktivierung	9
2.3 Heterologe Expression	11
2.4 <i>Bacillus subtilis</i>	13
2.5 <i>Rhodopirellula baltica</i>	14
3 Aufgabenstellung	17
4 Material	19
4.1 Stämme	19
4.2 Plasmide	20
4.3 Oligonukleotide	20
4.4 Enzyme und Proteine	22
4.5 Kits und Fertiglösungen	22
4.6 Größenstandards	23
4.7 Antibiotika	23
4.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
4.9 Chemikalien und Lösungsmittel	25
4.10 Medien	26
4.10.1 Vollmedien	26
4.10.2 Definierte Medien	27
4.10.3 Festmedien	28
4.11 Puffer und Lösungen	28
4.11.1 Allgemeine Puffer	28

4.11.2	DNA-spezifische Puffer	29
4.11.3	RNA-spezifische Puffer	30
4.11.4	Proteingelfärbung	32
4.11.5	Membranproteinbestimmung-spezifische Puffer	32
4.12	<i>In silico</i> Werkzeuge und Datenbanken	34
4.12.1	Datenbanken und Webtools	34
4.12.2	Software	34
5	Methoden	35
5.1	Promotoren	35
5.2	Zellkultivierung	35
5.2.1	Stammhaltung	35
5.2.2	Allgemeine Kultivierung	36
5.2.3	Kultivierung der Expressionsstämme	36
5.3	Metabolitenbestimmung	38
5.4	Zellmanipulation	38
5.4.1	Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation	38
5.4.2	Transformation von DNA über natürliche Kompetenz	40
5.4.3	Plasmid-Screening auf Transformanten	40
5.4.4	Screening auf chromosomale Integration	41
5.5	Arbeiten mit DNA	41
5.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	41
5.5.2	Isolation von Plasmid-DNA	41
5.5.3	Isolation von chromosomaler DNA	42
5.5.4	Isolation von DNA aus Agarosegelen	42
5.5.5	PCR	42
5.5.6	Restriktion	44
5.5.7	Dephosphorylierung von DNA	44
5.5.8	Ligation mittels T4 DNA Ligase	44
5.5.9	SLIC- Sequence and Ligation Independent Cloning	45
5.5.10	Homologe Rekombination durch Red /ET-Klonierung	45
5.6	Arbeiten mit RNA aus <i>B. subtilis</i>	46
5.6.1	Probennahme	46
5.6.2	Zellaufschluss	46
5.6.3	RNA-Isolation	47
5.6.4	Nachweis spezifischer mRNA unter Nutzung des Slot Blots	48
5.7	Proteinaufschluss- und bestimmung	49
5.7.1	Gewinnung löslicher Proteine	49
5.7.2	Proteinbestimmung	50
5.7.3	Proteingel	50
5.8	Membranproteinbestimmung	50

5.8.1	Protokoll Membranproteinbestimmung	50
6	Ergebnisse	53
6.1	Bioinformatische Analyse	53
6.1.1	RB11975 Analyse	53
6.1.2	RB6500 Analyse	54
6.2	RB11975	57
6.2.1	Expressionsversuche von BsJK206	57
6.2.2	<i>sfp</i> - Knockout in BsJK206	60
6.2.3	Proteinbestimmung	61
6.3	RB6500	62
6.3.1	Integration in Teilschritten	62
6.3.2	Integration in einem Schritt	65
6.4	RB6499 und RB6502	67
6.4.1	Membranproteinbestimmung	67
6.4.2	Überprüfung der Cm-Resistenz	70
7	Diskussion	73
7.1	Bioinformatische Analyse	73
7.2	Heterologe Expression	73
7.2.1	RB11975	74
7.2.2	RB6500	76
7.3	RB6499 und RB6502	77
8	Zusammenfassung und Ausblick	79
9	Anhang	81
	Literaturverzeichnis	XXI

Abbildungsverzeichnis

2.1	<i>Erythromycin, Surfactin</i> und <i>Rapamycin</i>	3
2.2	Biosyntheseweg von Fettsäuren und Polyketiden	4
2.3	Biosynthese von NRPS	6
2.4	Biosynthese von Surfactin	7
2.5	Beispiele für PKS, NRPS und Hybride	8
2.6	Durch eine PPTase katalysierte Enzymaktivierung	9
2.7	Systeme zur Synthese von nichtribosomalen Peptiden	10
2.8	Stark vereinfachte Darstellung der Genexpression.	11
2.9	Bild von <i>Bacillus subtilis</i> Bakterien erzeugt von einem Rasterelektronenmikroskop	13
2.10	Elektronenmikroskopische Aufnahme des Meeresorganismus <i>Pirellula</i>	15
2.11	Lebenszyklus von <i>R. baltica</i>	16
6.1	Domänenvorhersage für RB11975.	54
6.2	Domänenvorhersage für RB6500.	55
6.3	Substratvorhersage für RB6500.	55
6.4	Phenylalanin, RB6500-Metabolit und Chloramphenicol	55
6.5	Transmembrane Strukturen von RB6499.	56
6.6	Transmembrane Strukturen von RB6502.	57
6.7	Wachstumskurven von BsJK29 und BsJK206.	58
6.8	Slot Blot von BsJK29 und BsJK206.	59
6.9	Proteingele von BsJK29 und BsJK206.	59
6.10	MS-Daten der Proteingelproben von BsJK206.	59
6.11	Proteingele von BsJK206 und BsJK211a.	61
6.12	Testrestriktionen von pJK202 und pJK203.	63
6.13	Colony-PCR von pJK207.	63
6.14	Testrestriktionen von pJK207 und pJK208.	65
6.15	Wachstumskurve von BsJK208 und BsJK210.	68
6.16	Slot Blot-Bilder von BsJK208 und BsJK210.	68
6.17	Wachstumskurve von BsJK41 und BsJK14.	69
6.18	Membranproteingel von BsJK41 und BsJK14.	70
6.19	Colony-PCRs von pJK232 und pJK233.	71
6.20	Testrestriktionen von pJK232 und pJK233.	72
9.1	Verwendete Marker	81

9.2	Expressionsplasmide zur Überprüfung der Cm - Resistenz.	82
9.3	Vektoren zum Bau des Expressionsplasmids pJK215 (<i>RB6500</i> -Gen) über Red/ET-Klonierung.	82
9.4	Integrative Vektoren	83
9.5	Bioinformatische Analyse des RB11975-Gens.	86
9.6	Bioinformatische Analyse des RB6500-Gens.	88

Tabellenverzeichnis

2.1	Wirkstoffe einiger Meeresorganismen	2
2.2	Generelle Eigenschaften des <i>B. subtilis</i> - Genoms	14
2.3	Generelle Eigenschaften des <i>R. baltica</i> - Genoms	15
6.1	PCR für pJK235.	60
6.2	Testrestriktion pJK235.	60
6.3	PCRs für pJK202, pJK203, pJK207 und pJK208.	64
6.4	Testrestriktionen von pJK202, pJK203, pJK207 und pJK208.	64
6.5	PCRs für pJK213 und pJK21.	66
6.6	Testrestriktionen pJK207 und pJK208.	66
6.7	Übersicht über das Vorliegen von <i>srfA</i> und <i>sfp</i> in den verschiedenen Ex- pressionsstämmen.	67
6.8	Durch Sequenzierung überprüfte Bereiche und der gewählte Dienstleister .	69
6.9	Cm - Resistenz - Überprüfung: <i>Taq</i> -PCRs mit anschließender Restriktion . .	71
6.10	Cm - Resistenz - Überprüfung: Restriktionen	71
6.11	Cm - Resistenz - Überprüfung: Ligationen	72
9.1	Ausgewählte Hits der BLASTX-Suche.	84

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

A	Adenylierungsdomäne
A.bidest.	doppelt destilliertes Wasser
A.dest.	destilliertes Wasser
AB	Antibiotikum
ABC-Transporter	Transporter mit ATP-bindender Kasette
ACP	Acyl-Carrier-Protein
Ad	Auffüllen auf
AmyE	α -Amylase aus <i>B. subtilis</i>
AS	Aminosäure
AT	Acyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BUWAL	Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Bern
°C	Grad Celsius
C	Kondensationsdomäne
CAA	Casaminoacids
Cy	Zyklisierungsdomäne
CYC	Zyklase
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DEBS	6-Deoxyerythronolid-B-Synthase
DH	Dehydratase
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dps	Doxorubicin-Polyketidsynthase
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eppi	Mikroreaktionsgefäß
ER	Enoylreduktase

EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fab	antigenbindendes Fragment
FAS	Fettsäuresynthase
g	Gramm
GRAS	Generally Recognized As Safe
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
<i>in silico</i>	mittels Computer
<i>in vitro</i>	im Reaktionsgefäß
<i>in vivo</i>	in der lebenden Zelle
Jh.	Jahrhundert
k.A.	keine Angaben
Kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
LB	Luria Bertani
M	molar, mol/l
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar, mmol/l
MOPS	3-(N-Morpholin)Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
<i>M. xanthus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>
N	Normal
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCBI	National Centers for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMEt	N-Methylierungsdomäne
NRP	Nichtribosomales Peptid
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
OD _x	Optische Dichte bei Wellenlänge x nm
ORF	Offener Leserahmen (<i>Open Reading Frame</i>)

p.a.	<i>per analysis</i> ; für die Analyse
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PK	Polyketid
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Phosphopantethein
PPase	Phosphopantetheinyltransferase
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RES	Restriktionsendonukleasen-Schnittstelle
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SL	Stammlösung
T	Thiolationsdomäne
TE	Thioesterase
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
tRNA	transfer RNA
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volumen
VT	Volumenteile

2 Einleitung

2.1 Biogene Wirkstoffe

Es sind nicht nur Weiterentwicklungen in der Medizin und der damit verbundene Anreiz neuartige Medikamente zu entwickeln, sondern auch die immer häufiger auftretende Problematik der Resistenzbildung von Keimen gegenüber Antibiotika, die es notwendig machen neue Wirkstoffe aufzuspüren und zu erforschen. Natürlich bleiben dabei wirtschaftliche Aspekte nicht außen vor (Gaitatzis, 2004). Will man als Produzent von Pharmazeutika oder auch Kosmetika am Markt Bestand haben, muss man immer effektivere und sogleich attraktivere Produkte etablieren. Beim Gang durch die Drogerieabteilung lässt sich leicht feststellen, dass Meersalz, Algen und Co. beliebte Zusätze in Kosmetika sind, die beim Kunden Anklang finden und die ein oder andere Wirkung versprechen. Nicht nur aufgrund von marketingstrategischen Zusätzen und dem immer anspruchsvoller werdenden Verbraucher, welcher durch Neuerungen geködert werden muss, sondern auch aus den bereits erwähnten medizinisch / pharmazeutischen Gründen erscheint die Suche nach neuen Wirkstoffen essentiell zu sein. Hier kommt die Wirkstoffforschung ins Spiel. Um keine Chance neue Wirkstoffe zu entdecken ungenutzt zu lassen, bleibt so gut wie kein Lebensraum von der Suche unberührt. Ein erfolgsversprechender Ort der Suche ist die marine Umgebung. Um zu analysieren welches genetische Potenzial in den Meeren dieser Welt steckt, werden Metagenomanalysen durchgeführt, das heißt, die DNA wird direkt aus der entsprechenden Quelle isoliert und sequenziert. Der große Vorteil daran ist, dass der Sequenzierung keine Kultivierung voran gehen muss, welche aufwendig ist und sich oftmals als schwierig bis unmöglich darstellt. Durch diese Form der Analyse konnten bereits genauere Erkenntnisse, über das sich in den Ozeanen befindliche genetische Material, gewonnen werden. So gelang es beispielsweise Craig Venter mittels Shotgun Sequenzierung von Wasserproben ca. eine Milliarde Basen zu erhalten und diese zu analysieren (Venter et al., 2004). Die Metagenomik verschafft uns weitreichende Erkenntnisse, denn trotz des wirtschaftlichen Interesses an potentiell Genmaterial, steht bisher die medizinische und biotechnologische Forschung im Vordergrund. Doch was können wir damit anfangen, ist die Genomanalyse erst einmal abgeschlossen? Hat man es geschafft die Metagenomfragmente zu einem größeren Ganzen zusammenzufassen und dieses einem gut erforschten Organismus zuzuordnen, lassen sich Einflüsse des Standorts auf den Organismus ableiten. (Glöckner, 2006) Beispiele solcher Zusammenhänge sind in Kapitel 2.5 (*Rhodopirellula baltica*) zu finden.

Blickend auf das Ziel neue Wirkstoffe zu entdecken, schließen sich weitere Schritte an. Vorausgesetzt das Genom eines bekannten Organismus ist entschlüsselt, kann man mit Hilfe

mehrerer Tools Vorhersagen hinsichtlich verschiedener Parameter treffen. Allerhand Wirkstoffe gehören den gleichen Gruppen an, wie beispielsweise den Polyketiden (PK) oder nichtribosomalen Peptiden (NRP). Betrachtet man die Enzyme, welche die PK oder NRP bilden und die dafür codierenden Gene, lassen sich große Ähnlichkeiten feststellen. Mit Hilfe der erwähnten Internettools lassen sich Vorhersagen der zu erwartenden Proteine mittels Analyse der offenen Leserahmen (*open reading frames*, ORF) treffen. Über große Datenbanken, wie der des „National Centers for Biotechnology Information“ (NCBI¹), kann man nach konservierten Domänen suchen (BLAST) und einen Abgleich mit bereits bekannten Strukturen durchführen lassen. (Kumpfmüller, 2008) Werden bestimmte Genabschnitte (Kluster) als PK - Synthasen (PKS, Polyketidsynthasen) oder NRP - Synthetasen (NRPS, Nichtribosomale Peptidsynthetasen) beschrieben, können diese heterolog in einen gut genetisch veränderbaren Wirt exprimiert werden. Durch die heterologe Expression (siehe Kapitel 2.3, Heterologe Expression) umgeht man das Problem der Kultivierung mariner Organismen, die sich oftmals als nicht realisierbar erweist.. Gelingt die Expression des Genklusters in dem Wirt, kann der entstandene Metabolit isoliert und näher untersucht werden. Im Idealfall endet der Prozess der Wirkstoffforschung in der biotechnologischen Produktion und hat somit auch einen wirtschaftlichen Nutzen. Einige Wirkstoffe, die bereits aus Meeresorganismen gewonnen werden konnten, sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1 Wirkstoffe einiger Meeresorganismen, entnommen aus Zeeck et al. (2001)

Wirkstoff	Herkunft	Indikation
Aplidin	Manteltier: <i>Aplidium albicans</i>	Antitumor
Bryostatin 1	Moostierchen: <i>Bugula neritina</i>	Antitumor
Conotoxin MVIIA	Kegelschnecke: <i>Conus magus</i>	Analgetisch
Cryptophycine	Cyanobakterium: <i>Nostoc</i> sp.	Antitumor
Didemnin B	Manteltier: <i>Trichidemnum solidum</i>	Antitumor, antiviral, immunsuppressiv
Discodermolid	Schwamm: <i>Discodermia kiiensis</i>	Immunsuppressiv, zytotoxisch
Dolastatin 10	Seehase: <i>Dolabella auricularia</i>	Antitumor
ET-743	Manteltier: <i>Ecteinascidia turbinata</i>	Antitumor
Eleutherobin	Lederkoralle: <i>Eleutherobia albiflora</i>	Zytotoxisch
Halichondrin B	Schwamm: <i>Halichondria okadae</i>	Antitumor
Halomon	Rotalge: <i>Portieria hornemannii</i>	Zytotoxisch
Kahalalid F	Weichtier: <i>Elysia rubefescens</i>	Antitumor
Manoalid	Schwamm: <i>Luffarellia variabilis</i>	Entzündungshemmend
Microcolin A	Cyanobakterium: <i>Lyngba majuscula</i>	Zytotoxisch
Pseudopterosin B	Koralle: <i>Pseudopterogorgia bipinata</i>	Entzündungshemmend, analgetisch

¹<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

2.2 Stoffwechselwege

NRPS, PKS und Hybride aus beiden sind von großem Interesse, denn sie können eine Vielzahl von therapeutischen Wirkstoffen produzieren, haben großes Potenzial neuartige Verbindungen industriell herzustellen und sind die größten bekannten Enzyme. Die vorhergesagte Masse bekannter Enzymkomplexe kann bis zu fünf Megadalton (MDa) betragen, was Ribosomen klein erscheinen lässt (ca. 2,6 MDa). (Straight et al., 2007) Über die biochemische Charakterisierung dieser Kluster und deren Metabolite, liegt bereits eine große Zahl an wissenschaftlichen Studien vor, jedoch ist die Evolution dieser Enzymsysteme weitestgehend unbekannt. (Jenke-Kodama, 2007) Im Folgenden sollen die Funktionsweisen von NRPS, PKS und deren Hybriden erklärt werden sowie deutlich gemacht werden, welche Diversität an potentiell therapeutisch relevanten Stoffen (Abbildung 2.1) aus der Erforschung dieser Stoffwechselwege hervorgehen kann.

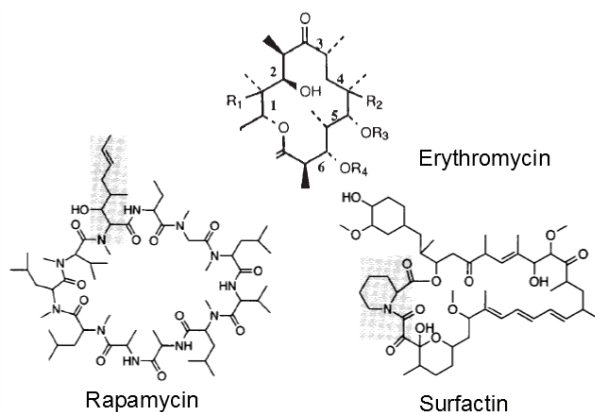


Abbildung 2.1 Beispiele von Vertretern unterschiedlicher Klassen. *Erythromycin* als Beispiel der PKS, *Surfactin* als NRPS und *Rapamycin* als Hybrid beider Klassen. Entnommen und modifiziert aus Du et al. (2001) und Cortes et al. (1990)

2.2.1 Polyketidsynthasen

Polyketide sind komplexe Moleküle, welche aus Carbonsäuren gebildet werden und somit Ketide (C_2) als ihre Grundbausteine betrachtet werden können. Unter der wachsenden Zahl an bekannten Polyketiden befinden sich viele pharmakologisch aktive Substanzen mit großer struktureller Diversität. Sie werden durch uniforme Prozesse synthetisiert, welche der Biosynthese von Fettsäuren in gewisser Weise gleichen (Abbildung 2.2). Die Polyketid synthetisierenden Enzyme können in Typ I und Typ II Polyketidsynthasen unterschieden werden, wobei sich die PKS-I weiter in fungal und bakteriell unterscheiden lassen. Ein typisches PKS-Modul besteht mindestens aus einer Acyltransferasedomäne (AT), zur Auswahl und dem Transfer der Extendereinheit, einem Acyl-Carrier-Protein (ACP), zum

Laden der Extendereinheit und einer Ketoacylsynthasedomäne (KS), zuständig dafür das entstandene Produkt durch decarboxylierende Acylierung mit einer Verlängerungseinheit zu verknüpfen (Du et al., 2001). Das ACP nimmt in diesem Prozess die Rolle eines flexiblen Arms ein, der das Monomer an die KS-Domäne bzw. die wachsende Kette von einem Modul an das nächste reicht (Perham, 2000). Neben den bereits kurz beschriebenen obligaten Domänen gibt es auch fakultative. Beispiele dafür sind die Ketoreduktasedomäne (KR), welche Verbindungen erzeugen, die eine Hydroxylgruppe enthalten, Dehydratasedomäne (DH), zur Bildung von Verbindungen mit ungesättigten Doppelbindungen, oder Enoylreduktasen (ER), dessen Produkte vollständig reduzierte Kohlenstoffe vorweisen (Khosla et al., 1999).

PKSI sind modulare Megasyntasen (oftmals 200-2000 kDa), welche zum Sekundärstoffwechsel gehören. Die bakteriellen und nicht-iterativ arbeitenden PKS-I zeichnen sich dadurch aus, dass jeweils ein Modul für den Einbau eines Monomers in die wachsende Kohlenstoffkette verantwortlich ist (Jenke-Kodama, 2007). Der Prozess läuft wie am Fließband ab, denn mehrere Module sind während der Synthese hintereinander geschaltet. Die fungalen und iterativ arbeitenden PKS-I können Module mehrfach nutzen und somit den Einbau von Monomeren in das wachsende Polyketid wiederholen. Bei PKS-I ergibt sich, aufgrund des Synthesemechanismus, die Struktur des Polyketid-Rückgrats direkt aus der Abfolge und der Domänenzusammensetzung der Module innerhalb des PKS-Komplexes. Die Bezeichnung für diesen Zusammenhang nennt man Colinearitätsregel. (Jenke-Kodama, 2007) Produkte der PKS-I sind meist reduzierte Polyketide wie Laktone oder freie Säuren. Ein Vertreter dieser Gruppe ist *Erythromycin* (Abbildung 2.1).

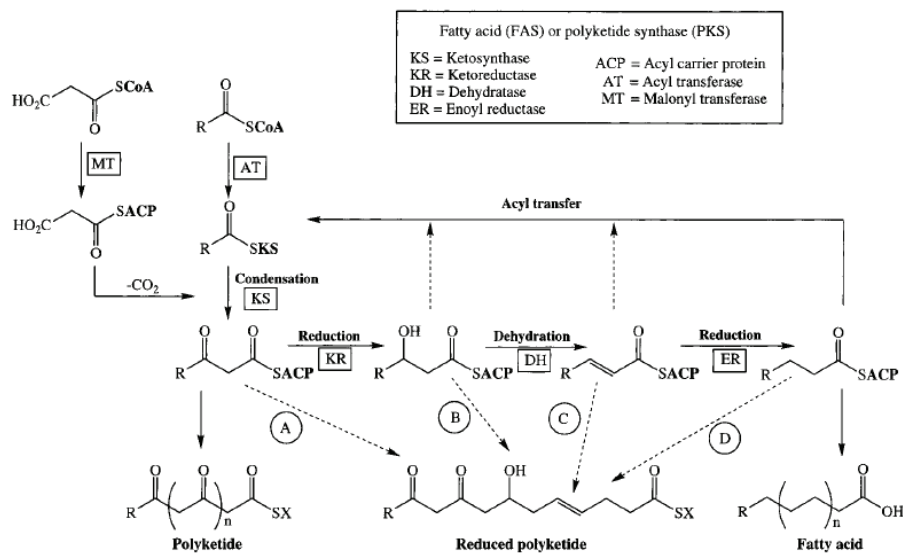


Abbildung 2.2 Entnommen aus Hopwood (1997). Dargestellt ist der Biosyntheseweg von Fettsäuren und Polyketiden.

PKS-II werden auch aromatische PKS genannt, da sie aromatische Verbindungen bilden. Die Synthese der PKS-II kann iterativ erfolgen, sprich sie nutzen dieselbe Domäne mehrfach. Das hat zur Folge, dass mehrere Proteine benötigt werden, was das Vorhandensein mehrerer open reading frames, kurz ORF, impliziert. PKS-II sind demzufolge Aggregate aus kleineren Polypeptiden, von denen jedes seine eigene katalytische Aktivität besitzt. Sie wurden bisher ausschließlich in einer Unterordnung der Actinobakterien gefunden, den *Streptomyceten* (Staunton and Weissman, 2001). Ein Produkt dieser Gruppe ist das Polyketid Aktinorhodin.

Es bleibt anzumerken, dass die strikte Gruppeneinteilung der PKS und die Aufteilung zu den jeweiligen Organismen nicht möglich ist (Müller, 2004) und somit auch die Colinearitätsregel nicht allgemein angewendet werden kann. Forschungen haben gezeigt, dass fungale PKS auch in Bakterien zu finden sind (Gaisser et al., 1997) und aromatische Verbindungen nicht allein von PKS-II synthetisiert werden können (Gaitatzis et al., 2002). Bei der Polyketidsynthese wird die Verlängerung der Kohlenstoffkette durch die Kondensation der Startereinheit mit der Extendereinheit initiiert. Starter- und Extendereinheit liegen im Organismus in Form von Coenzym A-Thioester vor. PKS nutzen meistens Acetyl-CoA oder Propionyl-CoA als Starter- und Malonyl-CoA oder Methylmalonyl-CoA als Extendereinheit. Allerdings können auch andere CoA-Derivate als Starter- und Extendereinheit genutzt werden. Auf diesem Weg synthetisierte Polyketide weisen eine große Diversität auf, was sich aus dem als Starter und zur Kettenverlängerung genutztem Substrat und den möglichen Umwandlungsreaktionen der einzelnen Domänen ergibt.

2.2.2 Nichtribosomale Peptidsynthetasen

Spricht man von nichtribosomalen Peptiden (NRP), sind damit meist lineare, zyklische oder verzweigte Peptide gemeint, welche oftmals aus weniger als 20 Aminosäureresten bestehen und gemeinhin eine Veränderung durch Acylierung, Glykosylierung, Epimerisierung, Heterocyclisierung oder N-Methylierung des Amidstickstoffs erfahren haben. Ein weiteres charakteristisches Merkmal von nichtribosomal hergestellten Peptiden ist das Auftreten nichtproteinogener Aminosäuren. (Jenke-Kodama, 2007) Betrachtet man die strukturelle Diversität der nichtribosomalen Peptide, erklärt sich auch deren breites Wirkspektrum. Allerhand NRP haben klinische Relevanz, wie beispielsweise Penicillin (Antibiotikum), Cyclosporin A (Immunsuppressivum) oder Vancomycin (Antibiotikum). Aber auch das biotenside Surfactin (2.1) lässt sich den NRP zuordnen. Gebildet werden die NRP durch nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS). Der Begriff Synthetasen ist bereits etwas veraltet, heute würde man Ligasen sagen, da ihr Charakteristikum der ATP-Verbrauch ist. NRPS sind modular aufgebaut und ähneln in ihrem Syntheseprinzip den modularen PKS-I (Kapitel 2.2.1), wobei auch sie als Megasyntasen bezeichnet werden. Jedes Modul stellt einen funktionellen Baustein für den Einbau und die Modifikation eines Aminosäurerestes dar. Die Reihenfolge und die Anzahl der Module innerhalb eines NRPS-Proteins bestimmt die Sequenz und die Anzahl der im resultierenden Peptid vor-

liegenden Aminosäuren. (Du et al., 2001) NRPS kommen in Bakterien und Pilzen vor. Während in Pflanzen noch keinerlei NRPS-ähnliche Enzyme beschrieben worden sind, gibt es Hinweise darauf, dass sie auch in höheren Eukaryoten auftreten, wenngleich in einer im Vergleich zu Bakterien und Pilzen stark reduzierten Form. (Kasahara and Kato, 2003) (Richardt et al., 2003)

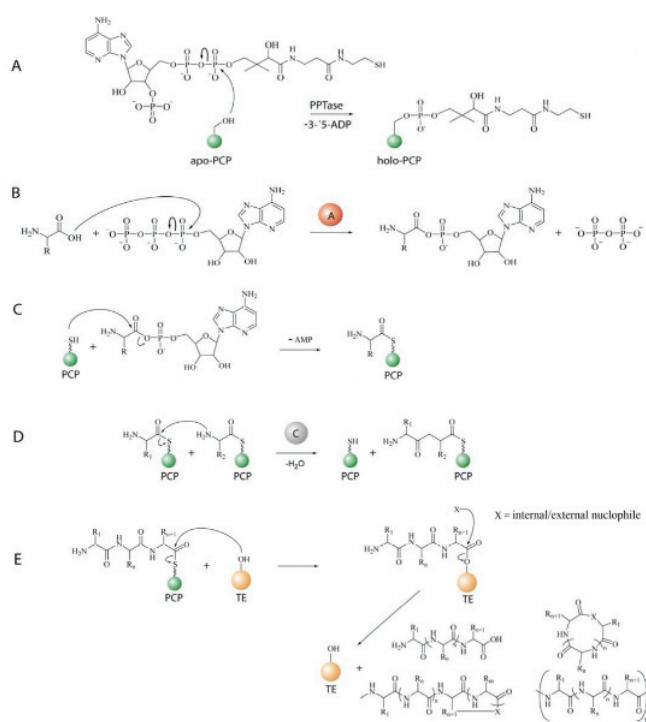


Abbildung 2.3 Dargestellt ist die Abfolge (A-E) der Biosynthese von NRPS, welche im Text erläutert wurde. Entnommen aus Chiochini et al. (2006). PPTase = Phosphopantetheinyltransferase; PCP = Peptidyl-Carrier-Protein; apo-PCP = apo-Form der PCP-Domäne; holo-PCP = holo-Form der PCP-Domäne; A = Adenylierungsdomäne; C = Kondensationsdomäne; TE = Terminationsdomäne

Ein typisches NRPS-Modul besteht mindestens aus einer Adenylierungsdomäne (A), welche der Aktivierung der Aminosäuren dient, einer Thiolierungsdomäne (T), auch bekannt als Peptidyl-Carrier-Protein (PCP), zur Thioveresterung der aktivierten Aminosäure, und einer Kondensationsdomäne (C), zur Übertragung der Aminosäuren an die wachsende Peptidkette. Weitere Domänen zur Modifikation sind beispielsweise die Epimerisierungsdomäne (E) zur Umwandlung von der L- zur D-Konfiguration einer Aminosäure, die Methylierungsdomäne (MT) zur Stickstoff-Methylierung des amidischen Stickstoffs, eine Cyclisierungsdomäne (Cy) zur Umformung der heterozyklischen Ringe, die Reduktionsdomäne (R) zur reduktiven Freisetzung eines Aldehydprodukts oder auch die Oxidati-

onsdomäne (Ox) zur α -Hydroxylierung der verarbeiteten Aminosäuren. (Du et al., 2001) Ähnlich den modularen PKS-I gilt auch für viele NRPS die Colinearitätsregel, wonach die Abfolge der Module innerhalb des NRPS die Reihenfolge der Aminosäurereste im Peptid angibt. Wie wir bereits wissen, ist dies keine absolute Gesetzmäßigkeit und sollte somit mit Vorsicht angewandt werden. In Bakterien sind die einzelnen Module meist auf mehrere Proteine verteilt, welche sich zu einem Multienzymkomplex zusammenlagern. Die Anzahl der Module pro Protein ist nicht festgelegt und kann daher variieren. (Jenke-Kodama, 2007)

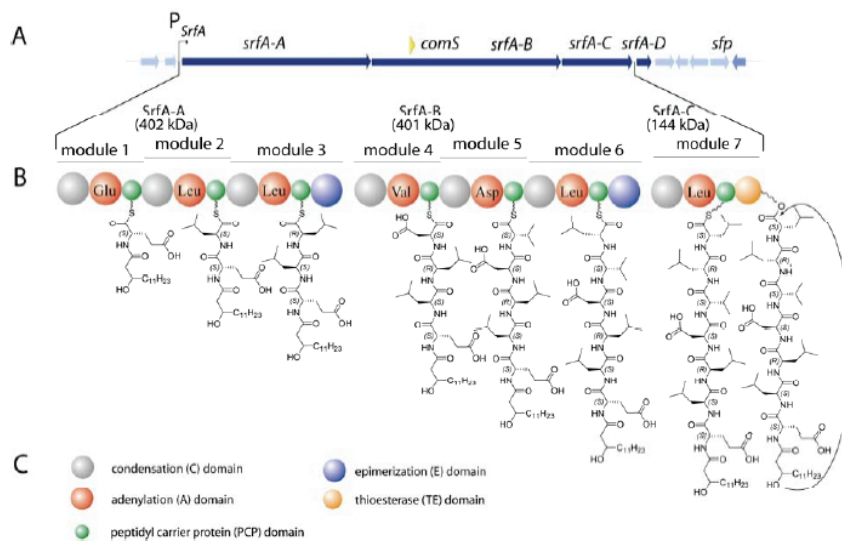


Abbildung 2.4 Dargestellt ist die Biosynthese von Surfactin, welche im Text etwas näher erläutert ist. (A) Genkluster, welches für die Biosynthese von Surfactin kodiert. (B) Die drei NRPS (SrfA - A, SrfA - B und SrfA - C) sind insgesamt aus 7 Modulen aufgebaut. (C) Legende zur Erklärung der farblich verschieden gestalteten Domänen. Entnommen aus Chiocchini et al. (2006)

Abbildung 2.3 veranschaulicht die NRPS-Biosynthese. Ein wichtiger Punkt dabei ist die Enzymaktivierung (A), bei der die inaktive apo- Form in die aktive holo- Form umgewandelt wird. Ohne diese Aktivierung könnte die Biosynthese nicht stattfinden. Näheres wird unter Kapitel 2.2.4 beschrieben. In der Abbildung ist im zweiten Schritt (B) dargestellt, wie eine Adenylierungsdomäne selektiv eine Aminosäure erkennt und aktiviert. Der nächste Schritt (C) stellt die Bindung der aktivierten Aminosäure an das PCP dar, was dazu führt, dass die Kondensationsdomäne eine Peptidbindung zwischen zwei Elementen der wachsenden Kette katalysieren kann (D). Zum Schluss (E) ist die Thioesterasedomäne für die Freisetzung der Peptidkette verantwortlich, welche linear, zirkulär, verzweigt zirkulär oder multimer geformt werden kann.

Als konkretes Beispiel zur NRPS-Biosynthese soll die des Antibiotikums Surfactin dienen (Abbildung 2.4). Es stammt aus *B. subtilis* und besteht aus drei NRPS (SrfA - A, SrfA - B und SrfA - C), welche durch das *srfA* Operon kodiert werden. Die drei NRPS lassen sich insgesamt in sieben Module unterteilen, von denen jedes für die Erkennung, die Aktivierung und das Laden eines einzelnen Aminosäurerestes verantwortlich ist. In Abbildung 2.4 (B) sind diese Module inklusive der katalytischen Domänen und der entsprechenden Extender-Aminosäuren grafisch dargestellt.

2.2.3 Hybride PKS / NRPS

Bereits vorgestellt wurden die modularen Biosynthese-Systeme, welche aus NRPS- oder aus PKS-Modulen bestehen. Wie bereits erwähnt sind sich die NRPS und die PKS-I sehr ähnlich, sodass es wenig verwunderlich ist, dass es auch Mischformen, sogenannte Hybride beider Klassen gibt. Man kann hinsichtlich der Anordnung der Module zwischen PKS/NRPS- und NRPS/PKS-Konfigurationen unterscheiden. Bei den Erstgenannten wird ein NRPS- von einem vorgelagerten PKS- Modul bedient und bei den Zweitgenannten verhält es sich umgekehrt (Shen et al., 2001). Durch diesen Aufbau ist es möglich, dass sowohl kurze Carbonsäuren als auch Aminosäuren in das Rückgrad eingebaut werden (Du et al., 2001). Aus diesen Synthesewegen können neuartige Verbindungen ent-

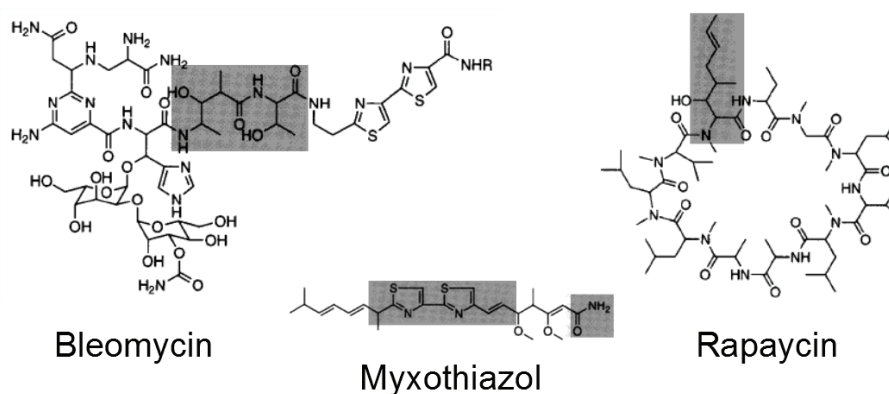


Abbildung 2.5 Entnommen und modifiziert aus Du et al. (2001). Die grau unterlegten Bereiche markieren die Übergänge zwischen PKS und NRPS.

springen, welche ungeahnte Aktivitäten aufweisen können (Silakowski et al., 2001). Ein Beispiel solch eines hybriden Systems ist die Rapamycin-Synthase, welche aus 12 PKS-Modulen und einem NRPS-Modul besteht und das Immunsuppressivum Rapamycin bildet (Aparicio et al., 1996). Weitere aus hybriden Systemen synthetisierte Stoffe, welche medizinische Relevanz haben, sind beispielsweise Bleomycin,(Zytostatikum) und Myxothiazol (Antibiotikum) (Du et al., 2001).

2.2.4 Enzymaktivierung

Fettsäuresynthasen, PKS und NRPS benötigen eine posttranslationale Modifikation ihrer ACP / PCP - Domäne um katalytisch aktiv zu werden. Die Umwandlung des inaktiven Apoproteins in seine aktive holo-Form erfolgt mittels kovalenter Bindung einer 4'-Phosphopantetheinyl- Gruppe aus CoA an einen konservierten Serinrest der ACP / PCP - Domäne. (Lambalot et al., 1996) In Abbildung 2.2.4 ist die Enzymaktivierung am Beispiel einer ACP - Domäne dargestellt. Der 4'-Phosphopantetheinyl- Rest wird auch als "schwingender Arm" bezeichnet, da er durch die Thiolfunktion die Fähigkeit besitzt ein Monomer oder eine Polymerkette aufzugreifen und an das folgende Modul weiterzureichen. (Pfeifer and Khosla, 2001) Diese Reaktion wird durch Phosphopantetheinyltransferasen (PPTasen) katalysiert, welche spezifisch oder universell nutzbar sind. In *E. coli* gibt es beispielsweise drei bekannte PPTasen (ACPS, EntD und o195), wobei diese spezifisch und somit für Klonierungsarbeiten nur bestimmt einsetzbar sind. In *B. subtilis* wurde die PPTase Sfp entdeckt, welche universell genutzt werden kann und in dem ursprünglichen Organismus für die Aktivierung der Surfactin - Synthetase verantwortlich ist (siehe auch Kapitel 2.2.2, Abbildung 2.4). (Mootz et al., 2001) Für die heterologe Expression von Genen in *B. subtilis* ist es demzufolge von Vorteil, dass er bereits Sfp als universelle PPTase enthält.

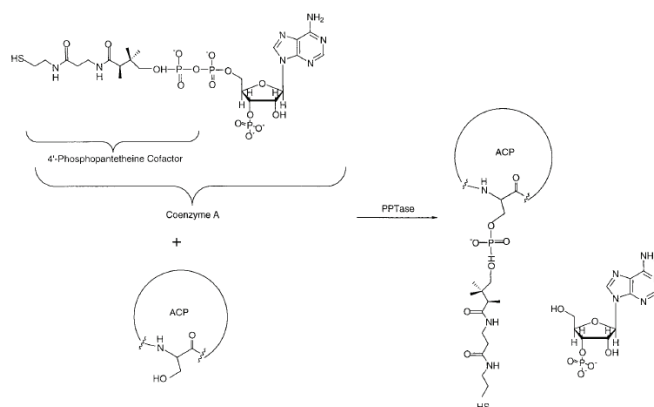


Abbildung 2.6 Durch eine PPTase katalysierte Enzymaktivierung. Entnommen aus Pfeifer and Khosla (2001). ACP = Acyl- Carrier - Protein; PPTase = Phosphopantetheinyltransferase

In Abbildung 2.7 sind zusammenfassend die bereits erläuterten Systeme dargestellt. Modulare PKS (B) und NRPS (A) werden mit deren Hybriden (D und E) verglichen. Außerdem ist die Aktivierung (C) der Systeme veranschaulicht worden.

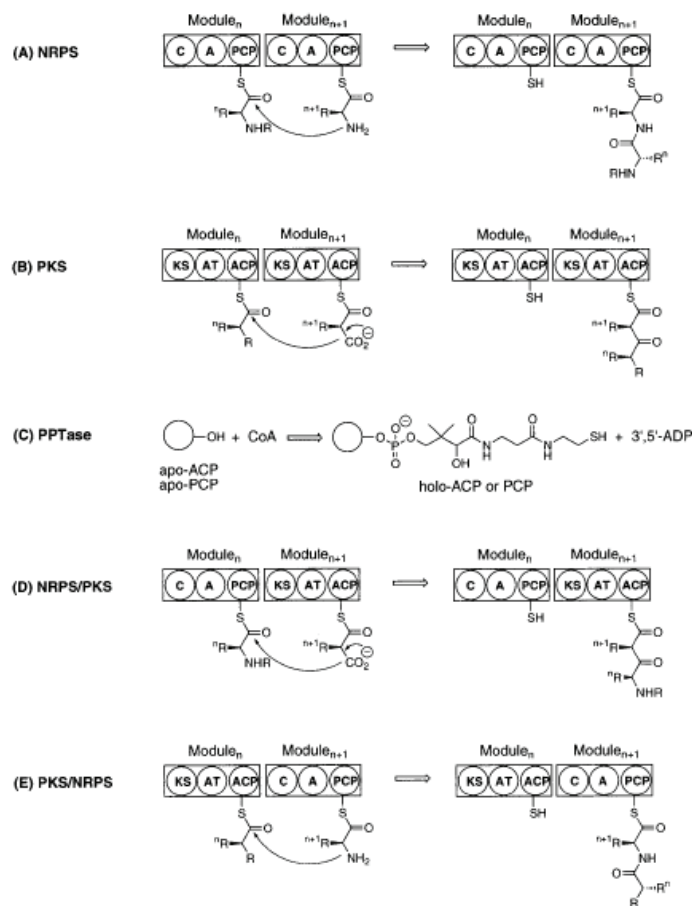


Abbildung 2.7 Dargestellt sind die verschiedenen Systeme zur Synthese von nichtribosomalen Peptiden (A), Polyketiden (B) sowie ihrer Hybride (D und E). Darüber hinaus ist die Aktivierung dieser Systeme dargestellt (C). Entnommen aus Du et al. (2001). NRPS = Nichtribosomale Peptidsynthetase; PKS = Polyketidsynthase; C = Kondensationsdomäne; A = Adenylierungsdomäne; PCP = Peptidyl-Carrier-Protein; KS = Ketoacylsynthase-Domäne; AT = Acyltransferase-Domäne; ACP = Acyl-Carrier-Protein; CoA = CoenzymA; PPTase = Phosphopantetheinyltransferase; PCP = Peptidyl-Carrier-Protein; apo-PCP = apo-Form der PCP-Domäne; holo-PCP = holo-Form der PCP-Domäne

2.3 Heterologe Expression

Als heterolog wird eine Expression (Umsetzung der genetischen Information eines Gens) bezeichnet, wenn dabei ein Protein synthetisiert wird, was in der Zelle nicht vorliegt (Mülhardt, 2003). Die Umsetzung der codierenden Sequenz verläuft über die Stufen der Transkription, die mit der fertigen m-RNA im Cytoplasma endet, und der daran anschließenden Translation, bei der im Ribosom das Protein synthetisiert wird. Dieser Vorgang ist stark vereinfacht in Abbildung 2.8 dargestellt.

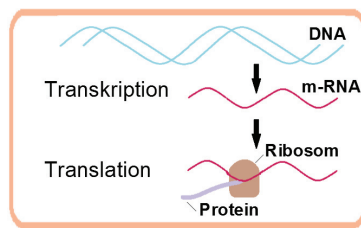


Abbildung 2.8 Stark vereinfachte Darstellung der Genexpression.

Die Wahl des Expressionssystems für die heterologe Expression sollte gut überlegt sein, denn jedes System hat seine Vor- und Nachteile und sollte möglichst ideal auf die Produktion des gewählten Stoffes angepasst sein. Die typischen mikrobiellen Wirte sind die Hefen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*), Eubakterien (z.B. *E. coli*, *B. subtilis*) und einige wenige Archaeobakterien (z.B. *Sulfolobus solfataricus* (Albers et al., 2006)). Aber auch Insekten-, Säugetier- und Pflanzenzellen kommen zum Einsatz. Meist spielt bei der Wahl des Expressionssystems auch der Kostenfaktor eine entscheidende Rolle. Unter Berücksichtigung der Kosten haben pflanzliche und bakterielle Zellen einen klaren Vorteil gegenüber Säugetierzellen. Manchmal ist der Gebrauch solcher Zellen jedoch unabdingbar, sodass die hohen Kosten in Kauf genommen werden. Eine um Längen bessere Glykosylierung und Proteinfaltung innerhalb von Säugetierzellen könnten Argumente für diese sein und gleichzeitig Ausschlusskriterien der Bakterienzellen. (Clark and Pazdernik, 2009) Mikrobielle Systeme haben abgesehen vom Kostenfaktor noch weitere erwähnenswerte Eigenschaften. Neben ihrer leichten Handhabung und der kurzen Generationszeiten ist es möglich ein breites Kultivierungsspektrum auszuschöpfen (z.B. aerobe und anaerobe Bedingungen, verschiedene Temperaturen oder Veränderung des pH-Wertes). Darüber hinaus bietet die Sekretion, wie sie z.B. *B. subtilis* zeigt, einen Vorteil hinsichtlich kosten- und zeitgünstiger Zellaufbereitung. Ebenso lassen sich einige mikrobielle Systeme so genetisch manipulieren, dass beispielsweise eine Sekretionssteigerung, eine Deletion von Coexpressionen und / oder eine Deletion von Proteasen erzielt werden kann, was zu einer erhöhten Ausbeute führt. Die in dieser Arbeit verwendete Bakterie *B. subtilis* weist alle genannten Eigenschaften auf und ist somit hervorragend als Wirt für die heterologe

Expression verschiedenster Proteine geeignet. Daher wird er auch häufig als Produktionsstamm in der Industrie eingesetzt (Bernhardt, 2000).

Um den Transfer des codierten Gens in den Wirtsorganismus zu ermöglichen, bedarf es eines Expressionsvektors. Auf diesem Vektor befindet sich das komplette Gencluster, welchem ein geeigneter Promotor vorgeschaltet ist. Bei der Wahl des Promotors sind verschiedene Aspekte zu beachten. Konstitutive Promotoren erlauben das Ablesen des Gens und damit die Proteinbildung von Beginn an, während induzierbare Promotoren bis zur Zugabe des Induktors und / oder der Abwesenheit eines Repressors inaktiv sind. Zusätzlich gibt es starke und schwache Promotoren, die zu einer unterschiedlich starken Genexpression führen. Je nach Produkt kann das eine oder andere von Vorteil sein. Dem Gencluster nachgeschaltet liegt der Terminator, der für die Transkriptstabilität sorgt, was besonders bei größeren Genen von Nöten ist. Um eine effiziente Translation der gebundenen mRNA zu gewährleisten, sollte nicht vergessen werden die Ribosombindestellen (RBS) für den gewählten Wirt zu optimieren. Wichtig ist auch das Codon Usage zu beachten, um einen bestmöglichen t-RNA-Spiegel zu erhalten bzw. absolute Mängel auszuschließen. Sowohl bei der Produktion von Polyketiden als auch bei der von nichtribosomalen Peptiden gibt es weitere Aspekte zu beachten (Khosla et al., 1999). Wichtig für die Expression funktionstüchtiger PKS und NRPS ist die Enzymaktivierung (Kapitel 2.2.4), welche durch Phosphopantetheinyltransferasen (PPTasen) unter Berücksichtigung eventueller Substratpräferenzen erfolgt. Ist keine universelle PPTase vorhanden, wie es z.B. bei *E. coli* der Fall ist, sollte diese coexprimiert werden. (Lambalot et al., 1996) Außerdem ist ein gewisser Substratpool erforderlich, aus dem die PK beziehungsweise NRP synthetisiert werden können. Neben zahlreichen Aminosäuren sind verschiedene Derivate des CoenzymAs (CoA) die meist genutzten Substrate, aber auch Carbonsäuren können verbaut werden. Auch hier muss ggf. nachgeholfen werden. So verfügt z.B. *E. coli* über keine nachgewiesene (2S)-Methylmalonyl-Produktion (?). Wird dieses Substrat von der PKS benötigt, muss es coexprimiert werden. Aufgrund zytotoxischer Eigenschaften der gebildeten Stoffe, sind transmembranäre Transporter, die das Produkt aus der Zelle befördern, fast unersetzlich. Oftmals liegen kodierte Sequenzen für solche Transporter nahe der Gensequenz des zu synthetisierenden Stoffes oder es sind bereits geeignete Transporter in dem Wirt vorhanden. Posttranslationale Modifikationen sollten nicht außer Acht gelassen werden, sind sie doch häufig das Schlüsselement hin zu einem aktiven Metaboliten. (Pfeifer and Khosla, 2001) (Staunton and Weissman, 2001) (Chiocchini, 2006) Soll tatsächlich ein aktiver Metabolit gebildet werden (z.B. mit antibiotischer Eigenschaft), gilt es einen eventuell negativen Effekt auf die Zelle zu verhindern bzw. zu minimieren. Häufig sind im Genom des ursprünglichen Wirts Resistenzmechanismen verschlüsselt. Die entsprechenden Gene befinden sich meist ebenfalls in der Nähe der PKS/NRPS-Kluster und sollten ggf. coexprimiert werden, um die Zelle vor der Wirkung des Metaboliten zu schützen. (Fernández-Moreno et al., 1991).

2.4 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis ist ein ubiquitär verbreitetes stäbchenförmiges, grampositives, peritrich begeißeltes Bakterium. Es ist ein aerob wachsender Endosporenbildner wie alle Bakterien der Gattung *Bacillus* und kann aus Wasser, Luft und Boden isoliert werden. Eine Abbildung dieses Bakteriums ist in Figur 2.9 sichtbar.

Eine für die Klonierungsarbeiten wesentliche Eigenschaft von *B. subtilis* ist die Ausbil-

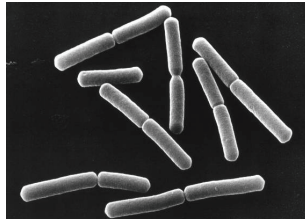


Abbildung 2.9 Bild von *Bacillus subtilis* Bakterien erzeugt von einem Rasterelektronenmikroskop. (Image credit: NASA; <http://www.astrobio.net/exclusive/3866/mutant-microbes-test-radiation-resistance>)

dung der natürlichen Kompetenz. Das ist die Fähigkeit extrazelluläre DNA aufzunehmen und aufgrund der Erweiterung des eigenen Genoms zu integrieren oder sie als Nahrungsquelle zu verwenden (Hecker and Völker, 1998). Weitere interessante Aspekte des Bakteriums sind die bereits vorhandene Fähigkeit industriell relevante Proteine zu produzieren und zu sekretieren, die einfache und vergleichsweise kostengünstige Kultivierung mit relativ hohen Zelldichten und nicht zu vergessen das ungefährliche Handling aufgrund seines GRAS-Status (generally regarded as safe) (Nijland and Kuipers, 2008)(Harwood, 1992). Einige Eigenschaften des *B. subtilis* - Genoms sind in Tabelle 2.4 aufgezeigt.

Für die molekularbiologische und -medizinische Forschung ist *B. subtilis* auch wegen seiner phylogenetischen Nähe zu pathogenen Erregern wie beispielsweise Staphylokokken und Listerien sehr interessant (Ludwig et al., 2009). Betrachtet man *Bacillus subtilis* als Wirt zur heterologen Expression von PKS und NRPS, wie es in dieser Arbeit der Fall ist, werden noch mehr Vorteile erkennbar. Er besitzt eine im Prinzip eigene universelle PPTase, Sfp (Nakano et al., 1992) und ist somit in der Lage zahlreiche heterologe PKS und NRPS zu aktivieren (siehe Kapitel 2.2.1 und 2.2.2). (Mootz et al., 2001). Die eben genannte universelle PPTase liegt in *B. subtilis* 168 durch einen frame shift inaktiv vor. *B. subtilis* 6051 weist dagegen ein intaktes *sfp*-Gen auf. Soll *B. subtilis* 168 als PKS-Produzent genutzt werden, muss *sfp* gerichtet werden.

Nachdem von Patel et al. (1995) das Antibiotikum *Bacillaene* aus einer *B. subtilis* - Kultur isoliert wurde, konnte dieser sekundäre Metabolit, kurz nach der Entdeckung der Megasyntase PksX, durch Butcher et al. (2007) strukturell beschrieben und der Syntheseweg aufgeklärt werden. Das 80 kb große PKS /NRPS- Gencluster, welches für die etwa 2,5MDa schwere PksX- Synthase kodiert, wurde von Straight et al. (2007) in *B. subtilis*

gefunden. Die Größe dieser Megasyntase entspricht etwa 2 % des *B. subtilis* - Genoms. Aufgrund dieser Arbeiten erscheint *Bacillus subtilis* dazu geeignet zu sein komplexe Verbindungen zu produzieren, was ebenfalls die Wahl als Wirt bestätigt.

Basierend auf der bereits genannten Fähigkeit Proteine zu sekretieren, wird *B. subtilis* für die Herstellung von Waschmittelenzymen eingesetzt, aber auch in der biotechnologischen Industrie zur Produktion von Riboflavin (Vitamin B2) und des Antibiotikums Bacitracin. Auch in der Humanmedizin ist *B. subtilis* zu finden. Beispielsweise sind Präparate gegen chronische Dermatose oder Durchfall auf dem Markt, welche Zellen oder Sporen von *B. subtilis* enthalten. (Bernhardt, 2000)

Tabelle 2.2 Generelle Eigenschaften des *B. subtilis* - Genoms (Harwood, 1992)

Komponente des Chromosoms	Wert
Gesamtgröße	4.214.810 bp
GC-Gehalt	43,5 %
Protein codierende Gene	4.100
davon reprimierte Protein codierende Gene	53 %
ORFs	410
phylogenetische Nähe zu	Staphylokokken, Listerien

2.5 *Rhodopirellula baltica*

Rhodopirellula baltica ist ein marines, aerobes, heterotrophes, angehaftet - lebendes, birnenförmiges Bakterium und gehört zu der Familie der Planctomyceten. Es ist chemoorganotroph, streng aerob und wurde erstmals 1986 von Dr. Heinz Schlesner aus der Kieler Bucht isoliert. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme von *Pirellula* ist in Abbildung 2.10 zu sehen. *R. baltica* besitzt, wie alle Planctomyceten, eine aus verzweigten Proteinen aufgebaute Zellwand. Das Riboplasma beherbergt einen fibrillären Nukleotid, was ebenso darauf hinweist, dass es sich bei diesem Organismus um einen Eukaryonten handelt. Tatsächlich hat aber die vergleichende Sequenzanalyse der 16 S ribosomalen RNA eindeutig ergeben, dass *Rhodopirellula baltica* der Domäne der Bakterien zuzuordnen ist (Schlesner et al., 2004). Die Zellen zeigen außerdem beim Wachstum auf einem Nährmedium eine rote Färbung, woraus sich, kombiniert mit den bereits genannten Eigenschaften, der Name "kleines rotes Birnchen aus der Ostsee" entwickelte (Glöckner, 2006). Planctomyceten können die anaerobe Oxidation von Ammonium katalysieren, was sie entscheidenden Einfluss auf die weltweiten Kohlenstoff- und Stickstoffkreisläufe nehmen lässt. Außerdem mineralisieren sie organisches Material, beispielsweise abgestorbene Algen, welches als allgemein so bezeichneter "marine snow" zu Boden sinkt. (Glöckner, 2006) Als erstes

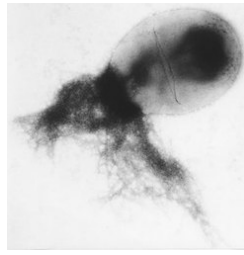


Abbildung 2.10 Elektronenmikroskopische Aufnahme des Meeresorganismus *Pirellula* mit seinen charakteristischen Anheftungsfäden

©Universität Kiel / Schlesner

Planktomycetengenom wurde das von *R. baltica* Typstamm SH1 von Glöckner et al. (2003) publiziert. Mit seinen 7,145 Mb gehörte das zirkuläre *R. baltica* SH1^T - Genom zu den größten bis dahin sequenzierten bakteriellen Genomen. (Frank, 2011) Die Größe des Genoms unterstützt die These, dass Bakterien, die wechselnden Umweltbedingungen unterworfen sind, mehr Gene haben, um durch schnelle Anpassung ihres Stoffwechsel überleben zu können. Einige aus der Genom-Sequenzierung erhaltenen Daten sind in Tabelle 2.5 zu finden.

Tabelle 2.3 Generelle Eigenschaften des *R. baltica* - Genoms

* Schwellenwert für BLAST - E - Werte: 1×10^{-3} , einschließlich Treffer bzgl. hypothetischer Proteine. Entnommen aus Kumpfmüller (2008)

Komponente des Chromosoms	Wert
Gesamtgröße	7.145.576 bp
GC-Gehalt	55,4 %
codierende Sequenzen	7.325
codierende Dichte	95 %
durchschnittliche Genlänge	939 bp
Gene mit Ähnlichkeiten zu Datenbanken *	3.380 (46 %)
Gene mit funktioneller Zuordnung	2.582 (35 %)
rRNAs	1× (16S) und (23S - 5S)
tRNAs	70
andere stabile RNAs	1 (Ribozym)

Die Verfügbarkeit des Genoms ermöglichte ein besseres Verständnis der Anpassung an den marinen Lebensraum. Beispielsweise konnten Glöckner et al. (2003) herausfinden, dass *R. baltica* eine Reihe von Genen besitzt, welche für die Herstellung eines Sonnenschutzfaktors kodieren. Damit ist das Bakterium bestens dafür gerüstet in den oberen sauerstoffreichen Schichten der Ostsee zu überleben und verschafft sich somit einen Konkurrenzvorteil. Ein anderes Beispiel sind spezielle Nitrat-Transporter, mit deren Hilfe es im

stickstoffarmen Oberflächenwasser genug von der essentiellen Substanz aufnehmen kann. Darüber hinaus fanden sie durch das sequenzierte Genom heraus, dass die Anheftung an organisches Material durch eine Art Spezialkleber ermöglicht wird. Hat sich *R. baltica* erst einmal angeheftet, nutzt es das Material nicht nur als Nahrungsquelle, sondern wird dadurch auch zum Meeresboden transportiert. Am Meeresboden wiederum herrschen ganz andere Bedingungen als an der Wasseroberfläche. Speziellen Genen verdankt der Organismus eine Atmung auch in sauerstoffarmer Umgebung, sowie ein Überleben bei gänzlicher Abwesenheit von Sauerstoff. Das Ende des Lebenszyklus wird durch Nahrungsmangel besiegelt. In diesem Fall kommt es zur Ausbildung von Knospen, woraus sich begeißelte Schwärmerzellen bilden, welche an die Wasseroberfläche schwimmen, sodass der Lebenszyklus von vorn beginnen kann. (Glöckner et al., 2003) Der beschriebene Lebenszyklus wurde von Frank (2011) in Abbildung 2.11 grafisch dargestellt.

Angetrieben von den Erkenntnissen, die man allein aus der Genomanalyse dieses einen Bakteriums gewinnen konnte, versuchen Wissenschaftler weitere Untersuchungen mariner Organismen voranzutreiben. Unter Berücksichtigung natürlicher Schwankungen und dem Einfluss des Menschen auf die Umwelt kann mit Hilfe dieses Biomonitorings eine bessere Umweltüberwachung erzielt werden, argumentiert Glöckner (2006) in seinem Forschungsbericht von 2006.

Folgerichtig lässt sich ableiten, dass in dieser Arbeit die heterologe Expression und die funktionelle Charakterisierung von Genklustern entnommen aus *Rhodospirillum rubrum* eine elementare Rolle spielt.

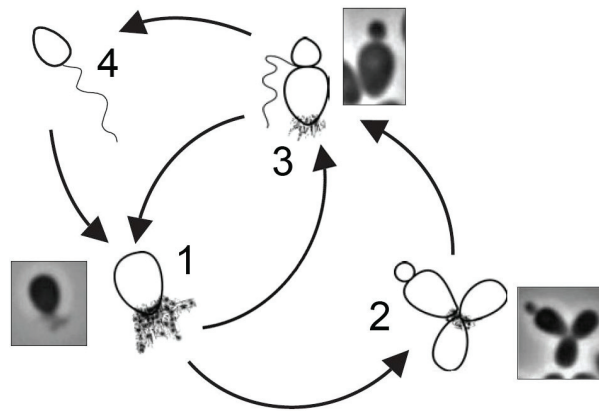


Abbildung 2.11 Lebenszyklus von *R. baltica*. (1) Die jugendliche Zelle löst sich von der adulten Zelle ab. (2) Über eine Flagelle ist sie beweglich, sodass sie zur nährstoffreicheren Wasseroberfläche gelangen kann. (3) Sie heftet sich an organisches Material, welches sie als Nahrungsquelle und Transportmittel benutzt. (4) Die adulten Zellen bilden Aggregate. Bei Nahrungsmangel bilden sich Knospen aus, sodass der Lebenszyklus von Neuem beginnt. Entnommen aus Frank (2011)

3 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegende Arbeit war es die in Kapitel 6.1.1 und 6.1.2 beschriebenen Genkluster aus *R. baltica* zu untersuchen. Für die Charakterisierung der Gene sollte dafür geeignete Software herangezogen werden. Darüber hinaus sollte versucht werden die Genkluster heterolog zu exprimieren und eventuell gebildete Produkte zu detektieren. Nach einer genaueren bioinformatischen Analyse der putativen PKS / NRPS- Gene sollte deren Transformation in *Bacillus subtilis* unternommen werden, soweit die entsprechenden Stämme noch nicht vorlagen. Ob eine erfolgreiche Transkription der Gene stattfand, sollte via mRNA - Analyse untersucht werden. Die Proteinbestimmung sollte durch eine MS - Analyse der aus den Proteingelen entnommenen Proben erfolgen. Anschließend an die Kultivierung sollte die Detektion eines zusätzlichen Metaboliten extern mittels HPLC - MS durchgeführt werden.

4 Material

4.1 Stämme

Alle verwendeten Stämme gehören der Risikogruppe 1 an und wurden damit als unbedenklich eingestuft. Lediglich *E. coli* wurde der Gruppe 2 zugeordnet, allerdings mit folgendem Hinweis: „Arten, von denen Stämme bekannt sind, die langjährig sicher in der technischen Anwendung gehandhabt wurden. Diese bewährten Stämme können daher nach den Zuordnungskriterien in die Gruppe 1 fallen.“

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>B. subtilis</i> JK13	<i>trp</i> ⁻ , <i>sfp</i> ⁰ , Δ <i>sacA</i> :: (<i>ZeoR</i> , <i>PxylA-Cre</i> , <i>xylR</i> , <i>Pspac-comS</i> , <i>lacI</i>)	J. Kumpfmüller
<i>B. subtilis</i> JK14	<i>trp</i> ⁻ , <i>sfp</i> ⁺ , Δ <i>srfA</i> :: <i>ss</i>	J. Kumpfmüller
<i>B. subtilis</i> JK28-2	<i>trp</i> ⁻ , <i>sfp</i> ⁺ : <i>lox72</i> , Δ <i>sacA</i> :: (<i>ZeoR</i> , <i>PxylA-Cre</i> , <i>xylR</i> , <i>Pspac-comS</i> , <i>lacI</i>)	J. Kumpfmüller
<i>B. subtilis</i> JK41	<i>trp</i> ⁻ , <i>sfp</i> ⁺ , Δ <i>amyE</i> :: <i>PacoA-RB6500</i> , Δ <i>srfA</i> :: <i>ss</i>	J. Kumpfmüller
<i>B. subtilis</i> JK205	<i>textittrp</i> ⁻ , <i>sfp</i> ⁺ , Δ <i>amyE</i> :: (<i>PacoA-RB11975</i> , <i>ss</i>), Δ <i>sacA</i> :: (<i>Pspac-Cre</i> , <i>lacI</i> , <i>Zeo</i>)	J. Kumpfmüller
<i>B. subtilis</i> JK206	<i>trp</i> ⁻ , <i>sfp</i> ⁺ , Δ <i>amyE</i> :: (<i>PacoA-RB11975</i> , <i>ss</i>), Δ <i>sacA</i> :: (<i>Pspac-Cre</i> , <i>lacI</i> , <i>Zeo</i>), Δ <i>srfA</i> :: <i>lox72</i>	J. Kumpfmüller
<i>B. subtilis</i> JK207	<i>trp</i> ⁻ , <i>sfp</i> ⁰ , Δ <i>sacA</i> :: (<i>ZeoR</i> , <i>PxylA-Cre</i> , <i>xylR</i> , <i>Pspac-comS</i> , <i>lacI</i>), Δ <i>amyE</i> :: (<i>RB6500-II</i> , <i>lox72</i>)	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> JK208	<i>trp</i> ⁻ , <i>sfp</i> ⁰ , Δ <i>sacA</i> :: (<i>ZeoR</i> , <i>PxylA-Cre</i> , <i>xylR</i> , <i>Pspac-comS</i> , <i>lacI</i>), Δ <i>amyE</i> :: (<i>PacoA-RB6500</i> , <i>lox72</i>)	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> JK209	<i>trp</i> ⁻ , <i>sfp</i> ⁺ , Δ <i>sacA</i> :: (<i>ZeoR</i> , <i>PxylA-Cre</i> , <i>xylR</i> , <i>Pspac-comS</i> , <i>lacI</i>), Δ <i>amyE</i> :: (<i>PacoA-RB6500</i> , <i>lox72</i>)	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> JK210	<i>trp</i> ⁻ , <i>sfp</i> ⁺ , Δ <i>sacA</i> :: (<i>ZeoR</i> , <i>PxylA-Cre</i> , <i>xylR</i> , <i>Pspac-comS</i> , <i>lacI</i>), Δ <i>amyE</i> :: (<i>PacoA-RB6500</i> , <i>lox72</i>), Δ <i>srfA</i> :: <i>lox72</i>	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> JK211a	<i>trp</i> ⁻ , <i>sfp</i> ⁰ : <i>loxSSS</i> , Δ <i>amyE</i> :: (<i>PacoA-RB11975</i> , <i>ss</i>), Δ <i>sacA</i> :: (<i>Pspac-Cre</i> , <i>lacI</i> , <i>Zeo</i>)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 galU galK</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

4.2 Plasmide

Bezeichnung	Name / Beschreibung	Referenz
pSC-B-Mb	enthält komplettes RB6500-Operon	Kumpfmüller (2008)
pSB 5	enthält RB6499	Blank (2009)
pSB 7	enthält RB6502	Blank (2009)
pJK 64a	pSfp-lox-SSS	J. Kumpfmüller
pJK 191	pSrfA-lox-SSS	J. Kumpfmüller
pJK 201	pAmyE-T7-lox-SSS	J. Kumpfmüller
pJK 202	pAmyE-T7-RB6500-II-lox-SSS	diese Arbeit
pJK 203	pAmyE-RB6500-I-lox-SSS	diese Arbeit
pJK 207	pAmyE-T7-PacoA-lox-SSS	diese Arbeit
pJK 208	pAmyE-PacoA-RB6500front-lox-SSS	diese Arbeit
pJK 210	pSacA-Spec	diese Arbeit
pJK 213	pAmyE-RB6500B-T7-lox-SSS	diese Arbeit
pJK 214	pAmyE-PacoA-RB6500FB-T7-lox-SSS	diese Arbeit
pJK 215	pAmyE-PacoA-RB6500-T7-lox-SSS	diese Arbeit
pJK 230	pSac-Spec	diese Arbeit
pJK 231	pAmyE-PcspB-T7-lox-SSS	diese Arbeit
pJK 232	pAmyE-PcspB-RB6502-T7-lox-SSS	diese Arbeit
pJK 233	pAmyE-PcspB-RB6499-T7-lox-SSS	diese Arbeit
pJK 234	pAmyE-PcspB-RB6502-RB6499-T7-lox-SSS	diese Arbeit
pJK 235	pSfp0-lox-SSS	diese Arbeit
pJK 247	pSac-PacoA-T7-Spec	diese Arbeit

Abbildungen der meisten verwendeten Plasmide finden sich im Anhang unter Abbildung 9.2 – 9.4

4.3 Oligonukleotide

Soweit nichts anderes vermerkt ist, wurden die Oligonucleotide von der Firma Invitrogen synthetisiert. Nach Lieferung wurde eine Stammlösung der Konzentration 100 μM in A. dest. hergestellt und bei -20 °C gelagert. Für den täglichen Gebrauch wurden diese bei RT aufbewahrt.

Nr.	Sequenz 5'→3'	Bezeichnung
5029	sfp-back-rev	CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCGTC-CAGCATGTCATCGAACG
5032	amyE-front seq.	CATCAATCATAACCACCAGTG
5355	RB11975-front-for neu	CCACGTTGCGGTAGATCGATGGAAGAGGCCTTTCTGGC-CAGTCGGGTCG
5356	RB11975-front-Pme-rev	GCATCACGTATTCAGCTGGATCCTCGAGGGTTTAAAC-CATATGAATTCACCCGAACGTG
5400	SpecR seq. for	CTAGAACATCTACATCGC
5403	RB6500-II-for	GTTATGCTAACTAGTATCGATATCGAATTCTCAGCCAC-CGGCGTGGCTTACG

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Nr.	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
5404	RB6500-II-rev	AATGTATGCTATACGAACGGTAGGCCTC- GACGTGGAAGTCTTCGCAACCG
5405	RB6500-I-for	CGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGATCAGT- GATATCGCAAGG
5406	RB6500-I-PmeI-rev	AATGTATGCTATACGAACGGTAGGCCTCGAGTTTAAA- CACATATGAGCGATCGACCTAGGAC
5407	PacoA-RB6500-for	GTGTCCTAGGTCGATCGCTCATATGTGTTTCCCTCCTTC- TATTTAGGGTTC
5408	PacoA-lox71-rev	GTATGCTATACGAACGGTAGGCCTCGAGTTTATTCAGT- CAAACGATGCAG
5413	PacoA-T7-for	GTTATGCTAACTAGTATCGATATCGAATTCTCGAGCA- TATGTGTTTCCCTCCTTCTATTTAGGGTTC
5414	PacoA-lox71-rev	AATGTATGCTATACGAACGGTAGGCCTCGATTTCAGT- CAAACGATGCAGAG
5415	RB6500-front-for	CGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGTCAAAG- CAATACGAGATGCG
5416	RB6500-front-rev	GTGAACCCATAATAGAAGGAGGAAACACATATGAGC- GATCGACCTAGGAC
5417	Spec-Asc-for	CAACGGGCTGGACGATTTTGGCGCGCCTAATTTACAAA- GAGGACG
5418	Spec-Asc-rev	CAATGGTTCGGATGGGGCGCGCCAATCTAGGGTAAG- TAAATTGAG
5419	RB6500-1a-rev	AATGTATGCTATACGAACGGTAGGCCTCGACCCGGGA- CAGCGAAGCGATTGAACG
5420	RB6500B-rev	AATGTATGCTATACGAACGGTAGGCCTCGAGTACAA- GATGCAACCCATCG
5421	RB6500F-for	ATCCGTGTCTCGATGGGTTGCATCTTGTACGTAATC- GATGCTGCTGATTC
5436	T7-SpecR-for	AATTTTATTGCAATAACAGGTGCTTACTTTTGAAAAAA- CCCCTCAAGACC
5437	PacoA-SacA-rev	GTTCAATATTTATCAATAAATCAGTAGTTTTTCAGTCAAA- CGATGCAG
5438	RB6502-T7-for	GTTATGCTAACTAGTATCGATATCGAATTCTCGAGTCAT- CCCTGGTGGCGAAGAG
5439	PacoA-RB6502-rev	TGAACCCATAATAGAAGGAGGAAACACATATGACC- TACTTTGGTTTCG
5440	RB6499-T7-for	GTTATGCTAACTAGTATCGATATCGAATTCTCGAGC- TAGCTGGCCTCTGCAACC
5441	PacoA-RB6499-rev	TGAACCCATAATAGAAGGAGGAAACACATATGGCTGAA- CCAACGAAGC
5442	RBS-RB6499-rev	TCTTCGCCACCAGGGATGACTCGAGGAGGAAACACA- TATGGCTGAACC
5448	sfp0-front-for	GAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCA- GAAGCGTATGATGTC
5449	sfp0-front-rev	AATGTATGCTATACGAACGGTAGGCCTCGAGAATG- CAAGGGTTTGCCAAC

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Nr.	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
5456	PcspB-XhoI-for	TATCGAATTCTCGAGCATATGTGTTTCCTCCTTCCTAC- TAGAAACCTTTTTTCAGAGTTG
5457	PcspB-Sall-rev	ACGGTAGGCCGTGACCATACTCCTATCTATG

4.4 Enzyme und Proteine

Typ/Bezeichnung	Quelle
Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments	Roche
CDP-Star	Roche
DNase I	Roche
HotStarTaq Plus DNA Polymerase	Qiagen
Lysozym (<i>hen egg white</i>)	Serva
Nuclease Mix	GE Healthcare
Phusion Polymerase	New England Biolabs
Proteaseinhibitor-Mix	Roche
Restriktionsendonukleasen	Roche, New England Biolabs, Jena Biosciences, Fermentas
RNase	Roche
Shrimp alkalische Phosphatase	Roche
T4 DNA-Polymerase	Roche
T4 DNA-Ligase	Roche
T7 RNA-Polymerase	Roche
Taq DNA Polymerase	Fermentas

4.5 Kits und Fertiglösungen

Bezeichnung	Hersteller
Blocking Reagent	Roche
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
Lugol'sche-Lösung	Roth
MagNA Pure LC RNA Isolation Kit	Roche
NuPage® Antioxidant	Invitrogen
NuPage® LDS Sample Buffer	Invitrogen
NuPage® Reducing Agent	Invitrogen
NuPage® Tris-Acetate SDS Running Buffer	Invitrogen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen

4.6 Größenstandards

Typ	Bezeichnung	Quelle
DNA	100 bp DNA Ladder	Jena Biosciences
	Marker II, VI und VII	Roche
Protein	PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas
	HiMark™ Unstained Protein Standard	Invitrogen

Abbildungen der verwendeten Marker finden sich im Anhang unter 9.1

4.7 Antibiotika

Die Stammlösungen sind jeweils 1000× konzentriert

Substanz	Quelle	eingesetzte Endkonzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Ampicillin	Roth	-	50 - 100
Zeocin	Sigma	-	60
Chloramphenicol	Sigma	-	10 - 25
Kanamycin	Sigma	10 - 30	30
Spectinomycin	Sigma	10 - 30	30

4.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Verwendung	Bezeichnung	Quelle
Zellarbeiten	BioPhotometer	Eppendorf
	French Press	SLM Aminco
	Inkubator „Heraeus functionline“	Heraeus
	65 °C Inkubator Bs-50	MLW
	Labsonic U	Braun
	Petrischalen \varnothing 92 mm	Sarstedt
	Reagenzglasschüttler Mono Mixer	Sarstedt
	Schüttelinkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific
	Schüttelkolben	Duran, VWR
	Spektralphotometer Ultrospec 3300 pro	Pharmacia Biotech
Zell- & DNA-Manipulation	Stammhaltungsröhrchen	Sarstedt
	ThermoMixer	Eppendorf
	E.coli-Pulser	Bio-Rad
	Mastercycler	Eppendorf
	MicroPulser Küvetten, 0.2 cm	Bio-Rad
	Thermocycler MJ Mini Gradient	Bio-Rad
Elektrophorese	TropiCooler	Boekel Industries
	UV-Küvetten micro	Brandt
	Dodeca mini Cell	Bio-Rad

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Verwendung	Bezeichnung	Quelle
RNA-Arbeiten	Mini-Subcell GT	Bio-Rad
	MiniProtean II Apparatur	Bio-Rad
	NuPage® Tris-Acetate Mini Gel	Invitrogen
	PowerPac 200/1000	Bio-Rad
	Power Supply EPS 3500 XL	Pharmacia
	E322/E452 Powersupply	Consort
	Transilluminator GeneGenius Gel-dokumentation	Syngene
	UV-Tisch	Vilber Lourmat
	Glasperlen	Sartorius
	King-Fisher	Thermo Electron
Blotting	Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer	PeqLab
	RiboLyser	Hybaid
	Ribolysertubes	Sartorius
	Filterpapier	Whatman
Immunodetekion	Nylonmembran	Roche
	VacuGene Pump	Pharmacia Biotech
	VacuGene XL	Pharmacia Biotech
Proteinarbeiten	Hybridisierungssofen	Bachofer
	Hybridisierungsflasche	Rettberg
	Lumi-Imager	Boehringer-Ingelheim
	Unimax 1010 Schüttler	Heidolph
	Dounce Homogenisator	Wheaton
	Nanoquant	Roth
	Roti®-PAGE Precast	Roth
Sonstiges	Swing-Out-Rotor	Thermo Scientific
	Ultrazentrifuge	Thermo Scientific
	Ultrazentrifugenröhrchen	Seton
	Biofuge pico	Heraeus
	Biofuge primoR	Heraeus
	Eismaschine F80L	Icematic
	Electronicrührer Multipoint HP	Variomag
	Eppendorf-Reaktionsgefäße	Brand
	Falkonröhrchen	Becton Dickinson Labware
	Pipettenspitzen	Sarstedt
	Gefriertruhe Hera freeze	Heraeus
	Halbmikroküvetten (1,5ml)	Brand
	Heizblock Thermo 1.0	Störk-Tronic
	Hub-Pipetten	Eppendorf
	Kühlschrank	Liebherr
	Labor-pH-Meter 766	Knick
	Magnetrührer RH basic	IKA
Mikrowellenherd	Brother	
Parafilm	American National Can	
Rotationsverdampfer	Büchi	

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Verwendung	Bezeichnung	Quelle
	Rotilabo Spritzenfilter (0,22 μm)	Roth
	Rundkolben mit Schliff	Duran
	Schnellkochtopf	WMF
	Sicherheitswerkbank HERA safe	Heraeus
	Vakuumzentrifuge CON-1000	LTF
	Vakuumzentrifuge RVC 2-18	Christ
	Wipptisch 3011	GFL

4.9 Chemikalien und Lösungsmittel

Verwendung	Substanz	Quelle
Zellarbeiten	Acetoin	Merck
	Ammoniumchlorid	Roth
	Calciumchlorid	Roth
	Case Amino Acids (CAA)	Roth
	Glukose	Roth
	Glycerin	Roth
	Hefeextrakt	Roth
	Hydrogenphosphat	Roth
	Kalium-di-hydrogenphosphat	Roth
	Kaliumchlorid	Roth
	Magnesiumsulfat	Roth
	Magnesiumchlorid	Roth
	Malzextrakt	
	Mannitol	Roth
	Natriumchlorid	Roth
	Natriumhydroxid	Roth
	di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
	Sojamehl (fettarm)	Henselwerk
	Sorbitol	Roth
	tri-Natrium-Citrat	Roth
Standardpuffer	Trypton	Roth
	Tryptophan	Roth
	XAD-16	Sigma
	Borsäure	Roth
DNA-Arbeiten	Chlorwasserstoff	Roth
	EDTA	Roth
	TRIS	Roth
DNA-Arbeiten	Agarose	PeqLab
	Bromphenolblau	Roth
	dNTP	New England Biolabs

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Verwendung	Substanz	Quelle
RNA-Arbeiten	DMSO	New England Biolabs
	Ethanol	Roth
	Ethidiumbromid	Roth
	Isopropanol	Roth
	Kristallviolett	Roth
	Chloroform	Roth
	Formaldehyd	Roth
	Formamid	Roth
	Isoamylalkohol	Roth
	N-Lauroylsarcosinat	
	Maleinsäure	Roth
	Na-Acetat	Roth
	Natriumazid	Roth
	Phenol (Aqua)	Roth
	SDS	
Extraktion Analyse	Sucrose	Roth
	Tween 20	Merck
	Aceton p. a.	VWR
	Essigsäure	Roth
	Ethylacetat p. a.	VWR
	Methanol p. a.	VWR
	konz. Schwefelsäure	
	Toluol	VWR

4.10 Medien

4.10.1 Vollmedien

LB-Medium

Bestandteil	Menge
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ad 1 l mit A. dest pH 7,0	

SB-Medium

SB Medium	
Bestandteil	Menge
Lösung 1	95 ml
Lösung 2	5 ml

Lösung 1

Bestandteil	Menge
Trypton	32 g
Hefeextrakt	20 g
NaCl	5 g
1 N NaOH	5 ml

ad 1 l mit A. dest pH 7,0

Lösung 2

Bestandteil	Menge
Na ₂ HPÖ ₄	12 g
KH ₂ PÖ ₄	6 g
NH ₄ Cl	6 g
CaCl ₂	6 mg

ad 1 l mit A. dest pH 7,0

4.10.2 Definierte Medien**Transformations-Medien: natürliche Kompetenz von *B. subtilis*****Transformationsmedium**

Bestandteil	Konz.
Kompetenzmedium	99 T
CAA	1 T

10 %ige SL

Kompetenzmedium

Bestandteil	Menge
MN-Lösung	10 ml
Glukose	10 ml
Tryptophan	1000 µl
FeNH ₄ -Citrat	500 µl
K-Glutamat	500 µl
MgSÖ ₄	300 µl

ad 100 ml mit A. dest pH 7,0

10 × MN-Lösung

Bestandteil	Menge
K ₂ HPÖ ₄	13,7 g
KH ₂ PÖ ₄	6 g
Na ₃ -Citrat	0,84 g

ad 100 ml mit A. dest

Expressionsmix		
Bestandteil	Menge	
Hefeextrakt	250 μ l	10 %ige SL
CAA	500 μ l	5 %ige SL
Tryptophan	50 μ l	8 mg/ml SL
Aqua dest.	200 μ l	

4.10.3 Festmedien

Zur Herstellung von Festmedien, wurde den entsprechenden Flüssigmedien vor dem Autoklavieren Agar zugesetzt. LB-Medium wurde auf eine Konzentration von 1,5 % (w/v) eingestellt. Nach Abkühlen auf 65 °C wurde dem Medium entsprechende Antibiotika zugegeben und das Gemisch in Petrischalen gegossen. Bis zur Verwendung wurden die fertigen Kultivierungsschalen bei 4 °C gelagert.

4.11 Puffer und Lösungen

4.11.1 Allgemeine Puffer

TE - Puffer

Bestandteil	Konzentration	
Tris	100	mM
EDTA	1	mM
ad 1 l mit A. dest; pH 8,0 einstellen		

Lysis - Puffer I

Bestandteil	Konzentration	
TE - Puffer	1000	μ l
PMSF	1,4	mM

TBE - Puffer

10 \times		
Bestandteil	Menge	
Tris	108	g
Borsäure	55	g
EDTA	40	ml
0,5 M SL; pH 8,0		
ad 1 l mit A. dest pH 7,0		

SSC - Puffer

20×

Bestandteil	Konzentration
NaCl	3 M
Na ₃ -Citrat	0,3 M
ad 1 l mit A. dest.; einstellen auf pH 7,0; Punkt-Autoklavieren	

SDS - Puffer

10×

Bestandteil	Konzentration
SDS	100 g
A. dest.	900 ml
Staub vermeiden; im Wasserbad bei 65 °C unter Rühren lösen ad 1 l mit A. dest.	

4.11.2 DNA - spezifische Puffer**DNA-Bromphenolblau-Probenpuffer**

10×

Bestandteil	Menge	
Bromphenolblau	250 mg	150 mM SL; pH 7,6
Tris	33 ml	
Glycerin	60 ml	
ad 1 l mit A. dest. pH 7,0		

DNA-Kristallviolett-Probenpuffer

6×

Bestandteil	Konzentration
Kristallviolett	100 µg/ml
EDTA	20 mM
Glycerin	30 %
ad 100 ml mit A. dest pH 7,0	

4.11.3 RNA-spezifische Puffer

Killing-Puffer

10×	
Bestandteil	Konzentration
Tris-HCl	20 mM
MgCl ₂ *6H ₂ O	5 mM
NaN ₃	20 mM

ad 1 l mit A. dest.; einstellen auf pH 7,5

Saure Phenol - Lösung

Bestandteil	Konzentration
Phenol (Aqua]	50 T
Chloroform	48 T
Isoamylalkohol	2 T

2× mit A. dest. ausschütteln; untere Phase verwenden

Lysis - Puffer II

Bestandteil	Konzentration
EDTA	3 mM
NaCl	200 mM

ad 200 ml mit A. dest pH 7,0

RNA - Denaturierungslösung

Bestandteil	Konzentration
NaOH	50 mM
NaCl	10 mM

ad 1 l mit A. dest pH 7,0

RNA - Renaturierungslösung

Bestandteil	Konzentration
Tris-HCl	0,1 M

ad 1 l mit A. dest pH 7,4

Prähybridisierungslösung

Bestandteil	Menge		
Formamid	35	ml	
SSC	17,5	ml	20× SL
Blocking Reagent	14	ml	10%ige SL
N-Lauroylsarcosinat	0,7	ml	10%ige SL
SDS	0,14	μl	10%ige SL
ad 70 ml mit A. dest. pH 7,0			

RNA-Waschlösung I

Bestandteil	Menge		
SSC	30	ml	20× SL
SDS	3	ml	10%ige SL
ad 300 ml mit A. dest pH 7,0 vor Gebrauch mind. 30 min bei ca. 65 °C vorwärmen			

RNA-Waschlösung II

Bestandteil	Menge		
SSC	2,5	ml	20× SL
SDS	5	ml	10%ige SL
ad 500 ml mit A. dest. pH 7,0 vor Gebrauch mind. 30 min bei ca. 65 °C vorwärmen			

RNA - Waschpuffer

Bestandteil	Menge		
Puffer 1	100	ml	10× SL
Tween 20	3	ml	
ad 1 l mit A. dest. pH 7,0			

RNA - Puffer 1

10×			
Bestandteil	Menge		Konzentration
Maleinsäure	116,1	g	1 M
NaCl	88,7	g	1,5 M
NaOH	72,0	g	1,8 M
ad 1 l mit A. dest; einstellen auf pH 7,5			

RNA - Puffer 2

Bestandteil	Menge	Konzentration
Puffer 1	15 ml	10× SL
Blocking Reagent	15 ml	10 % ige SL
ad 100 ml mit A. dest pH 7,0 vor Gebrauch mind. 30 min bei ca. 37 °C vorwärmen		

RNA - Puffer 3

Bestandteil	Menge
Tris	100 mM
NaCl	100 mM
in ca. 850 ml A. dest. lösen, pH 9,5, autoklavieren	
Diethanolamin	9,63 ml
ad 1000 ml mit A. dest	

4.11.4 Proteingelfärbung

Coomassie-Färbelösung

Bestandteil	Menge	Konzentration
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 g	
Phosphorsäure	1 ml	
Coomassie Stock	1,6 ml	5 % ige SL
ad 80 ml mit A. dest. Kurz vor Nutzung 20 ml Ethanol hinzugeben.		

4.11.5 Membranproteinbestimmung - spezifische Puffer

Lysis - Puffer

Bestandteil	Menge	Konzentration
Tris-HCl pH 7,5	300 µl	10 mM
EDTA pH 8	600 µl	10 mM
Roche Complete	1,2 ml	
A. dest	27,6 ml	
Roche Complete: 1 Tablette in 20 ml A. dest. lösen, in 2 ml – Eppis wegfrieren Roche Complete (Proteaseinhibitor – Mix) immer frisch ansetzen! Auf Eis lagern!		

High - Salt - Puffer

Bestandteil	Menge	Konzentration
Tris – HCl pH 7,5	800 μ l	20 mM
NaCl	2,35 g	1 M
ad 40 ml mit A. dest. pH 7,0		

1 M Tris-HCl, pH 7,5

Bestandteil	Menge
Tris	6,057 g
in ca. 40 ml A. dest lösen; auf Ph 7,5 einstellen in 50 ml – Flasche auf 50 ml auffüllen, autoklavieren	

Alkalischer Puffer

Bestandteil	Menge	Konzentration
Na ₂ C O ₃ -HClpH 11	4 ml	0,1 M
NaCl	235 mg	0,1 M
ad 40 ml mit A. dest pH 7,0		

1 M Na₂C O₃-HClpH 11

Bestandteil	Menge
Na ₂ C O ₃	5,3 g
in ca. 40 ml A. dest lösen; auf PH 11 einstellen in 50 ml – Flasche auf 50 ml auffüllen	

50 mM TEAB pH 7,8

Bestandteil	Menge
TEAB-Lösung (1 M, pH 8,5)	2,5 ml
in ca. 40 ml A. dest lösen; auf PH 7,8 einstellen in 50 ml – Flasche auf 50 ml auffüllen	

SDS - Probenpuffer

2×		
Bestandteil	Menge	Endkonzentration
Tris-HCl pH 6,8	1 ml	50 mM
SDS (20%)	5 ml	10 %
Glycerol	1 ml	10 %
DTT ($154,25 \frac{g}{l}$; 1 M)	7,7 mg	5 mM

ad 10 ml mit A. dest.; a 1 ml aliquotieren und bei -20 °C lagern

4.12 *In silico* Werkzeuge und Datenbanken

4.12.1 Datenbanken und Webtools

Name	Verwendung	Quelle
RNA & DNA Folding Applications (mfold)	Tool zur Faltung und thermodynamischen Analyse	http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/
NCBI	Datenbank für BLAST-Untersuchungen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
NRPSsp	Non-Ribosomal Peptide Synthase Substrate Predictor	http://nrpssp.com
Pfam 22.0	Proteinfamilien-Analyse	http://pfam.sanger.ac.uk/
PKS-NRPS-Analyses	PKS/NRPS-Domänen-Vorhersage	http://www.tigr.org/jravel/nrps/
SBSPKS	Structure Based Sequence Analysis of Polyketide Synthases, Erstellen von 3D Strukturen der PKS	http://www.nii.res.in/nrps-pks.html http://www.nii.ac.in/~pkfdb/sbspks/master.html
Strukturformelzeichner	Zeichnen von chemischen Formeln	http://www.strukturformelzeichner.de

4.12.2 Software

Name	Verwendung	Quelle
ImageJ	Bildverarbeitung	http://rsbweb.nih.gov/ij
Inkscape	Bild- und Textverarbeitung	http://www.inkscape.org
JabRef	Literaturmanager	http://jabref.sourceforge.net
TeXnicCenter	Latex GUI	http://www.sourceforge.net
VectorNTI 10	Vektor- und Sequenztool	http://www.invitrogen.com

5 Methoden

5.1 Promotoren

***acoA*-Promotor**

Eigentlich für die Steuerung des *acoABCL* Operons zuständig, ist der *acoA* Promotor aus verschiedenen Gründen auch an anderer Stelle einsetzbar. Das *acoABCL* Operon kodiert für die Untereinheit des Acetoin - Dehydrogenase-Komplexes, welcher ab der frühen stationären Phase Acetoin im Überschuss produziert. Das Acetoin wiederum kann durch Remetabolisierung erneut als Energiequelle genutzt werden. Wie von Silbersack et al. (2006) beschrieben, fördert der induzierbare *acoA* Promoter eine langanhaltende Transkription. Im Gegensatz zu der Repression durch Glukose, wird die Transkription durch Acetoin induziert, ist die bevorzugte Kohlenstoffquelle Glukose erst einmal verbraucht. Zusätzlich dazu findet auch auf genetischer Ebene eine Regulation statt.

In jedem Fall konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des *acoA*-Expressionssystem mit der Anwesenheit von Acetoin korreliert. Eine lang anhaltende Expression konnte unter Glukose-Limitierung festgestellt werden, was mit der Verstoffwechselung von Acetoin zu begründen ist.

***cspB*-Promotor**

Der *cspB* Promotor steuert ursprünglich ein "Cold Shock Protein" mit selbigem Namen. Isoliert werden kann dieses Protein aus Stämmen von *B. subtilis* 168 und weist eine Länge von 67 AS auf (Willimsky et al., 1992). Das CspB Protein bindet sehr stark an spezifische Sequenzen (ATTGG und CCAAT) und kann als Aktivator für "Cold Shock" Gene fungieren. Basis dieser Aktivierung bildet die Anwesenheit von ATTGG-Elementen in der Promoterregion des induzierbaren Gens. (Graumann and Marahiel, 1994).

Für den Gebrauch des P *cspB*s im Labor sollte man wissen, dass er nicht erst induziert werden muss und somit von Beginn der Kultivierung an aktiv ist.

5.2 Zellkultivierung

5.2.1 Stammhaltung

Um für die verwendeten Stämme von *E. coli* und *B. subtilis* eine Langzeitlagerung zu gewährleisten, wurden diese als Glycerinkulturen (20-30 %Glycerinanteil) bei -70 bis -80 °C gelagert. Für den täglichen Gebrauch reichte eine kurzzeitige Lagerung aus, welche

unter regelmäßiger Überimpfung in Form von Nährmedium - Agar - Plattenkulturen mit entsprechendem /n AB bei 4 °C erfolgte.

5.2.2 Allgemeine Kultivierung

Alle Materialien, Medien oder Chemikalien, die vor oder während der Kultivierung in unmittelbarem Kontakt mit den Zellen kamen, wurden vorher mit entsprechend geeigneten Methoden sterilisiert, um Fremdkontaminationen entgegenzuwirken.

Plattenkulturen wurden auf LB - Medium - Agarplatten mit entsprechendem /n Antibiotikum /a bei 37 °C bis zum Erreichen der gewünschten Koloniegröße inkubiert.

Für beispielsweise Screenings oder DNA - Isolierungen wurden Schüttelkulturen im kleinen Maßstab (5 ml - Kulturen im Reagenzglas oder in 1,4 ml - Kulturen im Eppi mit Loch im Deckel) in LB - Medium mit entsprechenden Antibiotika bei der jeweiligen Temperatur im Schüttelinkubator bzw. im ThermoMixer angezüchtet.

Um die Wachstumsphase von Schüttelkulturen zu bestimmen, wurde die OD₆₀₀-Messung spektralphotometrisch mit genormten Plastikküvetten (Strahlengänglänge von 1 cm) bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen den Leerwert des jeweiligen Mediums durchgeführt.

5.2.3 Kultivierung der Expressionsstämme

Die *B. subtilis* - Expressionsstämme wurden zunächst aus der Kryo - Kultur oder von der Agarplatte in 5 ml LB - Medium (Kapitel 4.10.1) mit entsprechendem /n Antibiotikum /a im Reagenzglas angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator angezogen. Aus der LB - Vorkultur wurde die 50 ml - SB - Vorkultur angeimpft. Empfehlenswert ist es eine höher und eine niedriger verdünnte Vorkultur anzuimpfen, damit in jedem Fall die Hauptkultur auf die passende OD eingestellt werden kann. Die Vorkultur befand sich in einem 100 ml - Kolben und wurde ebenfalls bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Die Ziel - OD zum Animpfen der Hauptkultur ist OD₆₀₀ = 1,0. Das Animpfen erfolgt nach folgender Berechnung:

Berechnung der Animpf-OD:	$\begin{aligned} \ln(\text{Animpf-OD}) &= \ln(\text{Wunsch-OD}) - (\mu * \Delta t) \\ &= \ln(1,0) - (0,025/\text{min} * \Delta t) \\ &= 0 - (0,025/\text{min} * \Delta t) \\ &= - 0,025/\text{min} * \Delta t \end{aligned}$
Berechnung des Animpf - Volumens:	$\text{Animpf - Volumen} = \frac{\text{Animpf-OD} * \text{Gesamtvolumen}}{\text{aktuelleOD}}$

Für die Hauptkultur wurden 100 ml SB -Medium (Kapitel 4.10.1) in einen 500 ml - Kolben gegeben und mit 1 % Acetoin sowie entsprechendem /n Antibiotikum /a versetzt. Von diesem Ansatz wurden drei Parallelen hergestellt und aus der selben Vorkultur auf OD₆₀₀ = 1,0

laut vorheriger Berechnung angeimpft.

Zur Aufnahme einer Wachstumskurve wurde sofort nach dem Animpfen und anschließend alle 30 min bei 600 nm die OD gegen SB - Medium und Acetoin gemessen.

Am Ende der Kultivierung wurde, zur Überprüfung der Stämme, die Kultur mittels Impfsse auf LB - Agarplatte (+AB) (evtl. Stärke- und / oder Blutagartest) ausgestrichen.

Probennahme

Zur näheren Analyse der RNA sowie zur Proteinbestimmung, wurden während der Kultivierung Proben genommen. Die Probennahmezeitpunkte richten sich nach dem Wachstumstadium, welches durch die OD ermittelt wird. Im Folgenden werden die Wachstumsphasen, bei denen Proben genommen werden, aufgelistet.

Exponentiell	OD ₆₀₀ ca. 1
Frühstationär	OD ₆₀₀ ca. 3
Stationär	OD ₆₀₀ ca. 5
Spätstationär	nach 12 Stunden

Die Probennahmezeitpunkte sollten an die Ergebnisse vorhergehender Wachstumsexperimente angepasst werden. Auch die Probenmenge richtet sich nach der OD und ist für Protein- und RNA - Proben unterschiedlich, wie die nachfolgenden Formeln zeigen:

$$\begin{array}{ll} \text{RNA - Probennahme:} & \text{Volumen Killing Puffer } V = \frac{8}{OD} \\ & \text{Probenvolumen } V = \frac{16}{OD} \end{array}$$

$$\begin{array}{ll} \text{Protein - Probennahme} & \\ & \text{Probenvolumen } V = \frac{5}{OD} \end{array}$$

Die RNA - Proben wurden in 50 ml - Falkonröhrchen zu vorgelegtem kaltem Killing - Puffer (Kapitel 4.11.3) gegeben. Die dadurch abgetöteten Zellen wurden sofort durch Zentrifugation für 5 min bei 8500 rpm und 4 °C pelletiert, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

Die Proteinproben wurden in ähnlicher Art und Weise behandelt. Nachdem sie bei 13.000 rpm und 4 °C pelletiert wurden, wurde der Überstand zügig abgegossen und danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -20 °C bis zum Proteinaufschluss.

5.3 Metabolitenbestimmung

Die Kultivierung für die Metabolitenbestimmung erfolgte in Anlehnung an die Kultivierung, welche in Kapitel 5.2.3 beschrieben wurde. Die Vorkulturen wurden in gleicher Art und Weise angesetzt. Vor Animpfen der Hauptkultur wurden 2 ml vorbereitetes XAD-Harz (ist ein hydrophobes polyaromatisches Adsorberharz und wird genutzt um hydrophobe Verbindungen zu binden) hinzugegeben. Die Aufnahme der Wachstumskurve ergab sich ebenfalls durch photometrische Messung bei OD_{600} . Nach 24 h wurde die Kultivierung beendet und der pH-Wert auf 7 eingestellt.

Zur Extraktion genutzte Lösungsmittel waren alle von analytischer Qualität. Der Überstand wurde mit drei Volumenteilen (VT) Ethylacetat ausgeschüttelt und anschließend einrotiert. Der angereicherte Überstand ließ sich in 500 μ l Methanol lösen. Zur Reduktion des Lösemittelvolumens wurden dreimal 30 ml mit je 100 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Um die Zellen und das XAD-Harz zu trennen wurden diese durch einen groben Filter geschüttelt. Durch Zentrifugation bei 8500 rpm für 10 min gelang es die Zellen vom Überstand zu separieren. Die Resuspension der Zellen erfolgte in 30 ml eines Methanol-Aceton-Gemisches (Verhältnis 1:1), Anschließend fand der Zellaufschluss für 15 min im Ultraschallbad statt. Darauf folgte das mindestens 30 minütige Rühren auf dem Magnetrührer, welches von einer 15minütigen Zentrifugation bei 8500 rpm und RT abgelöst wurde. Der entstandene Überstand stellte den Extrakt dar, welcher wie etwas später beschrieben einrotiert wurde.

Das XAD-Harz wurde in 30 ml Methanol resuspendiert und anschließend 60 min bei RT extrahiert. Nach der 15 min andauernden Zentrifugation bei 8500 rpm und RT konnte der Überstand abgenommen werden. Der Extrakt wurde in gleicher Weise wie der Zellextrakt weiterverarbeitet, was im Folgenden erläutert wird.

Die Extrakte wurden im Rotationsverdampfer einrotiert. Der Rückstand wurde in 500 μ l Methanol gelöst und in Eppis überführt. Um unlösliche Bestandteile abzutrennen folgte ein Zentrifugationsschritt. Im Anschluss daran wurde der Überstand in ein neues Eppi gefüllt und bei -20°C gelagert.

Zur weiteren HPLC-MS-Analyse sollten die Proben verschickt werden. Dazu wurden 200 μ l des Extraktes in ein Glasfläschen überführt und bei RT unter dem Abzug eindampfen gelassen.

Die HPLC-MS-Analysen wurden von Dr. Silke Wenzel in Saarbrücken durchgeführt.

5.4 Zellmanipulation

5.4.1 Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation

Durch einen kurzen elektrischen Impuls wird die Zellmembran bei der Elektroporation so verändert, dass die Zellen DNA aus der Umgebung aufnehmen können. Diese Methode

wird bei vielen verschiedenen Zelltypen eingesetzt. Vor der Elektroporation müssen die Zellen allerdings kompetent für die DNA - Aufnahme gemacht werden.

Herstellung elektrokompetenter Zellen von *E. coli*

Um Gram-negative Zellen elektrokompetent zu machen, bedarf es der Veränderung der Zellmembranstruktur, welche durch Kühlung erreicht werden kann. Auf die niedrige Temperatur reagieren die Zellen mit einem vermehrten Einbau ungesättigter Fettsäuren in die Membran oder mit der Aktivierung ihrer Desaturasen, die gesättigte in ungesättigte Fettsäuren umwandeln. Mit Hilfe beider Mechanismen wird der Einbau stabiler Poren in die Zellmembran begünstigt. Um die Gefahr eines Kurzschlusses zu minimiert, reduzieren eingefügte Waschschrte den Salzgehalt der Zellenumhüllung. (Weaver, 1993)

Tags zuvor:

1. 5 ml LB mit *E. coli* - Zellen als Vorkultur animpfen und ÜN im Schüttelinkubator bei 37 °C wachsen lassen.
2. 500 ml- Schüttelkolben mit 200 ml LB und entsprechendem / n AB.

Am Tag selbst:

3. Vorbereiteten Schüttelkolben (200 ml LB) mit der gesamten Vorkultur animpfen. Hauptkultur bei 37°C, 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 wachsen lassen.
4. 45 mL in vorgekühlte Zentrifugenröhrchen füllen und austarieren.
5. Mindestens 15 min im Eisbad kühlen.
6. Bei 4°C und 4000 g 5 min zentrifugieren.
7. Überstand möglichst entfernen, vorsichtig in je 40 ml eiskaltem 10 % igem Glycerol (Waschpuffer) resuspendieren und erneut zentrifugieren.
8. In 20 ml eiskaltem Waschpuffer resuspendieren, vereinigen. Zentrifugieren.
9. In 20 ml eiskaltem Waschpuffer resuspendieren. Zentrifugieren.
10. In 10 ml eiskaltem Waschpuffer resuspendieren. Zentrifugieren.
11. In verbleibendem Waschpuffer resuspendieren und 40 µl in Eppis aliquotieren.
12. Aliquots bei -24°C lagern.

Elektroporationsprotokoll

Nach der Herstellung der elektrokompetenten *E. coli* - Zellen sind diese zur Durchführung der Elektroporation bereit.

1. Zellen auf Eis auftauen, max. 25 ng DNA hinzufügen und im Eisbad lagern.
2. Pipette mit 1 ml LB- Medium aufziehen.
3. Die Zell / DNA - Suspension in die vorgekühlten Elektroporationsküvetten überführen.

4. Einen Puls mit 2,5 kV bei 200 Ω durchführen und die Zellen sofort im Medium resuspendieren und in ein Eppi überführen.
5. Für 70 min bei 37 °C schütteln.
6. Auf geeigneter Selektionsmedium-Platte ausbringen und ÜN bei 37 °C inkubieren.

5.4.2 Transformation von DNA über natürliche Kompetenz

Herstellung natürlich kompetenter Zellen von *B. subtilis*

Die natürliche Kompetenz ist die Fähigkeit von Zellen, frei im umgebenen Medium vorhandene DNA aufzunehmen. Das bedeutet, dass das Genom von *B. subtilis* über spezielle Gene verfügt, deren Genprodukte für die Erkennung von DNA, deren Aufnahme in die Zelle und Integration durch Rekombination in das Genom, verantwortlich sind (die sogenannten *com*-Gene) (Mueller et al., 1992). Für die DNA-Aufnahme sind in Gram-positiven Zellen bestimmte DNA-bindenden Proteine auf der Zelloberfläche notwendig. Die Präsenz dieser Proteine steht in Wechselbeziehung mit einem zunehmenden Nährstoffmangel. Zur Herstellung natürlich kompetenter Zellen werden daher ab der späten exponentiellen Phase den Zellen die Hauptnährstoffquelle (Casaminoacids (CAA)) entzogen.

Transformationsprotokoll

1. 1 ml Transformationsmedium (4.10.2) mit 20 μ L 5% CAA mit den *B. subtilis* - Zellen als Vorkultur animpfen und ÜN im Schüttelinkubator inkubieren.
2. 1 ml Transformationsmedium mit 20 μ L 5% CAA mit 30 μ L der Vorkultur animpfen.
3. Bei OD₅₀₀ von 1,3 die Kultur mit 1 ml Transformationsmedium verdünnen und für weitere 1,5-2 h inkubieren.
4. Bei Erreichen der Kompetenz 450 μ L der Zellsuspension in ein Eppi geben und 50 μ L linearisiertes Plasmid hinzufügen
5. Inkubation bei 37 °C und 250 rpm für 0,5 h.
6. 100 μ L Expressionsmix (4.10.2) hinzufügen.
7. Inkubation bei 37 °C und 250 rpm für 1 h.
8. Auf geeignetem Selektionsmedium ausbringen und ÜN bei 37 °C inkubieren.

5.4.3 Plasmid - Screening auf Transformanten

Diese Methode besticht durch einen geringen Material- und Kostenaufwand und erlaubt gleichzeitig eine hohe Durchsatzrate. Im Wesentlichen macht man sich hierbei die alkalische Lyse der Zellen zu Nutze.

Zur Zellyse wurden pro zu screenenden Kultur je 5 μ L Suspensions- und Lysispuffer in einem Mikrotiterplatten-Well vorgelegt. Anschließend wurden 10 μ L Zellkultur hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde für 5 min im Thermocycler auf 100 °C erhitzt. Anschließend

wurde jeder Ansatz mit ca. 2 μ l 10 \times DNA-Probenpuffer (4.11.2) versetzt und noch heiß auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen.

5.4.4 Screening auf chromosomale Integration

B. subtilis

Als Ort der chromosomalen Integration wurde der *amyE*-Lokus genutzt. Daher konnten die Amylase-defizienten Stämme einfach und kostengünstig gescreent werden.

Die zu untersuchenden Kolonien wurden auf eine Masterplatte und eine Stärke-Agar-Platte (LB-Agar + 1,5 %Stärke) überführt. Auf der Stärke-Platte wurde eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Die Platten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert.

Die Stärke-Platte wurde mit Lugol'scher-Lösung überschichtet. Negative Kolonien waren weiterhin fähig Amylose abzubauen und bildeten somit Höfe. Positive Kolonien hingegen konnten durch Fehlen des Hemmhofes detektiert werden.

5.5 Arbeiten mit DNA

5.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten wurden nach Sambrook et al. (1989) Agarosegele von 0,8 °C bzw. 1,5 °C verwendet. Die Agarose wurde in 1 \times TBE-Puffer im Mikrowellenherd vollständig gelöst. Nachdem sich die Lösung auf ca. 65 °C abgekühlt hat, wurden 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid zugesetzt und gut durchmischt. Die Lagerung erfolgte bei 65 °C zum sofortigen Gebrauch.

Die fertigen Gele wurden in die mit 1 \times TBE-Puffer gefüllten Laufkammern überführt. Die DNA-Lösungen wurden mit einem geeigneten Probenpuffer (4.11.2) vermischt und in die Geltaschen geladen. Als Referenz wurde ein geeigneter Größenstandard (Abbildung 9.1) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 130 V. Visualisierung und Dokumentation der Auftrennung erfolgte mittels UV-Transilluminator und dessen Kamera- und Phototechnik.

5.5.2 Isolation von Plasmid-DNA

Die Plasmidisolation aus transformierten Zellen geschah nach Anleitung des High Pure Plasmid Isolation Kits von Roche. Die Elution der Plasmide erfolgte mit Elutionspuffer (EP). Ab einer Plasmid-Größe von 10 kb wurde der EP auf 65 °C vorgewärmt. Quantität und Qualität der Eluate wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -20 °C, für den täglichen Gebrauch wurde eine geeignete Menge bei RT gelagert.

Im Fall von *B. subtilis* musste auf Grund der dickeren Zellwand die Zellsuspension nach

dem Resuspensionsschritt für 15 min bei 37°C mit 10 µl Lysozym (20 mg/ml) inkubiert werden. Die weitere Behandlung erfolgte nach Herstellerangaben.

5.5.3 Isolation von chromosomaler DNA

Die Isolation chromosomaler DNA aus *B. subtilis* - Stämmen erfolgte unter Nutzung des High Pure PCR Template Preparation Kits von Roche nach Anleitung des Herstellers. Die Lagerung der chromosomalen DNA erfolgte bei -20 °C sowie für den täglichen Gebrauch bei RT.

5.5.4 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Teilweise war es notwendig DNA-Fragmente nach ihrer Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese aus dem Gel zu reinigen. In diesem Fall wurde stets der gesamte DNA-Ansatz (aus PCR-, Restriktions-Reaktionen etc.) auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde/n die gewünschten Bande/n mittels eines mit Ethanol gereinigten Skalpell auf dem UV-Transilluminator ausgeschnitten und in Eppis überführt.

Um DNA-Schäden zu verhindern, wurde auf eine möglichst kurze Belichtung mit UV-Licht geachtet. Im Idealfall wurde ein kleiner Teil des Ansatzes in eine benachbarte Gel-tasche geladen und nur dieser mit UV-Licht bestrahlt. Nach Markierung der gesuchten Bande wurden beide Gelhälften nebeneinander gelegt und die Schnittstelle auf das Gel, welches noch keinem UV-Licht ausgesetzt war, übertragen.

Die Reinigung des /der Gel-Stücke/s erfolgte nach Anleitung des QIAquick Gel Extraction Kits von Qiagen.

5.5.5 PCR

Primer-Design

Für das Primer-Design galt es einige Gesichtspunkte zu beachten:

1. ca. 20 zum Template korrespondierende Basen
2. am 3'-Ende mit G oder C endend
3. GC-Gehalt der Forward- und Reverse-Primer etwa gleich und zwischen 50 und 60 %
4. nicht mehr als 3 gleiche Basen hintereinander
5. keine Gruppen von mehr als 3 komplementären Basen (Loop- und Dimer-, Bildung)

Nicht in allen Fällen war eine Optimierung der Primer-Sequenz möglich.

Standard - Protokolle

Sollten Produkte weiterverwendet werden (z.B. als Template), wurden die dafür notwendigen Reaktionen mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase durchgeführt. Diese Polymerase arbeitet sowohl zügig als auch sehr genau. Test-PCRs, z.B. zur Überprüfung der chromosomalen Integration, wurden dagegen mit der kostengünstigeren *Taq*-Polymerase durchgeführt.

Standard - Protokoll: Phusion High - Fidelity DNA Polymerase

Phase	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	1,5 min
Zyklus-Denaturierung	98 °C	30 s
Zyklus-Annealing	60 °C	30 s
Zyklus-Elongation	72 °C	30 s pro kb
Finale Elongation	72 °C	5 - 10 min

Der Zyklus wurde 30 mal wiederholt.

Zur Optimierung wurde dem Ansatz 6 %DMSO beigemischt, um die Annealing - Temperatur der Primer zu reduzieren und / oder ein Temperatur - Gradient genutzt, um die optimale Annealing - Temperatur festzustellen.

Standard - Protokoll: *Taq* DNA Polymerase

Phase	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Zyklus-Denaturierung	95 °C	30 s
Zyklus-Annealing	50 °C	30 s
Zyklus-Elongation	72 °C	60 s pro kb
Finale Elongation	72 °C	5 - 10 min

Der Zyklus wurde 20 - 30 mal wiederholt.

Colony - PCR

Bei der Colony - PCR wird anstelle von isolierter DNA eine Bakterien - Kolonie zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Das erspart die DNA - Isolierung. Im Falle von Gram - positiven Bakterien, ist es Vorbehandlung zum Aufbrechen der Zellwand notwendig. Die einfachste Methode ist es vor Zugabe der *Taq* die Mikrotiterplatte für 2 min in die Mikrowelle zu stellen.

Reinigung von PCR - Produkten

Unter Verwendung des High Pure PCR-Product Purification Kit von Roche laut Herstellerangaben konnten PCR-Produkte, welche keiner weiteren Auftrennung bedurften, direkt aus dem PCR-Ansatz aufgereinigt werden. Lagen neben dem gewünschten auch unspezifische Produkte vor, wurde der PCR-Ansatz mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA wie unter 5.5.4 beschrieben isoliert.

5.5.6 Restriktion

Die Restriktion von Plasmiden und DNA-Fragmenten erfolgte mit Restriktionsendonukleasen, die Überhänge oder glatte Enden produzierten. Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgte für ca. zwei Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Sollte das Produkt mit zwei Enzymen geschnitten werden, welche unterschiedliche Temperaturen benötigten, wurde zuerst das Enzym mit der niedrigen Temperatur inkubiert und im Anschluss daran das zweite Enzym hinzugegeben und bei der höheren Temperatur bebrütet.

5.5.7 Dephosphorylierung von DNA

Schneidet man einen Vektor mit nur einem Restriktionsenzym, entstehen zwei kompatible Enden, welche religieren können. Um das Risiko der Religation zu minimieren, erfolgte das Dephosphorylieren des geschnittenen Vektorrückgrades. In der Reaktion werden die Phosphatreste an dem 5'-Enden der DNA mit Hilfe einer Phosphatase entfernt. Das Insert besitzt noch beide Phosphatreste, sodass diese immer noch mit Vektor-DNA-Strängen ligieren können.

Die Dephosphorylierung erfolgte mit der Shrimp alkalischen Phosphatase (SAP) für mindestens eine Stunde bei 37 °C. Anschließend wurde das Enzyme durch Erhitzen auf 65 °C für 15 min inaktiviert. Um Zeit zu sparen konnte, falls bei der Restriktion ein geeigneter Puffer verwendet wurde, die SAP dem Restriktionsansatz gleich hinzugefügt werden.

5.5.8 Ligation mittels T4 DNA Ligase

Die T4 DNA Ligase verknüpft sowohl glatte als auch überhängende Einzelstrangbrüche. Diese Reaktion wird durch ATP-Verbrauch katalysiert.

Zur Ermittlung der einzusetzenden Mengen an Vektor und Insert wurde beide auf einem Agarosegel aufgetragen und DNA-Menge, besser gesagt das Verhältnis der Mengen zueinander, mittels der Intensität der Banden unter UV-Licht abgeschätzt. Die Ligation wurde mit der T4-Ligase nach Angaben des Herstellers angesetzt und 16 h bei 16 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 65 °C für 10 min inaktiviert. 2 µl des Ligations- bzw. Religationsansatzes wurden in elektrokompetente Zellen von

E. coli transformiert.

5.5.9 SLIC - Sequence and Ligation Independent Cloning

Diese Methode beruht auf der 3' - 5' - Endonuklease - Aktivität der T4 DNA Polymerase. Sie wurde nach folgendem Protokoll angewandt:

1. Vektor mit entsprechendem / n Restriktionsenzym / en schneiden, aufreinigen und mittels Agarose - Gelelektrophorese quantifizieren.
2. Insert - Amplifizierung:
 - Primer mit 30 bp homologem Bereich zu Vektor designen.
 - PCR - Produkt aufreinigen und mittels Agarose - Gelelektrophorese quantifizieren.
3. T4 DNA Polymerase - Verdau: geschnittenen Vektor und PCR - Produkt (im Verhältnis von mindestens 1:3, besser 1:8 oder mehr; wenn vektor nur linearisiert wird 1:100) nach folgendem Schema verdauen. In diesem Schritt werden die single - strand DNA - Überhänge gebildet.

8,7 μ l	Gesamt - DNA				
1,0 μ l	NEB Puffer 2 oder 4	40 min	21 °C	$(1,33 \frac{min}{bp})$	
0,1 μ l	100 x BSA	15 min	75 °C		
0,17 μ l	T4 DNA Polymerase	30 min	37 °C		
		30 min	auf Eis		

4. 5 μ l des Ansatzes wurden elektroporiert.

5.5.10 Homologe Rekombination durch Red / ET - Klonierung

Dies ist eine Methode zur Plasmidkonstruktion um große Genabschnitte mit einem Mal zu integrieren.

1. Konstruktion des Plasmids mit homologen Bereichen zum zu klonierenden Gen (unique Schnittstelle zwischen flanking regions zum Linearisieren notwendig!).
2. Transformation des Red / ET - Expressionsplasmids pRedET

Tag 1:

- a) Einzelkolonie von Platte pickern und in 1 ml - LB - Kultur mit entsprechendem AB im Eppi (mit Loch im Deckel) bei 37 °C und 1000 rpm ÜN inkubieren (bezieht sich auf den Stamm, der das zu klonierende Gen als Cosmid oder Plasmid enthält).

Tag 2:

- a) 30 μ l ÜN - Kultur in frisches Eppi mit 1,4 ml LB und entsprechendem AB überimpfen.
- b) 2 - 3 h bei 37 °C und 1000 rpm kultivieren.
- c) 30 s bei 11.000 rpm und 2 °C pelletieren, Überstand abgießen, in 1 ml eiskaltem 10 % Glycerol resuspendieren (2x), erneut zentrifugieren und Pellet im verbleibenden Überstand (20 - 30 μ l) resuspendieren. Zwischendurch auf Eis lagern.

- d) 1 μl pRedET zu Zellsuspension hinzufügen, mixen, in kalte Küvette überführen, bei 2,5 kV elektroporieren, 1 ml LB (ohne AB) zufügen und in Eppi überführen.
 - e) 70 min bei 30 °C und 1000 rpm kultivieren.
 - f) 100 μl auf LB - Platte mit AB der ÜN - Kultur und Tc ($3 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$; für pRedET) ausstreichen und ÜN bei 30 °C kultivieren.
3. Transformation des Gens durch Red / ET
- Tag 3:
- a) 1 ml LB - ÜN - Kultur von erhaltener Platte (mit entsprechenden AB) im Eppi (mit Loch im Deckel) bei 30 °C und 1000 rpm ansetzen.
- Tag 4:
- a) je 30 μl ÜN - Kultur in zwei frische Eppis mit jeweils 1,4 ml LB und entsprechenden AB überimpfen.
 - b) 2 h bei 30 °C und 1100 rpm kultivieren.
 - c) Zu einem der beiden Eppis 50 μl 10 % L - Arabinose zufügen. Hier findet die Induktion der Red / ET - Expression statt, das zweite Eppi dient als Negativkontrolle.
 - d) 45 min - 1 h bei 37 °C und 1000 rpm kultivieren.
 - e) 30 s bei 11.000 rpm und 2 °C pelletieren, Überstand abgießen, in 1 ml eiskaltem 10 % Glycerol resuspendieren (2x), erneut zentrifugieren und Pellet im verbleibenden Überstand (20-30 μl) resuspendieren. Auf Eis lagern.
 - f) 1-2 μl (100 - 200 ng) des linearen Vektors zur Zellsuspension hinzufügen, mixen, in kalte Küvette überführen, bei 2,5 kV elektroporieren, 1 ml LB (ohne AB) zufügen und in Eppi überführen.
 - g) 70 min bei 37 °C und 1000 rpm kultivieren. Die Rekombination findet an dieser Stelle statt.
 - h) 100 μl (oder Pellet) auf LB - Platte mit AB des Zielplasmids ausstreichen und ÜN bei 37 °C kultivieren.

5.6 Arbeiten mit RNA aus *B. subtilis*

5.6.1 Probennahme

Die Probenname für RNA - Analysen erfolgte wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben.

5.6.2 Zellaufschluss

Mittels RiboLyser erfolgte der Zellaufschluss. Die Methode basiert auf der mechanischen Zerstörung der Zellen.

Die RiboLyser Röhrchen wurden mit ca. 0,25 ml Glaskügelchen, 400 μl saure Phenol-Lösung (4.11.3) und die zuvor in 400 μl Lysis-Puffer (4.11.3) resuspendierten Zellen gegeben. Durch die Behandlung kann es zu einer Hitzeentwicklung kommen, deshalb sollte die Behandlung so kurz wie möglich gewählt und die Zellen zügig wieder auf Eis platziert werden. Um die RNase Aktivität zu meiden, wird das saure Phenol hinzugegeben. Zusätzlich erreicht man die Separierung von DNA und RNA. Die DNA sammelt sich bevorzugt in der sauren Phenolphase bzw. der proteinhaltigen Interphase, die RNA in der wässrigen

Oberphase.

Die Proben wurden im Ribolyser für 30 s bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation der Ribolyser-Tubes für 5 min bei 13000 rpm und RT wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in Eppis mit 200 μ l DNase I überführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min bei RT. Die Proben können nun zur RNA-Isolation verwendet oder bei -80 °C gelagert werden.

5.6.3 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA von den lysierten Zellen erfolgte mit Hilfe des King-Fisher-Systems unter Verwendung des MagNA Pure LC RNA-Isolation Kit I- High Performance. Der King-Fisher ist ein semi-automatischer Robotor, welcher in der Lage ist die Schritte des Kits zu automatisieren. Das Prinzip dieses Kits besteht in dem Binden von Nukleinsäuren an magnetische Glaspartikel. Die dabei ebenso bindenden DNA-Moleküle werden durch die hinzugefügte DNase I zerstört.

Die so genannten *tube-strips*, bestehend aus fünf einzelnen Reaktionsgefäßen, wurden wie folgt mit den Lösungen aus dem Kit versehen:

1. Gefäß:
 - a) 200 - 700 μ l Probe
 - b) 200 μ l magnetische Partikel
 - c) 300 μ l Lysis- Bindepuffer
2. Gefäß:
 - a) 300 μ l Lysis- Bindepuffer
 - b) 225 μ l Isopropanol
3. Gefäß:
 - a) 850 μ l Waschpuffer I
4. Gefäß:
 - a) 850 μ l Waschpuffer II
5. Gefäß:
 - a) 100 - 150 μ l Elutionspuffer

Die fertigen RNA-Proben wurden für den weiteren Gebrauch auf Eis gelagert und abschließend bei -70 °C eingefroren.

5.6.4 Nachweis spezifischer mRNA unter Nutzung des Slot Blots

Mit einem Slot Blot kann RNA unabhängig von der Größe detektiert werden. Man erhält ein qualitatives Ergebnis ohne quantitative Aussage. Bis zu 48 Proben können mit dieser Methode parallel untersucht werden, es empfiehlt sich jedoch eine Verdünnung (1:10) mitzuführen. Beim Slot Blot wird die RNA mittels Vakuum auf eine Nylonmembran gebロットet, mit UV-Licht bestrahlt, hybridisiert und schließlich mittels Chemilumineszenz ausgewertet.

Probenvorbereitung

Die RNA-Proben werden unter Eiskühlung in einer Mikrotiterplatte auf eine Endkonzentration von $5 \mu\text{g}$ bzw. $0,5 \mu\text{g}$ pro $100 \mu\text{l}$ mit RNase freiem A. dest. verdünnt.

Blotten

Die Slot Blot Apparatur wurde laut Herstellerangaben vorbereitet. Die zugeschnittene Nylonmembran wurde auf die drei Lagen Filterpapier gelegt und mit A. dest. befeuchtet. Nach dem Zusammenschrauben der Apparatur wurde mittels Vakuumpumpe ein Unterdruck von 40-50 mbar angelegt. Nach dem Überprüfen des Vakuums wurden mittels Mehrkanalpipette zügig je $100 \mu\text{l}$ der vorbereiteten Proben aufgetragen. Waren alle Slots leer, wurde für weitere 5 min Vakuum angelegt. Anschließend wurden mit jeweils $200 \mu\text{l}$ Denaturierungslösung (4.11.3) gespült. Die Lösung sollte 5 min auf den Proben verweilen. Danach wurde mit jeweils $200 \mu\text{l}$ Renaturierungslösung (4.11.3) gespült. Auch diese Lösung sollte 5 min auf den Proben verweilen. Nach weiteren 5 min Vakuum wurden die Nylonmembranen 3 min auf dem UV-Tisch crossgelinkt. Die Membranen wurden bis zur Hybridisierung in einer Plastiktüte im Kühlschrank gelagert.

Hybridisierung

Die Nylonmembranen wurden in Hybridisierungsröhren überführt und eine Stunde bei 68°C im Hybridisierungsofen mit 20 ml Prähybridisierungslösung (4.11.3) gedreht. Dies diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nylonmembran.

In der Zwischenzeit wurden die Sonden zu je 3 ml Prähybridisierungslösung gegeben und durch 15 minütige Inkubation bei 65°C im Wasserbad und anschließender 15 minütiger Inkubation auf Eis denaturiert. Die Prähybridisierungslösung wurde gegen die Hybridisierungslösung mit der Sonde ausgetauscht. Die Hybridisierung fand UN unter ständiger Rotation bei 68°C statt.

Die Hybridisierungslösung mit der Sonde wurde in Falconröhrchen abgefüllt und bis zur Wiederverwendung bei -20°C gelagert.

Um die Membranen von nicht hybridisierten Sondenresten zu befreien, wurden diese ge-

waschen. Zunächst wurden sie 2×5 min mit 50 ml Waschlösung I (4.11.3) bei RT, danach 3×15 min mit 50 ml vorgewärmter RNA - Waschlösung II (4.11.3) bei 68°C gesäubert.

Detektion

Nach dem Waschen der Nylonmembranen wurden sie in Plastikschaalen überführt und nach 5 minütigem Schütteln auf dem Taumelschüttler (100 rpm) in 30 ml Waschpuffer (4.11.3) für 30 min in 30 ml Puffer 2 (4.11.3) zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen geschüttelt.

In der Zwischenzeit wurden weitere 20 ml des vorgewärmten Puffers 2 mit $2\ \mu\text{l}$ des gegen die DIG - Markierung der Sonde gerichteten Antikörpers gemischt. Die Antikörperlösung wurde gegen den Puffer getauscht und für 30 min bei 50 rpm inkubiert. Nach Verwerfen der Lösung wurden durch zweimaliges Schütteln (erst 1 h, danach noch 30 min) mit jeweils 30 ml Waschpuffer bei 50 rpm nicht spezifisch gebundene Antikörper entfernt. Anschließend folgte die Äquilibration für 5 min in 20 ml Puffer 3 (4.11.3).

Die Membranen wurden in einen Kunststoffbeutel gelegt und mit CDP - Star - Lösung ($5\ \mu\text{l}/\text{ml}$ in Puffer 3) luftblasenfrei benetzt. Nach 5 min Inkubation im Dunkeln erfolgte die Detektion der Signale am Lumilmager.

5.7 Proteinaufschluss- und bestimmung

Nach erfolgreicher Kultivierung und Probennahme (siehe Kapitel 5.2.3) gilt es die Proteine zu analysieren. Dazu müssen sie im ersten Schritt aufgeschlossen werden, bevor sie durch das Proteingel näher charakterisiert werden können.

5.7.1 Gewinnung löslicher Proteine

Der Zellaufschluss wurde mit Hilfe des Ribolysers bewerkstelligt. Nach folgendem Schema wurde vorgegangen:

1. Pellet auf Eis auftauen
2. In $300\ \mu\text{l}$ Lysispuffer (4.11.5) resuspendieren
3. Zellsuspension in Ribolyser - Tubes (mit Glasperlen) überführen
4. Zellaufschluss bei $4,5\ \frac{\text{m}}{\text{s}}$ für 45 s
5. 15 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugieren
6. Überstand in neues Eppi, zwischendurch auf Eis lagern

7. Erneut 15 min zentrifugieren
8. Überstand in neues Eppi

5.7.2 Proteinbestimmung

Im Anschluss an den Zellaufschluss erfolgt die photometrische Quantifizierung der Proteine. Dazu wird eine 1:5 Verdünnung des Nanoquant-Konzentrats in A. dest. angesetzt. Eine Eichgerade wird erstellt. Von den Proben wird eine 1:500 Verdünnung hergestellt und anschließend werden 50 μl der Probe mit 200 μl der Nanoquant-Verdünnung vermischt. Eine Dreifachbestimmung ist empfehlenswert. Analog zur Eichgeraden wird die OD_{595} ermittelt. Die Proteinkonzentration kann aus der Kalibriergeraden errechnet werden.

5.7.3 Proteingel

Die Probenvorbereitung sowie Gelvorbereitung und Präparation der Laufkammer wurden nach Empfehlung des Herstellers durchgeführt. Nach dem Beladen der Gele mit den Proben, wurde für eine Stunde eine Spannung von 150 V angelegt. Das Gel wurde danach aus der Gekassette entnommen und gefärbt.

Färbung

Zum Färben der Proteingele wurde eine Coomassie-Färbelösung verwendet (Kapitel 4.11.4). 25 ml dieser Lösung wurden mit dem Proteingel in eine Glasschale gegeben und ÜN auf dem Wipptisch gefärbt. Zum Entfärben wurde mit A. dest. gespült.

5.8 Membranproteinbestimmung

Die Membranproteinbestimmung erfolgte nach abgeschlossener Kultivierung aus den abzentrifugierten Zellen. Die Zellen wurden bis zur Membranproteinbestimmung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der Versuch wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

5.8.1 Protokoll Membranproteinbestimmung

1. Vorbereitung
 - a) tiefgefrorene Bakterienzellpellets zum Auftauen auf Eis lagern
 - b) Zentrifuge für 50 ml-Falcon-Röhrchen und Zentrifuge für Eppis ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) vorkühlen
 - c) Lysis-Puffer ansetzen
 - d) Zellen in 40 ml resuspendieren (50 ml-Falcon)

- e) bei 4°C 5 min bei 9500 rpm abzentrifugieren; Überstand verwerfen, Waschschrift ein bis zwei mal wiederholen

2. Zellaufschluss

- a) Pellet in 1 – 2 ml Lysis-Puffer aufnehmen (Pipettenspitze abschneiden und zum Mischen hoch und runter pipettieren)
- b) in Ribolysertubes überführen (0,25 ml glass beads + 1 ml Probe)
- c) Zellaufschluss durch Ribolyser, 3 * 30 sec, zwischendurch auf Eis lagern
→ anschließend 15 min auf Eis inkubieren
- d) 10 min bei 4°C und 8000 g abzentrifugieren
- e) Überstände (Proteom) in Ultrazentrifugenröhrchen (11 ml Seton Open Top PA-Röhrchen Nr. 5030) vereinigen, ggf. auf mindestens ml mit Lysis-Puffer auffüllen, Pellet (grobe Zelltrümmer) verwerfen
- f) restliches Pellet (im Ribolysertube) in Lysis-Puffer lösen, wie bereits beschrieben abzentrifugieren und Proteom erneut überführen

3. Aufreinigung

- a) Proteinextrakt im Swing out-Rotor (Sorvall TH-641) 60 min bei 4 °C und 100.000 g (29.000 rpm) zentrifugieren (Ultrazentrifugenröhrchen immer auswiegen!)
- b) nach Ultrazentrifugation Überstand (lösliche intrazelluläre Proteine) abnehmen und ggf. bis zur Proteinbestimmung auf Eis lagern
- c) Pellet (Membranfraktion) in 1 ml 4°C kaltem High-Salt-Puffer lösen, in Duall-Homogenisator überführen, auf 8 ml mit High-Salt-Puffer auffüllen, homogenisieren
- d) in 1,5 ml-Eppis überführen, 30 min bei 4 °C schütteln
- e) nach dem Schütteln Suspension wieder in Ultrazentrifugenröhrchen überführen und 60 min bei 4 °C und 100.00 g zentrifugieren (Ultrazentrifugenröhrchen immer auswiegen!)
- f) Überstand verwerfen, Pellet in 1 ml 4°C kaltem alkalischen Puffer lösen, in Homogenisator überführen, auf 8 ml mit High-Salt-Puffer auffüllen, homogenisieren
- g) Homogenat wieder in 1,5 ml-Eppis überführen und 30 min bei 4 °C schütteln, dann in Ultrazentrifugenröhrchen 60 min bei 4 °C und 100.000 g zentrifugieren
- h) Überstand verwerfen, Pellet in 1 ml TEAB-Puffer (triethylammonium bicarbonate, 50 mM, pH 7,8) lösen, in Homogenisator überführen, auf 8 ml mit High-Salt-Puffer auffüllen, homogenisieren, in Eppis überführen, 30 min bei 4 °C

schütteln, in Ultrazentrifugenröhrchen 60 min bei 4 °C und 100.000 g zentrifugieren

- i) währenddessen Proteinbestimmung vorbereiten
- j) Überstand verwerfen, Pellet (gereinigte Membranproteine) in 100 – 200 μ l TEAB lösen, homogenisieren, in Eppi überführen

4. Proteinbestimmung

1D PAGE:

- a) 15 μ g Membranprotein-Extrakt in neues Eppi überführen und mit selbem Volumen 2 x SDS-Probenpuffer auffüllen (Gesamtvolumen pro Slot im Minigel max. 20 – 30 μ l, abhängig vom Gel)
- b) Proben 10 min bei 50 °C denaturieren
- c) 1 μ l Bromphenolblau-Lösung zugeben, auf Minigel auftragen, ca. 10 min bei 150 V laufen lassen, danach 50 min bei 130 V, eventuell länger laufen lassen
- d) Gele in Coomassie-Färbelösung überführen und über Nacht färben

6 Ergebnisse

6.1 Bioinformatische Analyse

Die Auswahl der zu exprimierenden Genkluster erfolgte bereits während der Anfertigung der Arbeit von Kumpfmüller (2008). Es konnten drei putative Polyketidsynthase-Gene aus *Rhodopirellula baltica* ermittelt werden, wovon zwei in dieser Arbeit Einsatz finden. Mittels verschiedener Internettools (Kapitel 4.12) lassen sich durch die Sequenzen die Genkluster näher charakterisieren.

Der bioinformatischen Analyse soll eine funktionelle Analyse nachgeschaltet werden, in der die einzelnen Gene zur Expression gebracht werden sollen (siehe Kapitel 6.2 und 6.3).

6.1.1 RB11975 Analyse

Um einen ersten Eindruck des vorliegenden Genklusters zu erhalten, bietet sich das NCBI-BLAST-Tool an. Für die Sequenz des RB11975-Genklusters erhält man wie zu erwarten eine 100%ige Übereinstimmung für eine Polyketidsynthase aus *Rhodopirellula baltica* SH 1 (dies ist der Stamm aus dem das Gen entnommen wurde) sowie eine annähernd 100%ige Übereinstimmung mit einer „protein containing Beta-ketoacyl synthase“ aus *Rhodopirellula baltica* SH 28 und einer Typ I PKS aus *Rhodopirellula baltica* WH 47 (Tabelle 9, im Anhang).

RB11975 ist ein 2471 AS langes Protein mit einem Gewicht von 269 kDa. Es besteht aus einem Modul, welches in 7 Domänen unterteilt werden kann. Die Abfolge der Domänen lautet: Ketosynthase, Acyltransferase, Dehydratase, Enoylreduktase, Ketoreduktase, Thiolationsdomäne und Terminationsdomäne (siehe Abbildung 6.1). In der Abbildung 9.5 ist auch die vorausgesagte dreidimensionale Struktur des Proteins enthalten.

Eine Vorhersage des Metaboliten ist nicht direkt möglich. Fetszustellen ist lediglich, dass eine vollständige Reduktion der Ketogruppe zu -C-C- stattfindet.

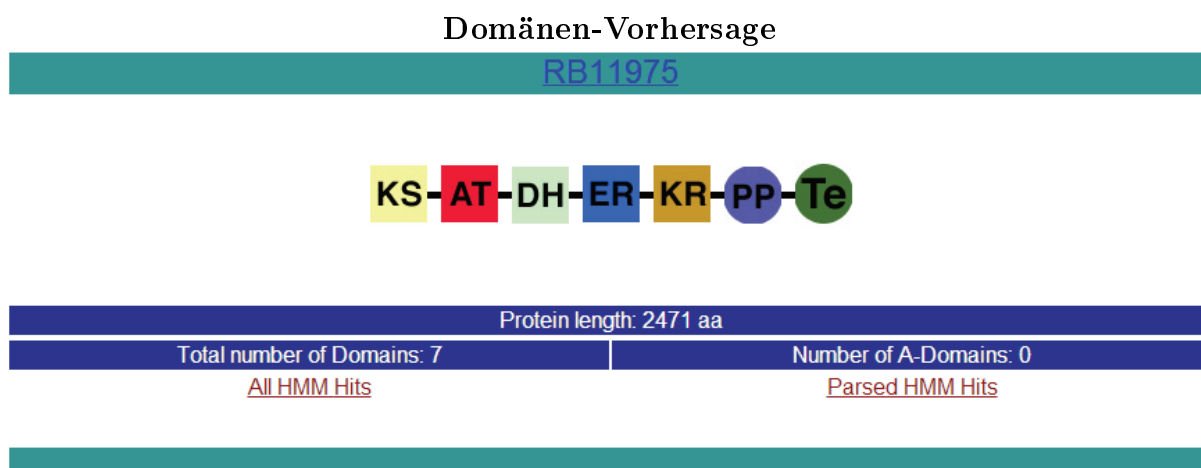


Abbildung 6.1 Domänenvorhersage für RB11975.

6.1.2 RB6500 Analyse

Über das *RB6500* - Gen erfährt man mittels NCBI-BLAST-Tool, dass es für eine Myco-cerosate-Synthase in *Rhodopirellula baltica* SH 1 kodiert, was nicht weiter verwunderlich ist, da das Gen aus diesem Stamm amplifiziert wurde. Darüber hinaus wurden Ähnlichkeiten zu einer PKS in *R. baltica* SH 28 und WH 47 gefunden und auch Übereinstimmungen zu JamL in *Lyngbya majuscula* (Tabelle 9, im Anhang). Das Gen ist Teil eines 13,1 kb großen Operons, das zusätzlich auch für die Gene *RB6502* und *RB6499* codiert, welche im Folgenden noch erläutert werden.

RB6500 ist aus zwei Modulen aufgebaut, die insgesamt aus zehn Domänen bestehen. Die Abfolge dieser Domänen ist: Ketosynthase, Acyltransferase, Dehydratase, Enoylreduktase, Koreduktase, Thiolations-, Kondensations-, Adenylierungs-, Thiolations- und Terminationsdomäne (siehe Abbildung 6.2). Eine 3D-Struktur wie bei RB11975 konnte nicht erzeugt werden, da das Tool nur für PKS ausgelegt ist.

RB6500 ist ein 3665 AS langes Protein, welches ein Gewicht von ca. 400 kDa aufweist. Über den voraussichtlichen Metaboliten kann gesagt werden, dass als Substrate Phenylalanin und Malonyl-CoA genutzt werden, eine vollständige Reduktion der Ketogruppe stattfindet und die Amidbindung noch bestehen bleiben müsste (Abbildung 6.3). Anhand der Substrate kann eine Ähnlichkeit zu Chloramphenicol (Cm) abgeleitet werden. Diese Vermutung wird durch die Anwesenheit der putativen Chloramphenicolresistenz (RB6499) und den Transporter (RB6502) gestützt. Um die Ähnlichkeiten zu verdeutlichen, sind in Abbildung 6.4 der putative Metabolit, Phenylalanin und Chloramphenicol dargestellt.

Domänen-Vorhersage

RB6500



Protein length: 3665 aa

Total number of Domains: 10

Number of A-Domains: 1

[All HMM Hits](#)[Parsed HMM Hits](#)

A-domain	Coordinates A3-A6	Residues in the Binding Pocket	Prediction
A-domain 1	2905 3114	ALIGN D A G V W G C V	PRED NO HIT

THE PREDICTIVE BLAST SERVER FOR NRPS 8AA MOTIF

Abbildung 6.2 Domänenvorhersage für RB6500.

Substrat-Vorhersage

query motif	QQGHSVGRFHHGV
match motif	QQGHSVGRFHAQV
predicted specificity	Malonate

Protein Identifier	Adenylation domain start position	Adenylation domain end position	Substrate	Substrate Name	Score?	Prediction-conditioned fallout?
rb6500	2790	3185	F	Phenylalanine	236.4	0.1477

Abbildung 6.3 Substratvorhersage für RB6500 durch NRPSsp (unten) und SBSPKS (oben).

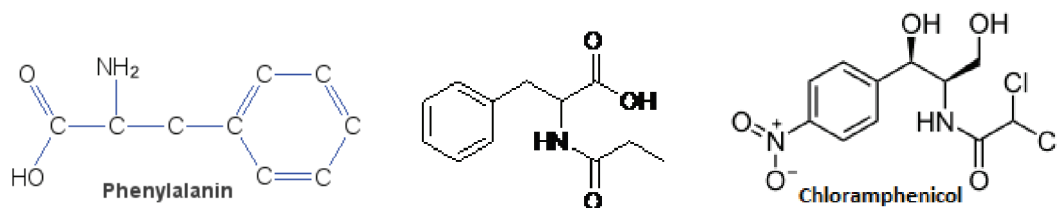


Abbildung 6.4 Phenylalanin (links), vermuteter Metabolit des RB6500-Klusters (in der Mitte) sowie Chloramphenicol (rechts)

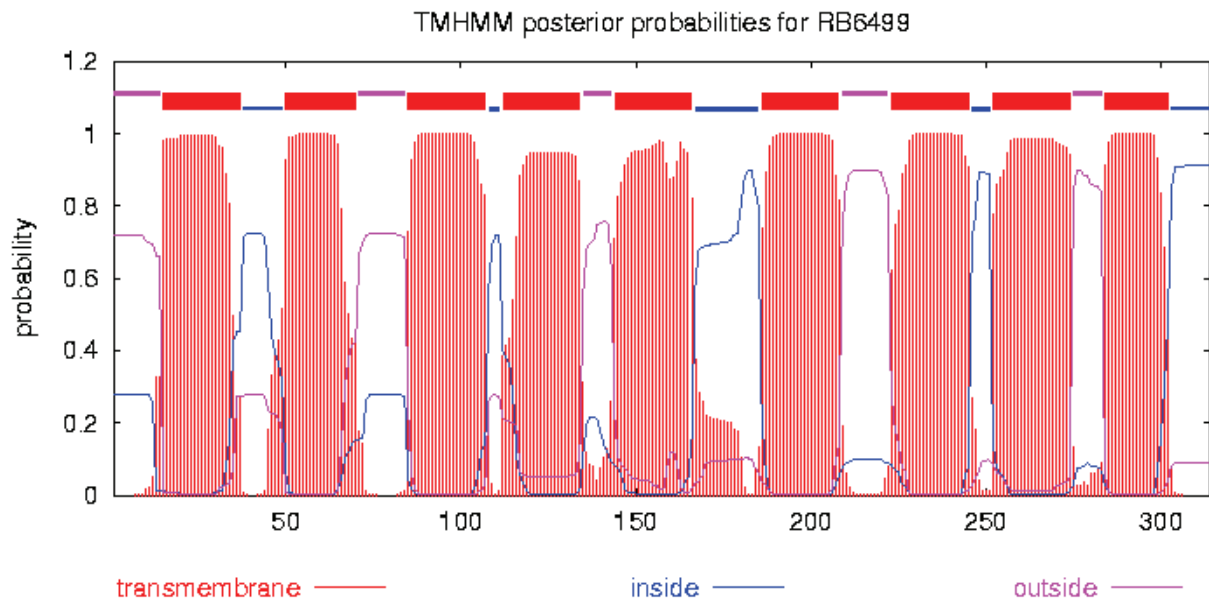


Abbildung 6.5 Transmembrane Strukturen von RB6499.

RB6499 Analyse

Wie bereits erwähnt gehört das *RB6499*-Gen zusammen mit den Genen *RB6500* und *RB6502* zu demselben Operon. Durch das NCBI-BLAST-Tool erfährt man, dass die Proteinsequenz von RB6499 zu einem RarD Protein aus *R. baltica* SH 1 gehört, welches durch Ausschleusung des Cms die Resistenz des Organismus bewirkt. Außerdem weist die Sequenz Ähnlichkeiten zu RarD Proteinen anderer *R. baltica*-Stämme und auch zu einem DMT Transporter aus *Shewanella woodyi* auf. RB6499 ist wahrscheinlich ein Transporter, welcher der Superfamilie DMT zugehörig ist und möglicherweise sowohl Cm als auch andere Verbindungen transportiert. Somit könnte die Existenz von RB6499 damit begründet werden, dass dieser für den Transport des RB6500-Metaboliten verantwortlich ist.

Die Analyse auf transmembrane Strukturen ergab, dass das Protein fast zur Gänze innerhalb der Membran zu finden ist. Lediglich geringe Teile des Proteins erheben sich in den extrazellulären Bereich hinein (siehe Abbildung 6.5).

RB6502 Analyse

Laut BLAST-Analyse kodiert das RB6502-Gen für eine Permease in *R. baltica* SH 1 und eine ABC Transporter Permease in *R. baltica* WH 47 und SH 1 (Tabelle 9, im Anhang), wobei als Multi-Domäne SalY angegeben wird. RB6502 scheint daher ein ABC Transporter

für antimikrobielle Peptide zu sein, was in Anbetracht der vorhergesagten Metabolitenstruktur stimmig erscheint. Auch die Analyse transmembraner Strukturen zeigt, dass ein Großteil des Proteins in der Membran eingebettet ist (siehe Abbildung 6.6).

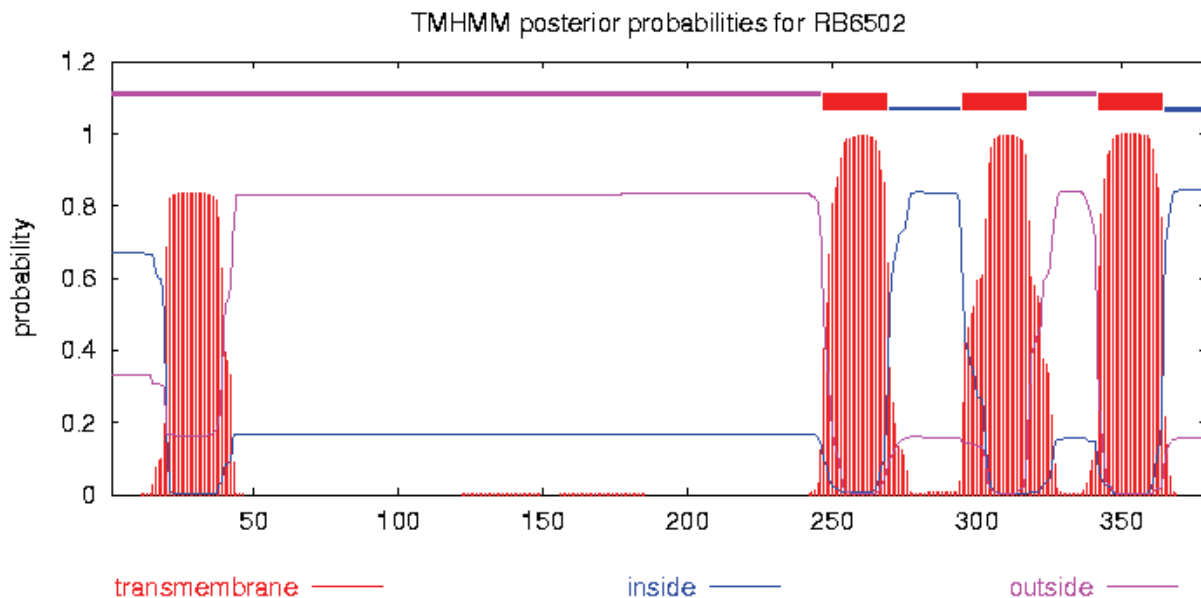


Abbildung 6.6 Transmembrane Strukturen von RB6502.

6.2 RB11975

Das bereits bioinformatisch beschriebene Gencluster RB11975 wurde vor Beginn dieser Arbeit erfolgreich von J. Kumpfmüller in *B. subtilis* integriert. Der fertige Stamm trägt die Bezeichnung BsJK206. Er ist *srfA*⁻ und *sfp*⁺ (siehe Abbildung 6.7). Als Promotor wurde der induzierbare *P_{acoA}* (Kapitel 5.1) genutzt. Im Vorfeld wurden dazu keine Expressionsversuche unternommen.

Wenn keine Veränderungen erwähnt werden, wurden die Kultivierungen mit Probenahme und anschließender Proteinbestimmung laut Protokoll durchgeführt (siehe Kapitel 5.2.3). Die Plasmidkarten der verwendeten Vektoren sind im Anhang (Abbildung 9.2 bis 9.4) und auf der beigefügten CD zu finden.

6.2.1 Expressionsversuche von BsJK206

Die erste Kultivierung von BsJK206 diente der Aufnahme einer Wachstumskurve, sowie der Probenahme für RNA- und Proteinanalysen. Als Referenz wurde der Stamm BsJK29 parallel kultiviert. In Abbildung 6.9 kann man erkennen, dass das Wachstum von

BsJK206 direkt nach der exponentiellen Phase einen Einbruch zu verzeichnen hat. Dies kann durch Umstellung des Stoffwechsels (Beginn der Expression) zu erklären sein.

Es wurde mit den genommenen Proben laut Protokoll verfahren (siehe Kapitel 5.7 und 5.6.4). Der RB11975-m-RNA-Nachweis von BsJK206 war erfolgreich und die erwarteten Banden bei ca. 270 kDa waren ebenfalls deutlich auf dem Proteingel erkennbar (siehe Abbildung 6.7, 6.8 und 6.9). Die Banden wurden ausgeschnitten und mittels MS eindeutig als RB11975 identifiziert (siehe Abbildung 6.10).

Im nächsten Schritt wurde eine Kultivierung zur Metabolitenbestimmung (siehe Kapitel 5.3) durchgeführt. Dabei sollten mit Hilfe der Referenz Unterschiede in den Spektren festgestellt werden. Die Extrakte wurden zur Analyse verschickt. Die Detektion eines Metaboliten per HPLC-MS-Analyse war nicht möglich.

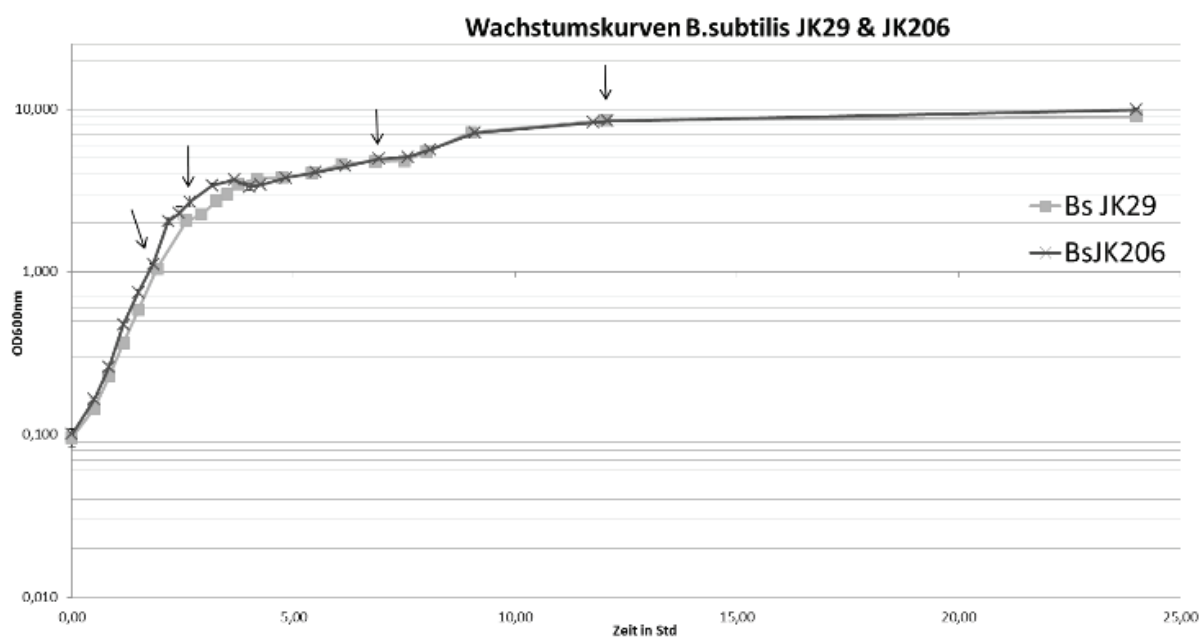


Abbildung 6.7 Wachstumskurven von BsJK29 und BsJK206. Die Pfeile indizieren die RNA- und Proteinprobenahme.

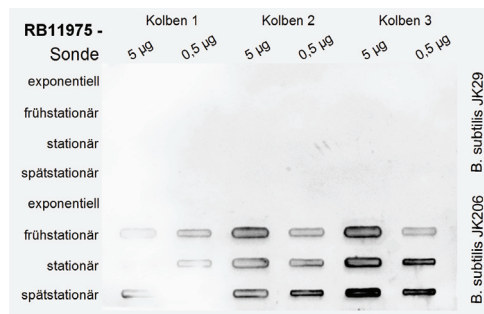


Abbildung 6.8 Slot Blot von BsJK29 und BsJK206 zum spezifischen Nachweis des RB11975-Transkriptes.

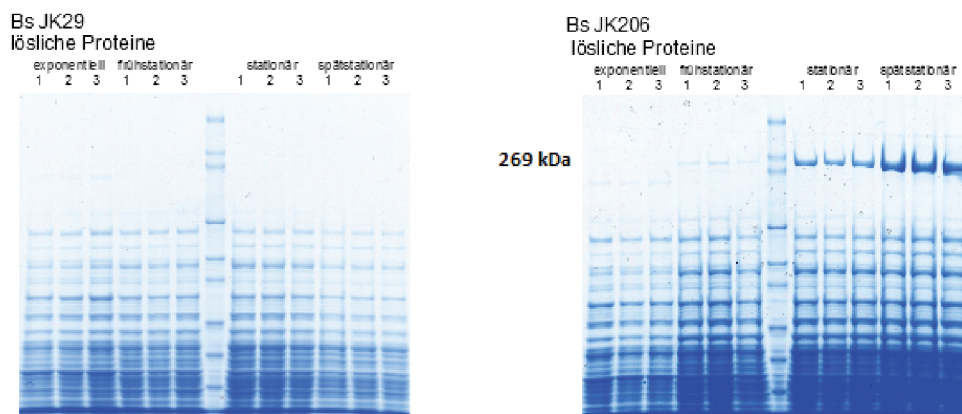


Abbildung 6.9 Proteingele von BsJK29 und BsJK206. Die Nummerierungen stehen für die drei parallel kultivierten Kolben.

Accession	Description	Mass	Isoelectric point	Spot	Score	Ions score	Sequence coverage percent	Sequence coverage percent ms ms	Sequence coverage percent ms ms sig	Number of peptides	Peptides with ions score
gi 32477259	polyketide synthase [Rhodopirellula baltica SH 1] *gi 32447810 emb CAD77328.1 polyketide synthase	3E+05	4,87	E21	354	161	17,52	2,43	0	39	5

Abbildung 6.10 MS-Daten der Proteingelproben von BsJK206. Ab einem Score von 50 gilt das Protein als identifiziert.

6.2.2 *sfp* - Knockout in BsJK206

Um zu überprüfen, ob das von BsJK206 produzierte Protein von Sfp erkannt und aktiviert wird (Kapitel 2.2.4), sollte ein *sfp*-defizienter Stamm (BsJK211a) konstruiert und anschließend parallel zu BsJK206 kultiviert werden. Mittels MS sollten Proben aus den erhaltenen Proteingelen analysiert und miteinander verglichen werden. Nach Möglichkeit sollte mit der MS der angehängte Phosphopantetheinylrest (PPRest) nachgewiesen werden.

Konstruktion von pJK235

Das Plasmid pJK235 dient dem Knockout von *sfp*. Amplifiziert wurde der *sfp*⁰-Bereich aus BsJK13 unter den in der den Erklärungen folgenden Abbildung gezeigten Bedingungen. Über die Methode des SLICens (Kapitel 5.5.9) wurde das PCR-Produkt mit dem mit NaeI und XhoI geschnittenen Plasmid (pJK64a) fusioniert. Nach einer Colony-PCR mit den Primern 5285 und 5131 (1771 bp) wurden von vier positiven Kolonien das Plasmid isoliert und eine Testrestriktion durchgeführt. Bei der Test-Restriktion mit NaeI und XhoI diente das Ausgangsplasmid pJK64a als Referenz. Die Test-Restriktion ist der unten aufgeführten Tabelle zu entnehmen. Zur eindeutigen Kontrolle wurde der Bereich mit dem Frameshift eines positiven Plasmids durch Sequenzierung überprüft. Das Ergebnis der Sequenzierung lieferte die Gewissheit, dass *sfp*⁺ erfolgreich gegen *sfp*⁰ ausgetauscht werden konnte. Eine zusätzliche Punktmutation durfte vernachlässigt werden, da *sfp*⁰ sowieso nicht intakt ist.

Tabelle 6.1 PCR für pJK235.

Amplifikat	Template	Polymerase	Primer		Annealing - Temperatur	Größe	Fusions- Partner
			For-	Rev-			
<i>sfp</i> ⁰	BsJK13	<i>Taq</i>	5448	5449	50 °C	2232 bp	pJK64a (NaeI+XhoI)

Tabelle 6.2 Testrestriktion pJK235.

Plasmid	Referenz	Restriktions - Enzym/e	Größen	
			Plasmid	Referenz
pJK235	pJK64a	NaeI, XhoI	6289 + 2172 bp	6289 + 2917 bp

Konstruktion von BsJK211a

Das Knockout - Plasmid pJK235 wurde zur leichteren Detektion positiver Kolonien in die zur Hämolyse fähigen Vorstufe von BsJK206 in BsJK205 ($srfA^+$, sfp^+) transferiert. Die Transformation verlief erfolgreich, was sowohl mittels Colony - PCR als auch auf Blutagarplatten bestätigt werden konnte. Allerdings war es nach der Cre - Induktion nicht möglich Spectinomycin-sensitive Kolonien zu erhalten. Da dies keine Auswirkungen auf die weiteren Versuche hatte, wurde dieser Schritt aus zeitlichen Gründen nicht wiederholt. Durch Sequenzierung des sfp^0 - Bereichs konnte sichergestellt werden, dass dieser Stamm keine PKS / NRPS - Aktivierung erfahren kann.

6.2.3 Proteinbestimmung

Wie erwartet zeigte das Proteingel von BsJK206 das gleiche Muster wie im vorangegangenen Versuch. Deutlich sind die stärker werdenden Banden bei 269 kDa zu erkennen. Auf dem Proteingel von BsJK211a sind zusätzlich Banden in einer Höhe von ca. 400 kDa sichtbar. Die Vermutung, dass es sich dabei um Proteine der Surfactin - Synthese (SrfA - A) handelt, wurde durch die MS bestätigt. Die Banden bei 269 kDa wurden eindeutig als Protein RB11975 identifiziert. Auf eine mRNA - Analyse wurde in diesem Fall verzichtet, da das Protein eindeutig nachgewiesen werden konnte und dem das Vorhandensein der mRNA zu Grunde liegt. Ein Nachweis des PP - Restes war mit der verwendeten Methode leider nicht möglich. Mittels einer sensitiveren MS sollte dies jedoch durchführbar sein. Aus zeitlichen Gründen war es nicht möglich die Analyse während der Anfertigung dieser Arbeit auszuführen.

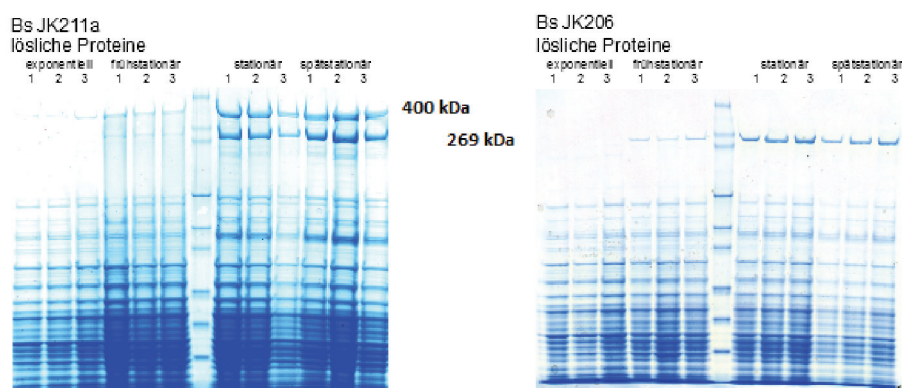


Abbildung 6.11 Proteingele von BsJK206 (rechts) und BsJK211a (links). Die Nummerierungen stehen für die drei parallel kultivierten Kolben.

6.3 RB6500

Das gesamte Operon RB6500 wurde ebenfalls bereits vor Beginn dieser Arbeit erfolgreich in *B. subtilis* transferiert. Erste Expressionsversuche des Stammes BsJK41 blieben in der Vergangenheit ohne Erfolg. Die mRNA war nachweisbar, jedoch kein Protein (unveröffentlichte Daten). Eine Methode zur weiteren Analyse des Klusters bot die Membranproteinbestimmung (siehe Kapitel 5.8).

Ein anderer Ansatz, welcher verstärkt verfolgt wurde, bestand darin, *RB6500* ohne die beiden anderen zum Operon gehörigen Gene zu untersuchen. Dazu wurde ein entsprechender Stamm konstruiert (BsJK210) welcher Expressionsversuchen unterworfen werden konnte.

6.3.1 Integration in Teilschritten

Zunächst wurde die Methode verfolgt, dass das Gen in zwei Teilen integriert wird, mit vorgeschaltetem *acoA*-Promotor.

Den Erklärungen folgenden Tabellen sind die PCR-Bedingungen und die Testrestriktionen zu entnehmen.

Plasmidkonstruktion

Konstruktion von pJK203

Das Plasmid pJK202 enthält *RB6500II* und wurde mittels SLIC gebaut. Dazu wurde unter Zuhilfenahme der Phusion-Polymerase mit den Primern 5403 und 5404 das 6010 bp lange Insert aus pSB5 amplifiziert. Als Vektor diente das mit XhoI geschnittene Plasmid pJK201. Eine Testrestriktion (Abbildung 6.12) sowie eine Colony-PCR bestätigten die Korrektheit des Plasmids, was durch die Sequenzierung untermauert wurde.

Konstruktion von pJK203

Das vordere Stück von *RB6500* wurde mit den Primern 5405 und 5406 aus pSB6 amplifiziert. Da das Insert eine Länge von 5864 bp aufwies, wurde auch bei dieser PCR die Phusion-Polymerase verwendet. Über SLIC konnte das Plasmid pJK203 problemlos erhalten werden. Über Colony-PCR und eine Testrestriktion (Abbildung 6.12) wurde das Plasmid kontrolliert, sowie auch durch Sequenzierung.

Der Einbau des *acoA* Promotors vor *RB6500I* war nicht möglich, sodass eine andere Konstruktion versucht werden musste.

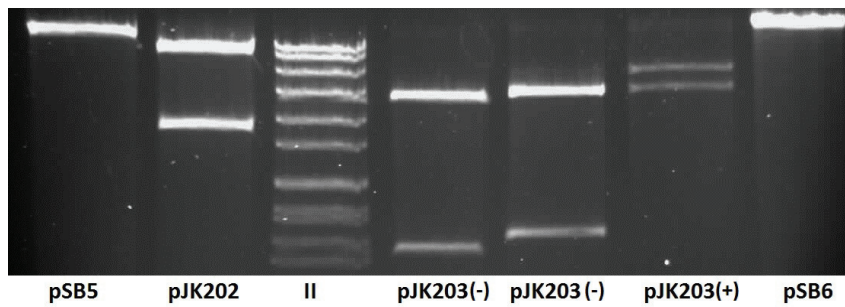


Abbildung 6.12 Testrestriktionen von pJK202 und pJK203.

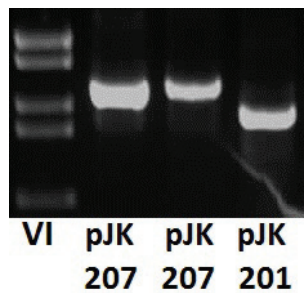


Abbildung 6.13 Colony-PCR von pJK207.

Konstruktion von pJK207

Das Plasmid pJK207 soll in Zukunft die Konstruktion von Integrationsplasmiden mit dem *acoA* Promotor beschleunigen. Als Ausgangsplasmid zum Bau von pJK207 diente pJK201 in welches der Promotor eingebaut werden sollte. *PacoA* wurde aus BsJK41 mit den Primern 5413 und 5414 amplifiziert. Mittels SLIC wurde das PCR-Produkt in den mit *XhoI* geschnittenen Vektor eingebaut. Mittels Colony-PCR und Testrestriktion (*NdeI*, *Sall*; Abbildung 6.14) wurde der Einbau bestätigt. Die Sequenzierungsergebnisse waren ebenfalls positiv.

Konstruktion von pJK208

Ausgehend von dem Plasmid pJK207 entstand pJK208. das Plasmid war dafür gedacht, den *acoA*-Promotor vor das bereits chromosomal integrierte *RB6500*-Gen zu bringen. Aus dem Plasmid pJK 203 wurde der Frontbereich (605bp) von *RB6500I* amplifiziert. Mittels PCR und durch den Gebrauch der *Opti Taq* und den Primern 5415 und 5416 gelang es dieses Stück zu erhalten. Das PCR-Produkt wurde mit dem mit *NdeI* und *Ms*

cl geschnittenen Plasmid pJK207 über SLIC verknüpft. Eine Colony-PCR (Primer 5285 und 5414; 957 bp), eine Testrestriktion (Abbildung 6.14) mit EcoRV und die anschließende Sequenzierung lieferten den Beweis zur Korrektheit des Plasmids.

Tabelle 6.3 PCRs für pJK202, pJK203, pJK207 und pJK208.

Ziel- Plasmid	Poly- Template	Poly- merase	Amplifikat	Primer		Tempe- ratur	Größe	Fusions- Partner
				For-	Rev-			
pJK202	pSB5	Phusion	<i>RB6500II</i>	5403	5404	60 °C	6010 bp	pJK201 (XhoI)
pJK203	pSB6	Phusion	<i>RB6500I</i>	5405	5406	60 °C	5864 bp	pJK207 (XhoI, MscI)
pJK207	BsJK41	<i>Taq</i>	<i>PacoA</i>	5413	5414	50 °C	334 bp	pJK201 (XhoI)
pJK208	pJK203	<i>Taq</i>	<i>RB6500I</i> -Front	5415	5416	50 °C	605 bp	pJK207 (NdeI, MscI)

Tabelle 6.4 Testrestriktionen von pJK202, pJK203, pJK207 und pJK208.

Plasmid	Referenz	Restriktions - Enzym/e	Größen	
			Plasmid	Referenz
pJK202	pSB5	XbaI	8259 + 335 bp	13800 bp
pJK203	pSB6	XhoI	5779 + 4582 bp	13717 bp
pJK207	pJK201	NdeI, SalI	3920 + 1968 bp	linearisiert
pJK208	pJK207	EcoRV	3038 + 2330 bp	3361 + 2330 + 197 bp

Stammkonstruktion

Die Integration des Plasmids pJK202 (enthält *RB6500II*) in BsJK13 über natürliche Kompetenz (Kapitel 5.4.2) war erfolgreich, was mit Hilfe einer geeigneten Colony-PCR bestätigt werden konnte. Nach erfolgter Rekombination der lox-sites sollte *RB6500I* in den erhaltenen Stamm BsJK207 integriert werden. Dies war trotz stetiger Bemühungen nicht möglich, sodass über weitere Möglichkeiten nachgedacht wurde.

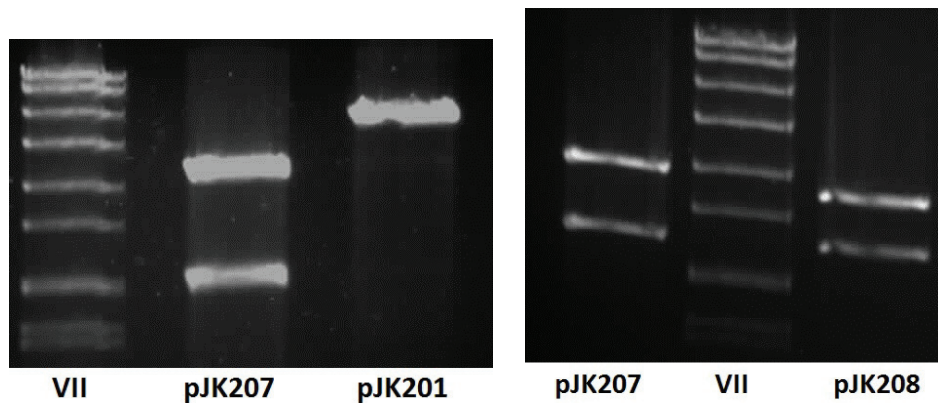


Abbildung 6.14 Testrestriktionen von pJK207 und pJK208.

6.3.2 Integration in einem Schritt

Die Red / ET-Klonierung sollte das Problem lösen. Parallel dazu entstanden bereits die Integrationsplasmide pJK207 und pJK208.

Plasmidkonstruktion

Konstruktion von pJK215

Das Plasmid pJK215 wurde mittels Red / ET-Rekombination gebaut. Das Ausgangs-plasmid musste so geplant werden, dass die Front- und Back-Bereiche (jeweils 150-500 bp) durch eine Bluntschnittstelle wieder getrennt werden können. Die homologen Bereiche wurden aus den bereits konstruierten Plasmiden pJK202 und pJK208 amplifiziert. Über SLIC wurde der RB6500 - Back - Bereich (Primer 5402 und 5420; 316 bp) aus pJK202 mit dem mit XhoI geschnittenen Plasmid pJK201 zusammengefügt. Es entstand pJK213. Ebenfalls über SLIC wurde versucht den RB6500 - Front - Bereich samt *PacoA* (Primer 5414 und 5421; 767 bp) aus pJK208 in das mit XhoI geschnittene Plasmid pJK213 einzubauen. Auch nach DpnI - Verdau war dies nicht möglich. Daher wurde dieses Plasmid über Ligation konstruiert. Für die Ligation wurde eine Phusion - PCR mit pJK208 und den Primern 5421 und 5032 durchgeführt. Nach der Restriktion mit XhoI, NheI und DpnI wurde das PCR-Produkt mit dem geschnittenen Vektor pJK213 (XhoI und NheI) ligiert. Das neu entstandene Plasmid pJK214 mit SnaBI - Schnittstelle zwischen Front- und Back-Bereich wurde mittels Test - Restriktion und Sequenzierung bestätigt. Die anschließende Red / ET - Klonierung wurde laut dem Protokoll in Kapitel 5.5.10 durchgeführt. Als Träger des gesamten RB6500 - Gens wurde pSC - B - Mb genutzt. Das resultierende 16,9 kb große Plasmid pJK215 wurde mittels Colony - PCR und Test-

Restriktion überprüft und zur Kontrolle der korrekten Insertion ansequenziert.

Tabelle 6.5 PCRs für pJK213 und pJK214.

Ziel- Plasmid	Template	Poly- merase	Amplifikat	Primer		Tempe- ratur	Größe	Fusions- Partner
				For-	Rev-			
pJK213	pJK202	<i>Taq</i>	<i>RB6500</i> -Back	5403	5420	50 °C	316 bp	pJK201 (XhoI)
pJK214	pJK208	Phusion	<i>RB6500I</i> -Front	5421	5032	60 °C	3082 bp	pJK213 (XhoI)

Tabelle 6.6 Testrestriktionen pJK207 und pJK208.

Plasmid	Referenz	Restriktions - Enzym/e	Größen Plasmid	Referenz
pJK213	pJK201	NaeI, XhoI	4718 + 1152 bp	4805 + 896 bp
pJK214	pJK213	StuI	4348 + 2229 bp	3641 + 2229 bp
pJK215	pJK214	NarI	8051 + 6379 + 2448 bp	linearisiert

Stammkonstruktion

Konstruktion von BsJK210

BsJK210 ist ein Expressionsstamm, welcher das bereits bioinformatisch beschriebene *RB6500* - Gen (Kapitel 6.1.2) im Genom integriert hat.

Das Plasmid pJK215 wurde über natürliche Kompetenz in BsJK28-2 eingebracht. Dieser Stamm bietet den Vorteil, dass er bereits *sfp*⁺ ist. Nach erfolgreicher Cre - Rekombination erhielt der Stamm die Bezeichnung BsJK209. Anschließend wurde das *srfa* - Gen mit Hilfe des Plasmids pJK191 ausgeknockt. Nach erneuter Cre - Rekombination und Überprüfung durch Sequenzierung war der Stamm BsJK210 bereit für den Expressionsversuch (Kapitel 6.3.2).

Konstruktion von BsJK208

BsJK208 dient als Negativkontrolle zur Überprüfung der Enzymaktivierung in BsJK210, genauso wie BsJK211a für BsJK206. Das bereits konstruierte Plasmid pJK215 (siehe Kapitel 6.3.2) sollte über natürlich Kompetenz in BsJK13 integriert werden. BsJK13 ist im Unterschied zu BsJK28-2 *sfp*⁰. Da die Integration auch nach mehreren Anläufen nicht gelang, wurde in dem Stamm BsJK209 *sfp* mit Hilfe des Knockoutplasmids

pJK235 ausgetauscht. Nach Überprüfung des Knockouts durch geeignete Colony-PCR wurden die lox - sites rekombiniert und eine Sequenzierung veranlasst.

In der nachstehenden Tabelle ist dargestellt, wie *srfA* und *sfp* in den jeweiligen Stämmen vorliegen.

Name	<i>srfA</i>	<i>sfp</i>
BsJK206	–	+
BsJK211a	+	–
BsJK210	–	+
BsJK208	+	–

Tabelle 6.7 Übersicht über das Vorliegen von *srfA* und *sfp* in den verschiedenen Expressionsstämmen.

Expressionsversuche

Nach erfolgreicher Stammkonstruktion wurden die Stämme BsJK208 und BsJK210 laut Protokoll kultiviert, wobei eine Wachstumskurve aufgenommen wurde (Abbildung 6.3.2). Mit Hilfe des Proteingels sollte die Expression von *RB6500* bewiesen werden. Auf dem Proteingel war bezüglich BsJK210 keine zusätzliche Bande in der vermuteten Höhe (400 kDa) zu erkennen. Da bei BsJK208 *srfA* nicht ausgeknockt wurde, war die dafür charakteristische Bande, gleich der im Proteingel von BsJK211a, deutlich sichtbar. Dass es sich um SrfA handelt, konnte durch die aus dem Gel von BsJK208 ausgeschnittenen Banden mittels MS bestätigt werden.

Da RB6500 auf dem Proteingel nicht nachweisbar war, wurde ein Slot Blot zur Detektion der mRNA durchgeführt. Abbildung 6.3.2 bestätigt, dass mRNA in den erwarteten Phasen nachgewiesen werden konnte.

6.4 RB6499 und RB6502

6.4.1 Membranproteinbestimmung

BsJK41 wurde gemeinsam mit seiner Referenz BsJK14 für die Membranproteinbestimmung kultiviert. In Abbildung 6.17 sind die Wachstumskurven der beiden Stämme zu sehen. Eine Auffälligkeit wie beispielsweise in dem Kurvenverlauf von BsJK206 war nicht erkennbar.

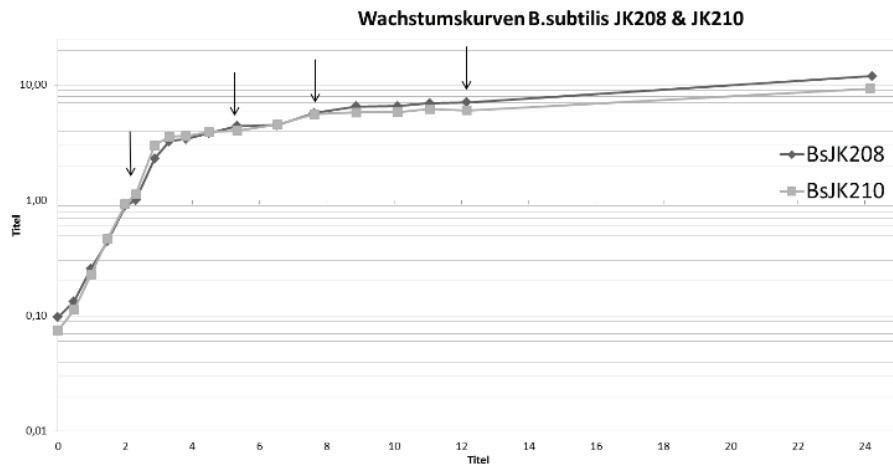


Abbildung 6.15 Wachstumskurve von BsJK208 und BsJK210. Die Pfeile indizieren die RNA- und Proteinprobennahme.

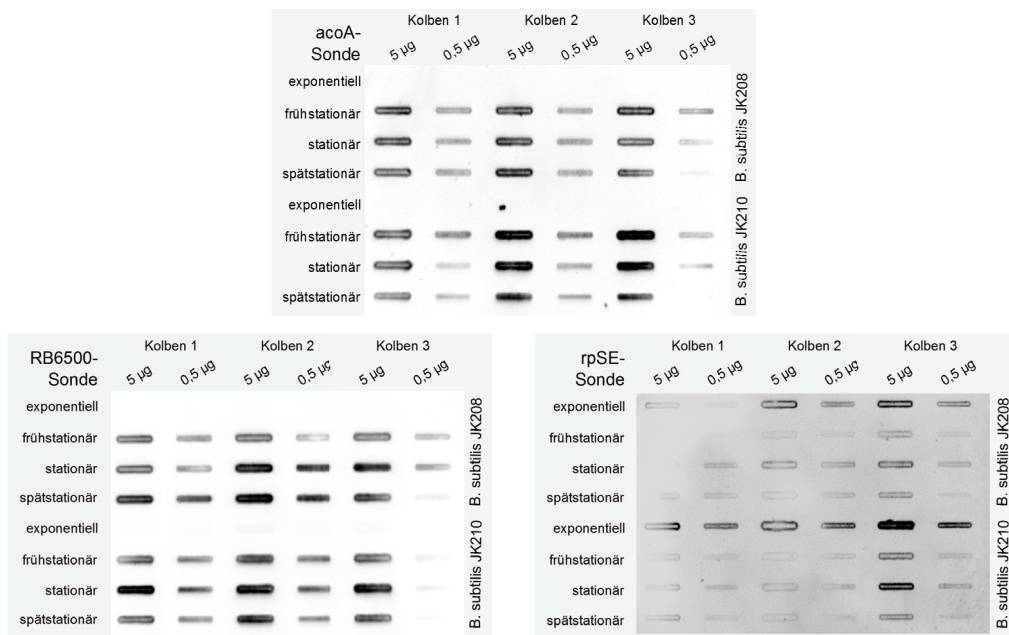


Abbildung 6.16 Slot Blot-Bilder von BsJK208 und BsJK210 zum spezifischen Nachweis der acoA-, RB6500- und rpSE-Transkripte.

Tabelle 6.8 Durch Sequenzierung überprüfte Bereiche und der gewählte Dienstleister

Name	Bereich	Firma
pJK202	<i>RB6500</i> II, T7-Terminator	LGC
pJK203	<i>RB6500</i> I	LGC
pJK207	<i>PacoA</i> , T7-Terminator	LGC
pJK208	<i>PacoA</i> , <i>RB6500</i> I-Front	LGC
pJK213	<i>RB6500</i> -Back	LGC
pJK214	<i>PacoA</i> , <i>RB6500</i> -Front, <i>RB6500</i> -Back, T7-Terminator	MWG
pJK215	<i>PacoA</i> , <i>RB6500</i> -Front-Übergang, T7-Terminator, <i>RB6500</i> -Back-Übergang	LGC
pJK231	<i>PcspB</i> , T7-Terminator	MWG
pJK232	<i>PcspB</i> , <i>RB6502</i> , T7-Terminator	MWG
pJK233	<i>PcspB</i> , <i>RB6499</i> , T7-Terminator	MWG
pJK235	<i>sfp</i> ⁰ , Frame-Shift	MWG
BsJK206	<i>sfp</i> ⁺ , <i>srfA</i> ⁻ , <i>RB11975</i>	MWG
BsJK208	<i>sfp</i> ⁰ , Frame-Shift, <i>srfA</i> ⁺ , <i>RB6500</i>	MWG
BsJK209	<i>PacoA</i> , <i>RB6500</i> -Front-Übergang, lox-sites	MWG
BsJK210	<i>sfp</i> ⁺ , <i>srfA</i> ⁻ , <i>RB6500</i>	MWG
BsJK211a	<i>sfp</i> ⁰ , Frame-Shift, <i>srfA</i> ⁺ , <i>RB11975</i>	MWG

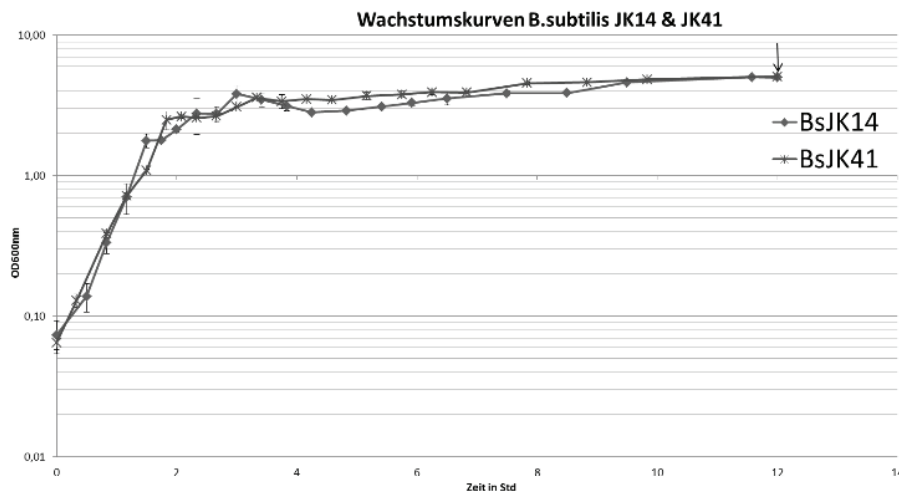


Abbildung 6.17 Wachstumskurve von BsJK41 und BsJK14.

Die Membranproteinbestimmung erfolgte laut Protokoll (Kapitel 5.8). In Abbildung 6.18 ist das resultierende Proteingel zu sehen. Die erwarteten Proteine müssten auf einer Höhe von ca. 40 kDa laufen. Aufgrund der Masse an Proteinen war eine Auswertung des Gels nicht möglich. Eine genauere Analyse des Gels wurde nicht weiter verfolgt.

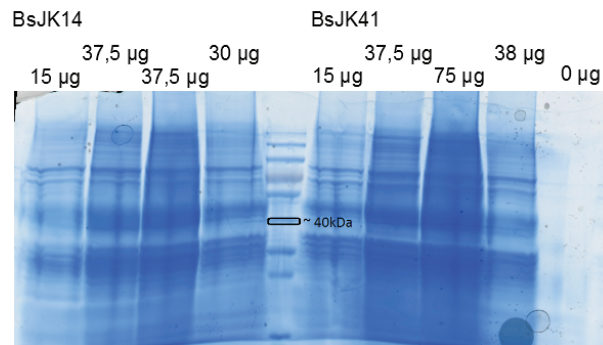


Abbildung 6.18 Membranproteingel von BsJK41 und BsJK14.

6.4.2 Überprüfung der Cm-Resistenz

Wie in Kapitel 6.1.2 beschrieben, zeigen RB6499 und RB6502 Homologien zu verschiedenen Transportersystemen und Chloramphenicol-Resistenzen. Mit Hinblick auf die postulierte Struktur des RB6500-Metaboliten und seiner Ähnlichkeit zu Chloramphenicol, ergab sich die Fragestellung, ob die Expression der beiden Transporter zu einer Cm-Resistenz eines eigentlich Cm-sensitiven Stamms führt. Dazu sollte RB6499 und RB6502 separat sowie als Operon untersucht werden.

Zunächst wurde die Plasmidkonstruktion mit dem *acoA* Promotor begonnen, jedoch bald abgebrochen. Da *PacoA* erst in der exponentiellen Phase angeschaltet wird, kann sich auch erst dann die Chloramphenicolresistenz ausbilden. Wird am Anfang der stationären Phase Cm hinzugegeben, welches eine wachstumshemmende Wirkung hat, würde das stagnierende Wachstum nur schwer erkennbar sein. Aus diesem Grund wurde entschieden mit dem *cspB* Promotor zu arbeiten. Dieser Promotor muss nicht induziert werden und ist während der gesamten Kultivierung aktiv. Nach Zugabe von Cm müsste ein deutlicher Unterschied zur Referenz erkennbar sein.

Um die Cm-Konzentration zu ermitteln, welche notwendig ist, um das Wachstum zu hemmen, wurde ein Vorversuch absolviert. Dazu wurden die Stämme BsJK28-2 (Cm-sensitiv), BsJK12-2 und BsJK20 (beide Cm-resistent) in 5 ml-LB mit $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ bzw. $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ kultiviert. Pro Stamm wurde jeweils eine Negativkontrolle (ohne Cm) mitgeführt. Wie erwartet sind sowohl BsJK12-2 als auch BsJK20 in allen Reagenzgläsern angewachsen. Der Cm-sensitive Stamm BsJK28-2 zeigte lediglich bei einer Konzentration von $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Cm

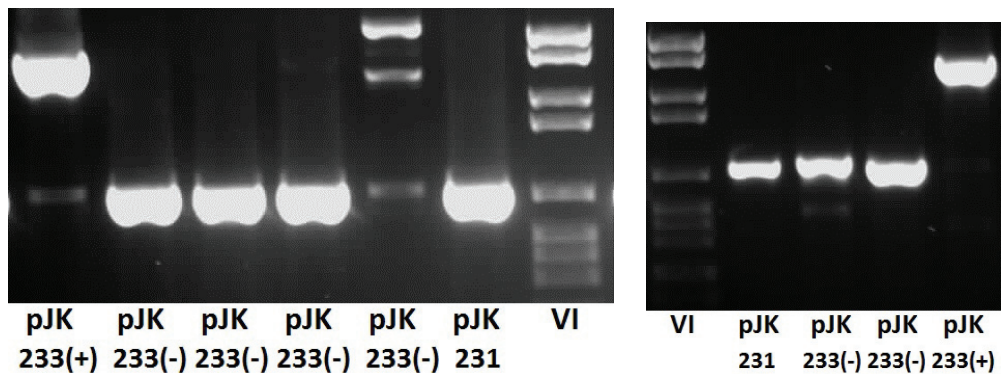


Abbildung 6.19 Colony-PCRs von pJK232 und pJK233.

kein Wachstum. Für die Integration würde sich deshalb BsJK28-2 anbieten, jedoch sollte man bei der Kultivierung Konzentrationen von 2,5 und 5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Cm wählen.

Der Bau der Plasmide erfolgte über Restriktion und Ligation. In den nachfolgenden Tabellen sind die für die Ligation erforderlichen PCRs und Restriktionen dargestellt, ebenso fast eine weitere Tabelle die einzelnen Ligationen zusammen. In Abbildung 6.19 sind die Colony-PCRs von pJK232 und pJK233 abgebildet. Das Bild der Testrestriktionen ist in Abbildung 6.20 zu finden. Aus zeitlichen Gründen war es nicht mehr möglich die konstruierten Plasmide zu integrieren, sie liegen aber alle wie geplant vor.

Tabelle 6.9 Cm - Resistenz - Überprüfung: *Taq*-PCRs mit anschließender Restriktion

PCR-Nummer	Template	Insert	Primer		Größe	Restriktions-Enzyme
			Forward-	Reverse-		
I	BsJK41	<i>PcspB</i>	5456	5457	517 bp	XhoI, SalI-HF
II	pSB7	RB6502	5438	5439	1204 bp	XhoI, NdeI
III	pSB5	RB6499	5440	5441	1009 bp	XhoI, NdeI
IV	pSB5	RBS-RB6499	5440	5442	1107 bp	XhoI

Tabelle 6.10 Cm - Resistenz - Überprüfung: Restriktionen

Res.-Nummer	Plasmid	Restriktions-Enzyme	Zusatz
I	pJK201	XhoI	dephosphorylieren
II	pJK231	XhoI, NdeI	
III	pJK232	XhoI	dephosphorylieren

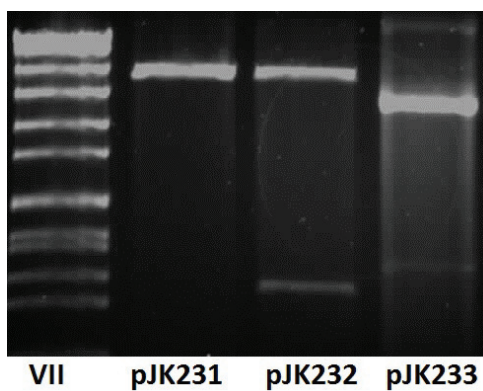


Abbildung 6.20 Testrestriktionen von pJK232 und pJK233.

Tabelle 6.11 Cm-Resistenz-Überprüfung:
Ligationen

PCR-Nummer (Insert)	Res.-Nummer (Plasmid)	resultierendes Plasmid
I (<i>PcspB</i>)	I (pJK201)	pJK231
II (RB6502)	II (pJK231)	pJK232
III (RB6499)	II (pJK231)	pJK233
IV (RBS-RB6499)	III (pJK232)	pJK234

7 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Genkluster aus der marinen Bakterie *R. baltica* so weit wie möglich charakterisiert und heterolog exprimiert. Die Auswahl von RB11975 und RB6500 wurde bereits im Vorfeld auf Grundlage der Erkenntnisse von Kumpfmüller (2008) getroffen.

7.1 Bioinformatische Analyse

Vergleicht man die Erkenntnisse der bioinformatischen Analyse von RB11975 (Kapitel 6.1.1) welche in dieser Arbeit gewonnen wurden, mit denen von Kumpfmüller (2008), so fällt auf, dass in den letzten Jahren wenig Neues in die Datenbanken eingespeist wurde. Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe der gewonnenen Daten über RB6500 sogar die Struktur eines Metaboliten vermutet werden (siehe Kapitel 6.1.2 und Abbildung 6.4).

Die Struktur des RB6500-Metaboliten entwickelte sich aus den Strukturen der laut Datenbanken verwendeten Substrate Phenylalanin und Malonyl-CoA unter Berücksichtigung der anwesenden Domänen. Auffällig ist die Strukturähnlichkeit zu Chlormphenicol. Die Wahrscheinlichkeit der ermittelten Struktur wurde durch die Erkenntnisse über RB6499 und RB6502 erhöht.

RB6499 kodiert wahrscheinlich für einen Transporter der DMT Superfamilie, welcher Cm oder ähnliche Verbindungen aus der Zelle ausschleust. Die Hypothese, dass es sich um einen Transporter handelt, wird durch die Analyse transmembraner Strukturen gestützt (Abbildung 6.5). Auch *RB6502* weist transmembrane Strukturen auf (Abbildung 6.6). Laut BLAST-Analyse könnte es sich hierbei um einen ABC-Transporter für antimikrobielle Peptide handeln. Diese Behauptungen decken sich mit den gewonnenen Erkenntnissen zum Metaboliten.

7.2 Heterologe Expression

Im Bereich der heterologen Expression von PKS/NRPS lagen bereits Erfahrungen vor. Das *RB6500*-Operon und *RB11975* wurden vor Anfertigung dieser Arbeit erfolgreich in *B. subtilis* integriert. Leider blieben die Expressionsversuche im Falle des *RB6500*-Operons ohne Erfolg. Expressionsversuche mit *RB11975* waren bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht durchgeführt worden.

Daran anknüpfend gelang es im Zuge dieser Arbeit *RB6500* einzeln in *B. subtilis* zu inte-

grieren. Darüber hinaus konnte bei Expressionsversuchen das Protein RB11975 wiederholt nachgewiesen werden.

7.2.1 RB11975

Da der Stamm BsJK206 bereits fertig vorlag, konnte direkt mit einem Expressionsversuch begonnen werden (Kapitel 6.1.1). Der Vergleich mit dem Proteingel des Referenzstammes BsJK29 ließ zusätzliche Banden in erwarteter Höhe (269 kDa) erkennen. Durch die MS-Analyse der aus dem Proteingel genommenen Proben konnte das Protein RB11975 eindeutig identifiziert werden. Ausgehend davon, dass die Expression erfolgreich war, wurden Extrakte zur weiteren Analyse angefertigt.

Mittels HPLC-MS wurden die erwähnten Extrakte extern untersucht. Es sollten durch den Vergleich mit BsJK29 Unterschiede im Spektrum festgestellt werden. Leider war es nicht möglich mit dieser Methode einen Metaboliten ausfindig zu machen. Grund dafür kann sein, dass durch fehlende Informationen über den Metaboliten ungünstige Konditionen zur Analyse gewählt wurden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass der gebildete Metabolit verstoffwechselt oder auf Grund toxischer Einflüsse von der Zelle abgebaut wird. Wahrscheinlicher erscheint, dass der Metabolit nicht synthetisiert wurde. Ein Grund, welcher in der weiteren Diskussion noch erläutert wird, könnte die Enzymaktivierung sein, welche durch eine PPTase erfolgen sollte. Denkbar ist auch, dass für die Konstruktion des Metaboliten benötigte Substrate fehlten. Dies wird an späterer Stelle noch diskutiert. Eine experimentell relativ einfach zu überprüfende Variante stellt die Temperatur dar. Da RB11975 ursprünglich in der Ostsee vorkommt, wird nicht ausgeschlossen, dass eine korrekte Proteinfaltung erst bei geringeren Temperaturen möglich ist. Ein wenig wünschenswerter Aspekt wäre, wenn RB11975 beschädigt oder inaktiv vorliegt. Manche Proteine werden im Laufe der Evolution nicht mehr gebraucht, sodass sie noch im Genom kodiert, aber nicht mehr intakt sind. Dies sollte als Möglichkeit in Betracht gezogen werden.

Um weitere Ursachenforschung zu betreiben, wurde ein Stamm konstruiert, welcher *sfp*⁻ ist und somit als Referenz zur Überprüfung der Enzymaktivierung dienen kann. Dazu wurde mit Hilfe eines Knockoutplasmids der *sfp*-Bereich in einer Hämolyse-fähigen Vorstufe von BsJK206 (BsJK205) ausgetauscht. Der auf diese Weise entstandene Stamm BsJK211a wurde parallel zu BsJK206 kultiviert und erneut von den Proteingelen Proben genommen. Ziel war es den Phosphopantetheinyl-Rest nachzuweisen, welcher sich zur Aktivierung des Enzyms anlagert (Kapitel 2.2.4).

Auf dem Proteingel von BsJK211a konnte eine zusätzliche Bande auf Höhe von 400 kDa ausgemacht werden. Per MS-Analyse konnte die Vermutung bestätigt werden, dass es sich dabei um Proteine der Surfactin-Synthese (SrfA-A) handelt. Das RB11975-Protein konnte erneut eindeutig identifiziert werden. Ein Nachweis des PP-Restes war jedoch nicht möglich. Es wurde sich für eine sensitivere Analyse entschieden, welche im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr ausführbar war. Daher bleibt diese Fragestellung

unbeantwortet.

Um die Expressionsversuche zu modifizieren, wäre eine Änderung der Kultivierungstemperatur möglich. Indem man die Temperatur herabsetzt (z. B. auf 20 °C) nähert man sich den ursprünglichen Bedingungen an. Die Wassertemperatur der Ostsee, in der *R. baltica* zu finden ist, schwankt im Jahr zwischen 2 °C und 17 °C (laut <http://www.wetter-ostsee.de/wassertemperatur-ostsee.html>). Da sich *R. baltica* an die vorherrschenden Bedingungen in der Ostsee angepasst hat, könnte eine niedrigere Temperatur großen Einfluss auf die korrekte Faltung der Proteine haben. Sollte der Metabolit in unseren Versuchen bereits vorliegen, jedoch in zu geringer Menge, wäre dies eine Möglichkeit die Metabolitenproduktion zu steigern. Dieser Ansatz wird durch bereits absolvierte Experimente gestützt. Pfeifer et al. (2001) konnte nachweisen, dass eine Temperatur-Absenkung (von 30 °C auf 22 °C) zur Steigerung der 6-dEB-Produktion durch DEBS in *E. coli* führt. Ebenso konnte bei der heterologen Expression der Enniatin-Synthetase (ESyn) unter Nutzung von *PacoA* gezeigt werden, dass bei 20 °C die Detektion der Enniatin-Produktion erhöht war. Auch der 0,1%ige (im Gegensatz zu 1%) Zusatz von Acetoin steigerte die Enniatin-Produktion. In Kombination addierte sich der Effekt (unveröffentlichte Daten). Aus diesen Aussagen ergibt sich eine weitere leicht durchzuführende Möglichkeit der Optimierung, der Acetoingehalt.

Wie bereits erwähnt könnte auch der Mangel an essentiellen Substraten eine Hemmung der Metabolitenproduktion auslösen. *In vitro*-Versuche mit verschiedenen Substraten haben gezeigt, dass durch die Optimierung der Substrate die Proteinproduktion gestiegen ist. Zur Ermittlung der Substratspezifität gibt es verschiedene Ansätze. Möglich ist es mit radioaktiv markierten Aminosäuren zu arbeiten, welche anschließend mittels SDS-Page nachweisbar sind (Seitz, 2007). Außerdem gab es erfolgreiche Versuche über die Züchtung von Kristallen Näheres über die verbauten Substrate zu erfahren (Guldan, 2010). Bleif (2012) führte *in vitro*-Versuche zur näheren Bestimmung des Substratumsatzes durch, welche durch HPLC analysiert wurden. Auch Feifel et al. (2007) konnte durch *in vitro*-Versuche wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Substratnutzung der Enniatin-Synthetase gewinnen.

Als erster Schritt in Richtung Substratoptimierung wäre die Fütterung verschiedener CoA-Derivate denkbar. Über weitere Möglichkeiten sollte intensiv nachgedacht werden.

Eine andere Möglichkeit hinsichtlich der Optimierung der Expressionsversuche besteht in dem Austausch der PPTase. Erweist es sich als richtig, dass keine Enzymaktivierung stattgefunden hat, sollte man darüber nachdenken an dem ursprünglichen Expressionsort nach einer geeigneten PPTase zu suchen. Eventuell besitzt *R. baltica* PPTasen, welche optimal auf RB11975 angepasst sind. Ansonsten könnten auch PPTasen aus anderen PKS/NRPS-Wirten (z.B. Streptomyces) getestet werden.

7.2.2 RB6500

Der schon im Vorfeld konstruierte Stamm BsJK41 enthält das gesamte *RB6500*-Operon. Erste Expressionsversuche des Stammes blieben in der Vergangenheit ohne Erfolg. Die mRNA war nachweisbar, jedoch kein Protein (unveröffentlichte Daten).

Ein neuer Ansatz bestand in der Einzelexpression des Gens *RB6500*. Dazu wurde ein entsprechender Stamm konstruiert (BsJK210) welcher Expressionsversuchen unterworfen werden konnte.

Begonnen wurde die Konstruktion von BsJK210 mit dem Versuch *RB6500* in zwei Teilen mit vorgeschaltetem *PacoA* chromosomal zu integrieren. Die Konstruktion der dafür benötigten Plasmide verlief zunächst reibungslos. An dem Schritt den Promotor vor den ersten Teil des Gens zu setzen, stoppte das Vorhaben. Aus unbekanntem Gründen war es nicht möglich das Problem zu lösen. Ein Grund dafür könnte sein, dass durch ungenügende Repression des Promotors in *E. coli* ein für die Zelle toxisch wirkendes Produkt gebildet wurde. Um dies zu umgehen, entstand die Idee den Promotor in einen eigenen Vektor zu transferieren und erst im letzten Schritt in *B. subtilis* zu integrieren.

Das Plasmid pJK202, welches das hintere Teilstück von *RB6500* enthält, konnte ohne Probleme mittels natürlicher Kompetenz in *B. subtilis* eingebracht werden. Eine Integration des vorderen Abschnitts von *RB6500* mittels Plasmid pJK203 hingegen war aus unbekanntem Gründen nicht möglich.

Daraufhin wurde versucht, das Kluster in einem Schritt chromosomal zu integrieren. Das dafür notwendige Plasmid, welches das komplette *RB6500*-Operon inklusive des *acoA*-Promotors enthält, konnte mittels Red / ET-Klonierung erhalten werden. Das über 10 kb große Operon inklusive des Promotors in einem Schritt zu integrieren gelang ohne Probleme.

Um auch hier die Enzymaktivierung überprüfen zu können wurde analog zu BsJK206 und BsJK211a ein entsprechender *sfp*⁰-Stamm konstruiert, BsJK208. Dazu wurde mit Hilfe eines Knockoutplasmids der *sfp*-Bereich in der Hämolyse-fähigen Vorstufe BsJK209 ausgetauscht. Der auf diese Weise entstandene Stamm BsJK208 wurde parallel zu BsJK210 kultiviert. Auf dem Proteingel von BsJK210 konnte keine zusätzliche Bande auf Höhe von 400 kDa ausgemacht werden. Lediglich zeigten sich auf dem Gel von BsJK208 Banden, welche per MS-Analyse allerdings als Proteine der Surfactin-Synthese (*SrfA-A*) identifiziert wurden. Das verwundert nicht, da das entsprechende Operon in BsJK210 ausgeknockt war, in BsJK208 jedoch intakt vorlag. Im Falle von *RB6500* laufen die erwarteten Banden auf gleicher Höhe wie die von *SrfA*, sodass eine Unterscheidung der beiden Proteine visuell nicht möglich wäre. Ein Knockout von *srfA* erscheint allein aus diesem Grund sinnvoll. Allerdings wäre spätestens in der MS-Analyse aufgefallen, wenn es ein Gemisch beider Proteine gewesen wäre. Daher kann man trotz möglicher Überlagerung ausschließen, dass *RB6500* exprimiert wird.

Zum Nachweis der mRNA wurde erfolgreich ein Slot Blot durchgeführt. Daran kann man

erkennen, dass die Transkription stattgefunden hat, die Translation hingegen nicht. Mögliche Ursachen dafür können die Entstehung toxischer Substanzen, die Bildung von Inklusion Bodies, eine mangelnde Transkriptstabilität, eine zu geringe Proteinmenge oder aber auch ein Mangel an tRNAs sein. Der letzte Punkt erscheint unwahrscheinlich, da *B. subtilis* keinen absoluten Mangel an tRNAs aufweist, außerdem stammt das Cluster ebenfalls aus einem Wirt mit mittlerem GC-Gehalt, so dass sich das Codon Usage ähnlich verhalten sollte. Mutationen in der Sequenz wurden durch Sequenzierung des gesamten *RB6500*-Abschnitts ausgeschlossen.

Um die Expressionsversuche zu modifizieren, kann auch hier die Temperatur variiert werden. Genauso wie bei RB11975 könnte die Proteinfaltung bei niedrigeren Temperaturen optimaler ablaufen. Eine weitere Optimierung könnte den Terminator betreffen. Der T7-Terminator weist zwar eine hohe Stabilität auf, möglicherweise ist ein *B. subtilis*-eigener trotzdem besser geeignet. Diese Vermutung bedarf jedoch der Kontrolle. Die Wahl des Promotors sollte ebenfalls den Expressionsbedingungen angepasst werden. Kann bei niedrigeren Temperaturen ein Protein nachgewiesen werden, sollte über den Austausch von *PacoA* gegen z. B. *PcspB* nachgedacht werden. *PcspB* ist auch bei niedrigen Temperaturen noch aktiv, während das Optimum von *PacoA* bei höheren Temperaturen zu finden ist. Man muss allerdings bedenken, dass eine Induktion des Promotors dann nicht mehr möglich ist, was wiederum nachteilig sein kann. Außerdem haben die Expressionsversuche gezeigt, dass die Transkription funktioniert und somit nicht optimiert werden müsste. Das Problem scheint in der Translation zu liegen. Vor- und Nachteile sollten deshalb immer gegeneinander abgewogen werden.

Fragwürdig bleibt, warum zu dem *RB6500*-Operon zwei Transporter gehören. Möglicherweise hängt die Erklärung dafür mit dem Metaboliten zusammen. Eine erste Struktur des Metaboliten konnte hergeleitet werden, was für *RB11975* nicht zutrifft. Bezieht man diese Fakten auf die Ergebnisse der Expressionsversuche, so wäre es wünschenswert gewesen auch bei *RB6500* Proteine nachweisen zu können, geht doch der erste Schritt zur Metabolitenanalyse bereits in die richtige Richtung.

7.3 RB6499 und RB6502

Bei der bioinformatischen Analyse von *RB6499* und *RB6502* sind zahlreiche transmembrane Strukturen aufgefallen. Daraus ergibt sich die Vermutung, man könne RB6499 und RB6502 in der Membran wieder finden.

Ausgehend davon wurde der Stamm BsJK41, welcher das gesamte *RB6500*-Operon enthält, kultiviert und einer Membranproteinbestimmung unterworfen (Kapitel 5.8). Als Referenz diente der Stamm BsJK14. Die erwartete Größe der Membranproteine lag bei ca.

40 kDa, was der Größe der errechneten Proteine RB6499 und RB6502 entspricht. Auf dem Proteingel waren keine definierten Banden zu erkennen. Von einer weiteren Analyse des Gels wurde abgesehen. Es wäre jedoch möglich Proben in erwarteter Höhe aus dem Gel zu entnehmen und mittels MS analysieren zu lassen. Trotz der Vielzahl der vorhandenen Proteine wäre es möglich RB6499 und RB6502 zu identifizieren.

Die nähere Charakterisierung der Gene *RB6499* und *RB6502* sollte durch Integration in *B. subtilis* erfolgen. Durch die bioinformatische Analyse konnten Ähnlichkeiten zu Transportern und zu einer Cm-Resistenz (*RB6499*) festgestellt werden. Nach erfolgreicher Integration sollte eine Kultivierung mit Zugabe von Cm durchgeführt werden, um die Cm-Resistenz zu überprüfen.

Untersucht werden sollte jeweils die separate Expression von RB6499 und RB6502 sowie die Kombination beider putativer Transporter.

Begonnen hat die Konstruktion unter Verwendung des *acoA* Promotors. Da dieser Acetoin induziert und Glukose reprimiert wird, ist er erst in dem späteren exponentiellen Wachstum aktiv. Da Cm lediglich bakteriostatisch wirkt, wäre ein Unterschied in der Wachstumskurve wahrscheinlich kaum auszumachen. Die Konstruktion wurde deshalb unter dieser Methode abgebrochen und statt des *P_{acoA}* mit *P_{cspB}* weitergeführt. *P_{cspB}* wurde ebenfalls aus *B. subtilis* amplifiziert. Der Vorteil dieses Promotors für das Experiment bestand in der von Anfang an bestehenden Aktivität. Die Konstruktion der drei Plasmide konnte abgeschlossen und durch Sequenzierung überprüft werden.

Eine Integration in *B. subtilis* war aus zeitlichen Gründen noch nicht möglich. Da BsJK28-2 keine Cm-Resistenz aufweist, schien er für den Versuch tauglich. Da manche Cm-sensitive Stämme eine gewisse Toleranzgrenze aufweisen, sollte die Cm-Konzentration ermittelt werden, bei der eine Unterscheidung zwischen einem sensitiven und einem resistenten Stamm möglich ist. Die Integration mit anschließender Kultivierung sollte in Zukunft noch durchgeführt werden.

Wahrscheinlich wird der Stamm in dem sowohl *RB6499* als auch *RB6502* enthalten ist am ehesten die vorhergesagte Resistenz ausbilden. Da dieser Stamm über zwei Möglichkeiten verfügt sich gegen Cm zu schützen, wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ihm dieses gelingt.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Die hier vorliegende Arbeit befasste sich mit der Untersuchung zweier PKS/NRPS-Genkluster der marinen Bakterie *R. baltica*. Unter Zuhilfenahme verschiedener Internettools gelang eine nähere bioinformatische Charakterisierung der gewählten Genkluster *RB11975* und *RB6500*. Eine Transformation der Gene in *Bacillus subtilis* war erfolgreich, die heterologe Expression nur bedingt. Der Proteinnachweis von *RB11975* gibt Grund zu der Annahme, dass mit *B. subtilis* ein geeigneter Wirt gewählt wurde. Die heterologe Expression in *B. subtilis* scheint demzufolge kein generelles Problem darzustellen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit war es möglich durch die bioinformatische Analyse die Struktur des Metaboliten von *RB6500* zu entwickeln. Daran anknüpfend sollten weitere Charakterisierungen erfolgen, mit dessen Hilfe das Ziel eine erfolgreiche Expression zu generieren näher rückt. Werden die dem *RB6500*-Operon zugehörigen Transporter noch näher charakterisiert, könnten daraus weitere Schlüsse auf den Metaboliten gezogen werden. Dazu sollte das aus der Membranproteinbestimmung erhaltene Proteingel weiter untersucht und auch die Integration der bereits gebauten Plasmide zur Überprüfung der Cm-Resistenz fortgeführt werden. Da Vergleiche mit früheren Ergebnissen gezeigt haben, dass die den Internettools zur Verfügung stehenden Datenbanken einem stetigen Wandel unterliegen, sollten in regelmäßigen Abständen die Ergebnisse auf den neusten Stand gebracht werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die heterologe Expression der aus *R. baltica* stammenden Gene untersucht. Die Ergebnisse der Expressionsversuche haben gezeigt, dass eine erfolgreiche Expression in *B. subtilis* zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich ist. Durch den Knockout von *srfA* wurde versucht *B. subtilis* auf die Expression der chromosomal integrierten *R. baltica*-Gene zu fokussieren. Eine weitere Optimierung des Wirts hinsichtlich der heterologen Expression ist empfehlenswert. Beispielsweise könnte ein *B. subtilis*-eigener Terminator die Transkriptstabilität erhöhen. Um den Einfluss der Temperatur und des Acetoingehalts zu überprüfen, sollten diese Parameter bei Expressionsversuchen variiert werden. Außerdem könnte durch eine Substratanalyse gewährleistet werden, dass die für die Metabolitensynthese essentiellen Substrate zur Verfügung stehen. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde bereits durch die bioinformatische Analyse getan. Trotz Nachweis des Proteins *RB11975* konnte in der HPLC-MS-Analyse kein Metabolit detektiert werden. Strukturaufklärungen würden die Detektion erheblich vereinfachen. Da durch Sequenzierung sowohl bei *RB11975* als auch bei *RB6500* Mutationen ausgeschlossen werden konnten, muss die Ursache anderen Ursprungs sein. Um die Gründe für das Ausbleiben des Metaboliten herauszufinden, sollte in erster Instanz die Überprüfung der Enzymaktivierung weiter verfolgt werden.

9 Anhang

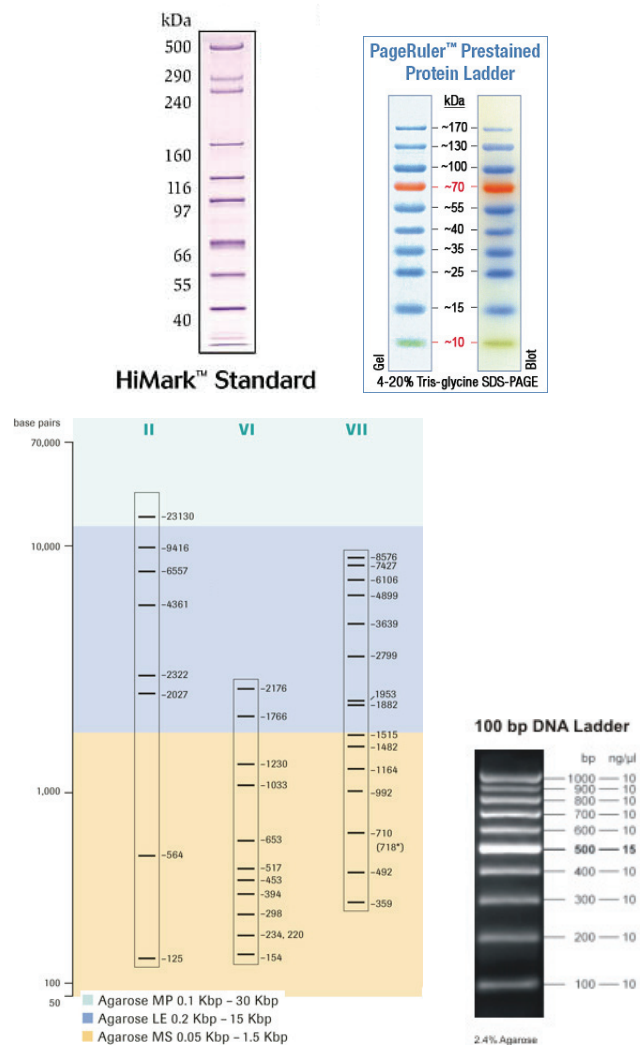


Abbildung 9.1 Verwendete Protein- (oben) und Nukleinsäure-Marker(unten). Entnommen und modifiziert von <http://de-de.invitrogen.com> und <http://www.fermentas.com>, <http://www.roche-applied-science.com> und www.jenabioscience.com.

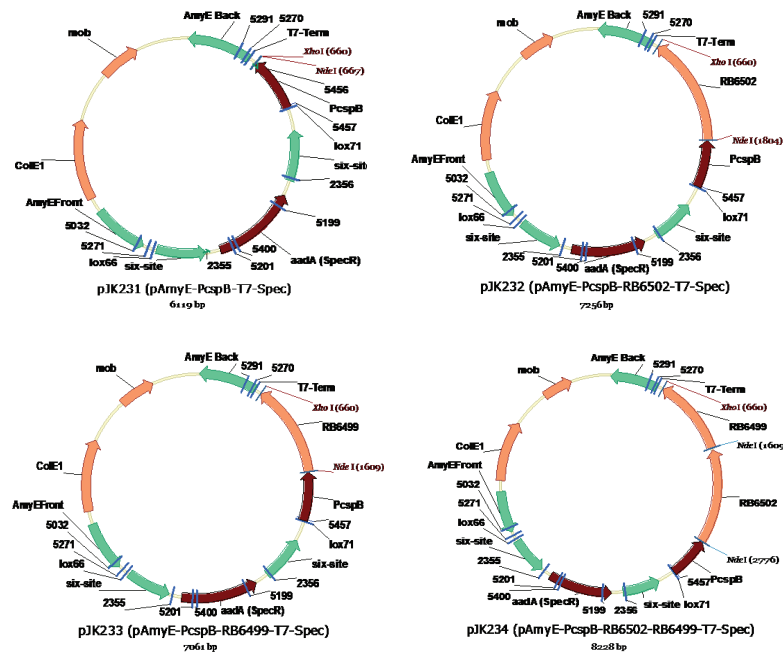


Abbildung 9.2 Expressionsplasmide zur Überprüfung der Cm- Resistenz.

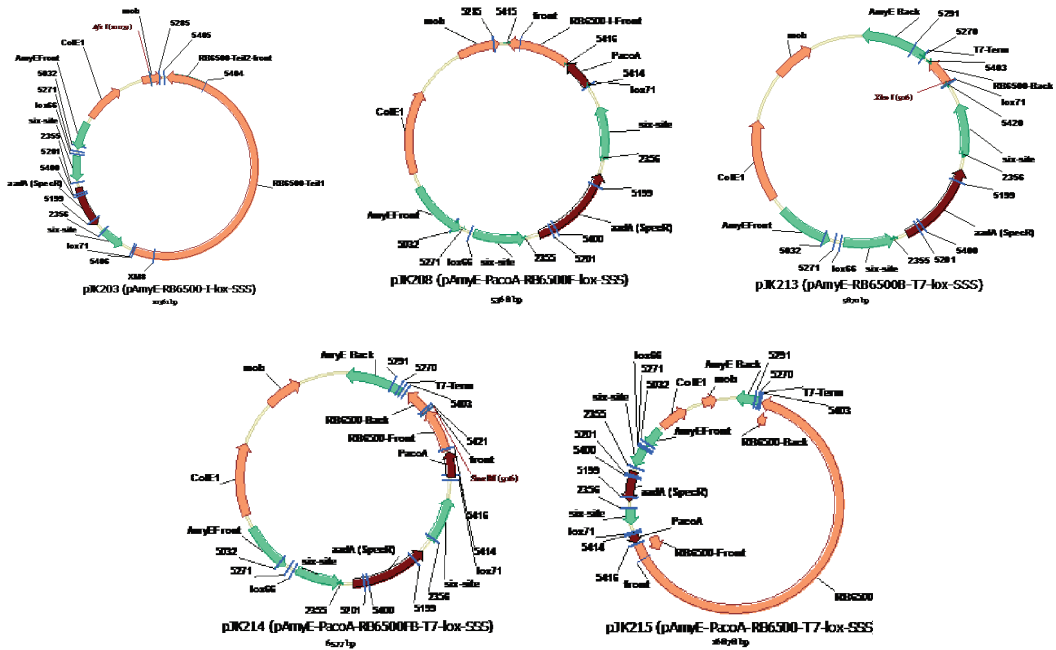


Abbildung 9.3 Vektoren zum Bau des Expressionsplasmids pJK215 (*RB6500*-Gen) über Red/ET-Klonierung.

Tabelle 9.1 Ausgewählte Hits der BLASTX-Suche.

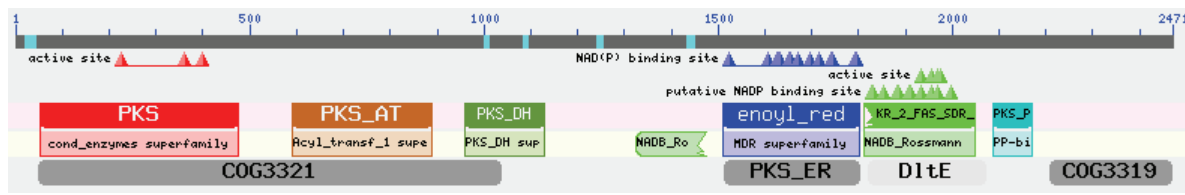
Accession	Description	Score	Positives	Identities
RB11975				
NP_870253.1	polyketide synthase [<i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1]	5068 bits	2471/2471 (100%)	2471/2471 (100%)
EKK03042.1	protein containing Beta-ketoacyl synthase [<i>Rhodopirellula baltica</i> SH 28]	4981 bits	2444/2471 (99%)	2427/2471 (98%)
EGF27766.1	type I PKS [<i>Rhodopirellula baltica</i> WH 47]	4981 bits	2447/2471 (99%)	2427/2471 (98%)
YP_003899777.1	beta - ketoacyl synthase [<i>Cyanothece sp.</i> PCC 7822]	1480 bits	1267/2202 (58%)	856/2202 (39%)
RB6499				
NP_867298.1	RarD protein (chloramphenicol resistance) [<i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1]	621 bits	314/314 (100%)	313/314 (99%)
EGF26190.1	RarD Protein [<i>Rhodopirellula baltica</i> WH 47]	618 bits	313/314 (99%)	311/314 (99%)
EKK00199.1	RarD protein [<i>Rhodopirellula baltica</i> SH 28]	617 bits	312/314 (99%)	311/314 (99%)
ZZP_02159018.1	RarD protein [<i>Shewanella benthica</i> KT 99]	247 bits	193/297 (65%)	124/297 (45%)
YP_001762899.1	Transporter DMT superfamily protein [<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908]	234 bits	190/298 (64%)	121/298 (41%)
RB6500				
NP_867299.1	mycocerosate synthase [<i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1]	7497 bits	3665/3665 (100%)	3665/3665 (100%)
EKK00198.1	polyketide synthase [<i>Rhodopirellula baltica</i> SH 28]	7362 bits	3618/3640 (99%)	3599/3640 (99%)
EGF26789.1	polyketide synthase [<i>Rhodopirellula baltica</i> WH 47]	7328 bits	3616/3640 (99%)	3581/3640 (98%)
ZP_09567224.1	Beta-ketoacyl synthase [<i>Singulisphaera acidiphila</i> DSM 18658]	1705 bits	1327/2264 (59%)	994/2264 (44%)
AAS98783.1	JamL [<i>Lyngbya majuscula</i>]	1373 bits	1537/3179 (48%)	974/3179 (31%)
RB6502				
NP_867300.1	Permease [<i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1]	756 bits	379/379 (100%)	379/379 (100%)
EGTF26188.1	ABC transporter permease protein [<i>Rhodopirellula baltica</i> WH 47]	751 bits	379/379 (100%)	376/379 (99%)
EKK00197.1	ABC transporter permease protein [<i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1]	738 bits	375/379 (99%)	370/379 (98%)
YP_004179247.1	hypothetical protein Isop_2118 [<i>Isosphaera pallida</i> ATCC 43644]	213 bits	222/386 (58%)	131/386 (34%)
SalY[COG0577]	ABC-type antimicrobial peptide transport system, permease component [Defense mechanisms]			

Pfam-Analyse

Pfam-A	Description	Entry type	Sequence		HMM		Bit score	E-value
			Start	End	From	To		
ketoacyl-synt	Beta-ketoacyl synthase, N-terminal domain	Domain	51	303	2	255	321.9	2.4e-96
Ketoacyl-synt_-C	Beta-ketoacyl synthase, C-terminal domain	Domain	311	429	2	118	136.3	3.7e-55
Acyl_-transf_-1	Acyl transferase domain	Domain	589	910	2	315	214.7	1.8e-63
ADH_N	Alcohol dehydrogenase GroES-like domain	Domain	1508	1590	3	62	31.2	1.3e-07
ADH&_zinc_-N	Zinc-binding dehydrogenase	Family	1631	1764	1	129	85.5	1.9e-24
KR	KR domain	Family	1821	2002	1	180	207.3	1.2e-61
PP-binding	Phosphopantetheine attachment site	Domain	2099	2169	3	67	45.9	4.5e-12
Thioesterase	Thioesterase domain	Family	2208	2468	4	227	89.0	4.8e-25

Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite...

konservierte Domänen



Titel	PssmId	Multi-Dom	E-value
PKS, polyketide synthases	29420	Yes	0e+00
KR_2_FAS_SDR_x, beta-ketoacyl reductase (KR) domain of fatty acid synthase (FAS)	187658	yes	2.38e-105
PKS_AT, Acyl transferase domain in PKS	197897	no	3.04e-124
KR_2_FAS_SDR_x, beta-ketoacyl reductase (KR) domain of FAS	187658	yes	1.25e-29
PKS_DH, Dehydratase domain in PKS	197896	no	1.23e-23
PKS_PP, Phosphopantetheine attachment site	197893	no	1.32e-16
PKS_ER, Enoylreductase in Polyketide synthases	197898	yes	2.91e-137
COG3319, Thioesterase domains of type I polyketide synthases or non-ribosomal peptide synthetases	33128	yes	8.96e-24
DltE, Short-chain dehydrogenases of various substrate specificities	30648	yes	2.76e-09

3D - Struktur des Proteins

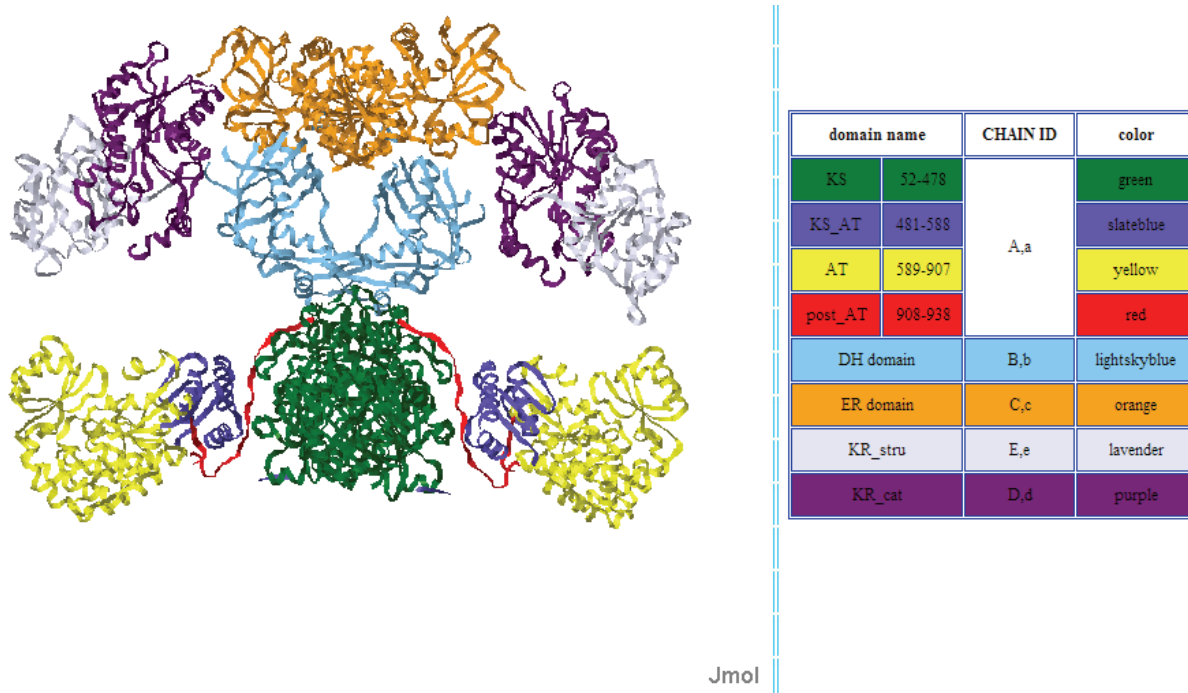


Abbildung 9.5 Bioinformatische Analyse des RB11975-Gens.

Pfam-Analyse

Pfam-A	Description	Entry type	Sequence		HMM		Bit score	E-value
			Start	End	From	To		
ketoacyl-synt	Beta-ketoacyl synthase, N-terminal domain	Domain	20	272	2	255	299.4	1.8e-89
Ketoacyl-synt-C	Beta-ketoacyl synthase, C-terminal domain	Domain	280	399	1	118	135.5	6.6e-40
Acyl-transf-1	Acyl transferase domain	Domain	578	902	1	300	245.1	9.4e-73
ADH-N	Alcohol dehydrogenase GroES-like domain	Domain	1547	1617	2	61	33.9	1.8e-08
ADH-zinc-N	Zinc-binding dehydrogenase	Family	1670	1786	1	96	65.8	2.4e-18
KR	KR domain	Family	1867	2047	1	180	221.2	6.7e-66
PP-binding	Phosphopantetheine attachment site	Domain	2144	2210	7	66	38.7	8.2e-10
Condensation	Condensation domain	Family	2244	2548	2	300	220.1	2.5e-65
HxxPF rpt	HxxPF - repeated domain	Domain	2569	2674	1	91	58.9	4.1e-16
AMP-binding	AMP-binding enzyme	Family	2789	3185	12	418	272.1	4.7e-81
PP-binding	Phosphopantetheine attachment site	Domain	3290	3354	3	66	37.4	2.1e-09
Thioesterase	Thioesterase domain	Family	3399	3647	2	228	129.1	2.6e-37

Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite...

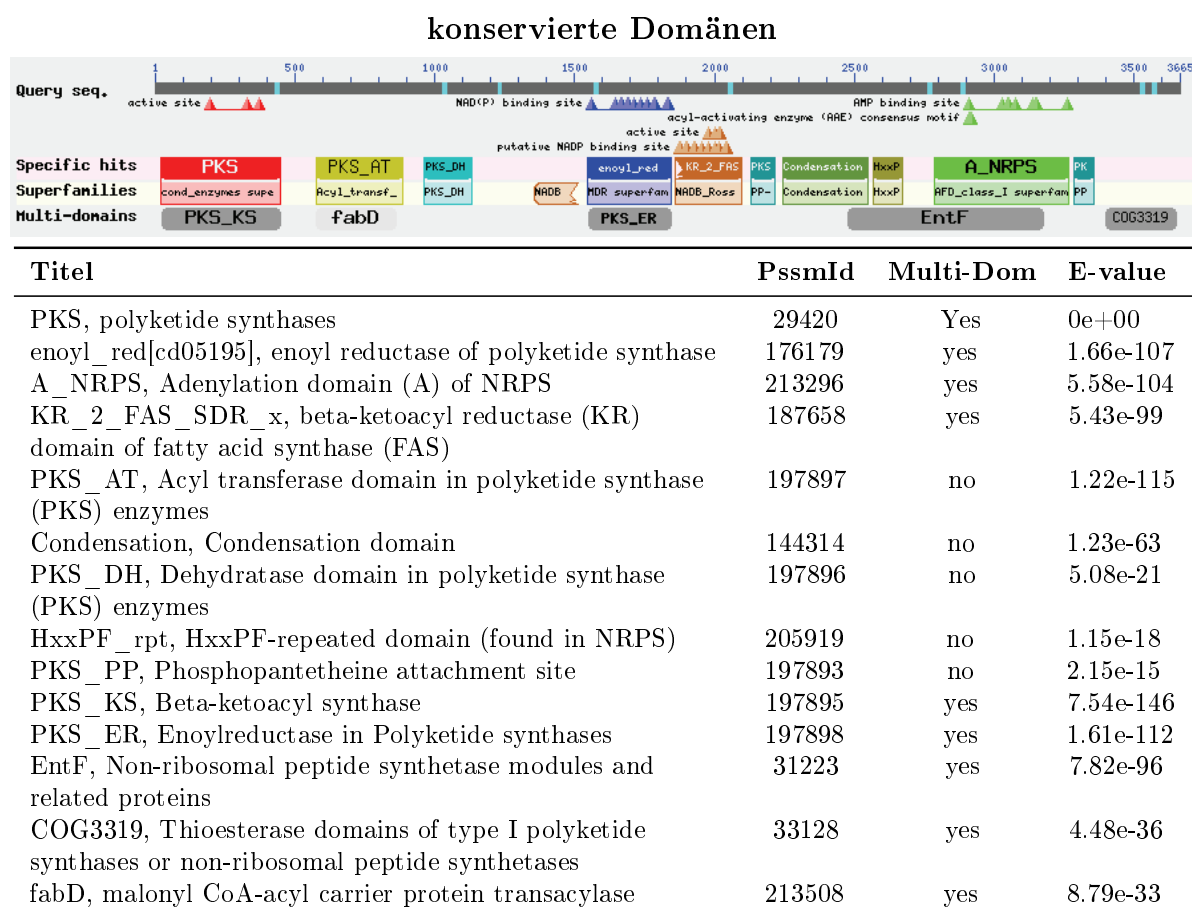


Abbildung 9.6 Bioinformatische Analyse des RB6500-Gens.

Literaturverzeichnis

- S-V. Albers, M. Jonuscheit, S. Dinkelaker, T. Urich, A. Kletzin, R. Tampé, A J M. Driessen, and C. Schleper. Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *sulfolobus solfataricus*. *Appl Environ Microbiol*, 72(1):102–111, Jan 2006. doi: 10.1128/AEM.72.1.102-111.2006. URL <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.1.102-111.2006>.
- J. F. Aparicio, I. Molnár, T. Schwecke, A. König, S. F. Haydock, L. E. Khaw, J. Staunton, and P. F. Leadlay. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene*, 169(1):9–16, Feb 1996.
- Jörg Bernhardt. *Bacillus subtilis* -beschreibung und charakterisierung, 2000. URL <http://microbio1.biologie.uni-greifswald.de:8080/institute/85>.
- Saskia Blank. *Konstruktion eines integrativen Plasmides zur Prüfung von Bacillus subtilis als heterologen Wirt für die Expression von Polyketidsynthasegenen*. PhD thesis, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, 2009.
- Sabrina Bleif. *Von der Identifizierung neuer Substrate der 15betaHydroxylase (CYP106A2) zur Cytochrom P450 Ganzzellkatalyse in Bacillus megaterium*. PhD thesis, Universität des Saarlandes, 2012. URL http://scidok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2012/4985/pdf/Dissertation_Sabrina_Bleif_final.pdf.
- Rebecca A. Butcher, Frank C. Schroeder, Michael A. Fischbach, Paul D. Straight, Roberto Kolter, Christopher T. Walsh, and Jon Clardy. The identification of bacillaene, the product of the pksX megacomplex in *bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(5):1506–1509, Jan 2007. doi: 10.1073/pnas.0610503104. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0610503104>.
- Claudia Chiocchini. *The surfactin biosynthetic complex of Bacillus subtilis: COM domain-mediated biocombinatorial synthesis, and single step purification of native multi-modular NRPSs and multi-enzyme complexes*. PhD thesis, Universität Marburg, 2006. URL <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2006/0838/>.
- Claudia Chiocchini, Uwe Linne, and Torsten Stachelhaus. In vivo biocombinatorial synthesis of lipopeptides by com domain-mediated reprogramming of the surfactin biosynthetic complex. *Chem Biol*, 13(8):899–908, Aug 2006. doi: 10.1016/j.chembiol.2006.06.015. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.06.015>.
- David Clark and Nanette Pazdernik. *Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen (German Edition)*, chapter Rekombinante Proteine, pages 295–315. Spektrum Akademischer Verlag, 2009. ISBN 3827421284.
- J. Cortes, S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevitt, and P. F. Leadlay. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *saccharopolyspora erythraea*. *Nature*, 348(6297):176–178, Nov 1990. doi: 10.1038/348176a0. URL <http://dx.doi.org/10.1038/348176a0>.

- L. Du, C. Sánchez, and B. Shen. Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metab Eng*, 3(1):78–95, Jan 2001. doi: 10.1006/mben.2000.0171. URL <http://dx.doi.org/10.1006/mben.2000.0171>.
- Sven C. Feifel, Timo Schmiederer, Till Hornbogen, Holger Berg, Roderich D. Süßmuth, and Rainer Zocher. In vitro synthesis of new enniatins: probing the alpha-d-hydroxy carboxylic acid binding pocket of the multienzyme enniatin synthetase. *Chembiochem*, 8(15):1767–1770, Oct 2007. doi: 10.1002/cbic.200700377. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200700377>.
- M. A. Fernández-Moreno, J. L. Caballero, D. A. Hopwood, and F. Malpartida. The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the blda trna gene of streptomyces. *Cell*, 66(4):769–780, Aug 1991. doi: 10.1016/0092-8674(91)90120-N. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749190120N>.
- Carsten s. Frank. *Polyphasische Taxonomie, Kerngenom und Lebenszyklus von Rhodopirellula-Stämmen*. PhD thesis, Universität Bremen, 2011.
- S. Gaisser, A. Trefzer, S. Stockert, A. Kirschning, and A. Bechthold. Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from streptomyces viridochromogenes tü57. *J Bacteriol*, 179(20):6271–6278, Oct 1997.
- Nikolaos Gaitatzis. *Neuartige modulare Megasyntesen aus Myxobakterien: Die Stigmatellin- und Myxochelin-Biosynthese in Stigmatella aurantiaca*. PhD thesis, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2004.
- Nikolaos Gaitatzis, Barbara Silakowski, Brigitte Kunze, Gabriele Nordsiek, Helmut Blöcker, Gerhard Höfle, and Rolf Müller. The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *J Biol Chem*, 277(15):13082–13090, Apr 2002. doi: 10.1074/jbc.M111738200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111738200>.
- F. O. Glöckner. Forschungsbericht 2006 - max-planck-institut für marine mikrobiologie, 2006. URL <http://www.mpg.de/369727/forschungsSchwerpunkt?c=166410>.
- F. O. Glöckner, M. Kube, M. Bauer, H. Teeling, T. Lombardot, W. Ludwig, D. Gade, A. Beck, K. Borzym, K. Heitmann, R. Rabus, H. Schlesner, R. Amann, and R. Reinhardt. Complete genome sequence of the marine planctomycete pirellula sp. strain 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14):8298–8303, Jul 2003. doi: 10.1073/pnas.1431443100. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1431443100>.
- P. Graumann and M. A. Marahiel. The major cold shock protein of bacillus subtilis cspb binds with high affinity to the attgg and ccaat sequences in single stranded oligonucleotides. *FEBS Lett*, 338(2):157–160, Jan 1994.
- Harald Guldan. *Nachweis Archaea typischer Lipide in Bacteria über die Aufklärung der Funktion von AraM und PcrB aus Bacillus subtilis*. PhD thesis, Universität Regensburg, 2010. URL [urn:nbn:de:bvb:355-epub-180084](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bvb:355-epub-180084).
- C. R. Harwood. Bacillus subtilis and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol*, 10(7):247–256, Jul 1992.
- M. Hecker and U. Völker. Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted bacillus subtilis cells by the expression of the sigmab regulon. *Mol Microbiol*, 29(5):1129–1136, Sep 1998.

- David A. Hopwood. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem Rev*, 97(7): 2465–2498, Nov 1997.
- Holger Michael Jenke-Kodama. *Evolution modularer Multienzymsysteme des bakteriellen Sekundärstoffwechsels*. PhD thesis, Humboldt-Universität zu Berlin, 2007.
- Takaoki Kasahara and Tadafumi Kato. Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature*, 422(6934):832, Apr 2003. doi: 10.1038/422832a. URL <http://dx.doi.org/10.1038/422832a>.
- C. Khosla, R. S. Gokhale, J. R. Jacobsen, and D. E. Cane. Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annu Rev Biochem*, 68:219–253, 1999. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.219. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.219>.
- Jana Kumpfmüller. Untersuchung von putativen polyketidsynthasen des marinen planktomyceten *Rhodopirellula baltica*. Diplomarbeit, Erst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, 2008.
- R. H. Lambalot, A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, and C. T. Walsh. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol*, 3(11):923–936, Nov 1996.
- Wolfgang Ludwig, Noel R. Krieg, William B. Whitman, Paul Vos, George Garrity, Dorothy Jones, Fred A. Rainey, and Karl-Heinz Schleifer. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Springer-Verlag))*, volume 3, chapter Revised road map to the phylum *Firmicutes*, pages 1–13. Springer, 2009. URL http://www.bergeys.org/outlines/bergeys_vol_3_roadmap_outline.pdf.
- Cornel Mülhardt. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, volume 4. Elsevier GmbH, 2003. ISBN 3827414601.
- Rolf Müller. Don't classify polyketide synthases. *Chem Biol*, 11(1):4–6, Jan 2004. doi: 10.1016/j.chembiol.2004.01.005. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.01.005>.
- H. D. Mootz, R. Finking, and M. A. Marahiel. 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of bacillus subtilis. *J Biol Chem*, 276(40):37289–37298, Oct 2001. doi: 10.1074/jbc.M103556200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M103556200>.
- J. P. Mueller, G. Bukusoglu, and A. L. Sonenshein. Transcriptional regulation of bacillus subtilis glucose starvation-inducible genes: control of *gsia* by the comp-coma signal transduction system. *J Bacteriol*, 174(13):4361–4373, Jul 1992.
- M. M. Nakano, N. Corbell, J. Besson, and P. Zuber. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in bacillus subtilis. *Mol Gen Genet*, 232(2):313–321, Mar 1992.
- Reindert Nijland and Oscar P. Kuipers. Optimization of protein secretion by bacillus subtilis. *Recent Pat Biotechnol*, 2(2):79–87, 2008. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075856>.
- P. S. Patel, S. Huang, S. Fisher, D. Pirnik, C. Aklonis, L. Dean, E. Meyers, P. Fernandes, and F. Mayerl. Bacillaene, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by bacillus subtilis: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)*, 48(9):997–1003, Sep 1995. URL <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.48.997>.

- R. N. Perham. Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annu Rev Biochem*, 69:961–1004, 2000. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.961. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.961>.
- B. A. Pfeifer and C. Khosla. Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(1):106–118, Mar 2001. doi: 10.1128/MMBR.65.1.106-118.2001. URL <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.65.1.106-118.2001>.
- B. A. Pfeifer, S. J. Admiraal, H. Gramajo, D. E. Cane, and C. Khosla. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of e. coli. *Science*, 291(5509):1790–1792, Mar 2001. doi: 10.1126/science.1058092. URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1058092>.
- Arnd Richardt, Tobias Kemme, Stefanie Wagner, Dirk Schwarzer, Mohamed A. Marahiel, and Bernhard T. Hovemann. Ebony, a novel nonribosomal peptide synthetase for beta-alanine conjugation with biogenic amines in drosophila. *J Biol Chem*, 278(42):41160–41166, Oct 2003. doi: 10.1074/jbc.M304303200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M304303200>.
- J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Heinz Schlesner, Christina Rensmann, Brian J. Tindall, Dörte Gade, Ralf Rabus, Stefan Pfeiffer, and Peter Hirsch. Taxonomic heterogeneity within the planctomycetales as derived by dna-dna hybridization, description of rhodopirellula baltica gen. nov., sp. nov., transfer of pirellula marina to the genus blastopirellula gen. nov. as blastopirellula marina comb. nov. and emended description of the genus pirellula. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(Pt 5):1567–1580, Sep 2004. doi: 10.1099/ijs.0.63113-0. URL <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63113-0>.
- Volker Thomas Friedrich Seitz. *Analyse von Histonmethyltransferasen*. PhD thesis, Ludwig Maximilians Universitaet zu Muenchen, 2007. URL [urn:nbn:de:bvb:19-68498](http://nbn:de:bvb:19-68498).
- B. Shen, L. Du, C. Sanchez, D. J. Edwards, M. Chen, and J. M. Murrell. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from streptomyces verticillus atcc15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 27(6):378–385, Dec 2001. doi: 10.1038/sj/jim/7000194. URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj/jim/7000194>.
- B. Silakowski, B. Kunze, and R. Müller. Multiple hybrid polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the myxobacterium stigmatella aurantiaca. *Gene*, 275(2):233–240, Sep 2001.
- Jörg Silbersack, Britta Jürgen, Michael Hecker, Bernd Schneidinger, Rainer Schmuck, and Thomas Schweder. An acetoin-regulated expression system of bacillus subtilis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73(4):895–903, Dec 2006. doi: 10.1007/s00253-006-0549-5. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0549-5>.
- J. Staunton and K. J. Weissman. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep*, 18(4):380–416, Aug 2001.
- Paul D. Straight, Michael A. Fischbach, Christopher T. Walsh, David Z. Rudner, and Roberto Kolter. A singular enzymatic megacomplex from bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(1):305–310, Jan 2007. doi: 10.1073/pnas.0609073103. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0609073103>.

- J Craig Venter, Karin Remington, John F. Heidelberg, Aaron L. Halpern, Doug Rusch, Jonathan A. Eisen, Dongying Wu, Ian Paulsen, Karen E. Nelson, William Nelson, Derrick E. Fouts, Samuel Levy, Anthony H. Knap, Michael W. Lomas, Ken Nealson, Owen White, Jeremy Peterson, Jeff Hoffman, Rachel Parsons, Holly Baden-Tillson, Cynthia Pfannkoch, Yu-Hui Rogers, and Hamilton O. Smith. Environmental genome shotgun sequencing of the sargasso sea. *Science*, 304(5667):66–74, Apr 2004. doi: 10.1126/science.1093857. URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1093857>.
- J. C. Weaver. Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J Cell Biochem*, 51(4):426–435, Apr 1993.
- G. Willmsky, H. Bang, G. Fischer, and M. A. Marahiel. Characterization of *cspb*, a *bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *J Bacteriol*, 174(20):6326–6335, Oct 1992.
- A. Zeeck, G. Bach, and H. Terlau. Medical potential of natural substances. *Internist (Berl)*, 42(10):1422–1427, Oct 2001.