

Untersuchungen zur Biosynthese und Funktion von Myxochelinen in Myxobakterien

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. rer. nat.

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen

der Technischen Universität Dortmund

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

M. Sc. Juliane Korp

aus

Gera

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Nett

2. Gutachter: Prof. Dr. Till F. Schäberle

Dortmund 2018

Diese Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Markus Nett an der Technischen Universität Dortmund in der Arbeitsgruppe „Technische Biologie“, sowie am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut Jena in der Nachwuchsgruppe „Sekundärmetabolismus räuberischer Bakterien“ angefertigt.

Die experimentellen Untersuchungen wurden im Rahmen des Projektes InfectControl 2020 aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert.

Teilergebnisse und Abbildungen dieser Doktorarbeit wurden bereits in wissenschaftlichen Fachzeitschriften publiziert. Mit Zustimmung der jeweiligen Co-Autoren wurden Passagen aus den Veröffentlichungen in adaptierter Form in die vorliegende Arbeit eingebaut. Dies betrifft folgende Kapitel:

Kapitel 4.1	[a]
Kapitel 4.2	[b]
Kapitel 4.4	[b]
Kapitel 4.5	[c]

- [a] **Korp J, König S, Schieferdecker S, Dahse HM, König GM, Werz O, Nett M.** 2015. Harnessing enzymatic promiscuity in myxochelin biosynthesis for the production of 5-lipoxygenase inhibitors. *ChemBioChem* **16**:2445-2450.
- [b] **Korp J, Winand L, Sester A, Nett M.** 2018. Engineering pseudo-chelin production in *Myxococcus xanthus*. *Appl Environ Microbiol* **84**:e01789-18.
- [c] **Korp J, Vela-Gurovic MS, Nett M.** 2016. Antibiotics from predatory bacteria. *Beilstein J Org Chem* **12**:594-607.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Abstract	9
1 Einleitung	11
1.1 Myxobakterien	11
1.1.1 Charakteristische Merkmale	11
1.1.2 Zwei Myxobakterien im Portrait: <i>Myxococcus xanthus</i> und <i>Pyxidicoccus fallax</i>	14
1.1.3 Myxobakterien als Naturstoffproduzenten	15
1.2 Eisen, ein essentielles Element, und Siderophore, die Eisenträger	18
1.2.1 Die Siderophor-vermittelte Eisenaufnahme	18
1.2.2 Strukturelle Diversität der Siderophore	20
1.3 Myxocheline	23
1.3.1 Biosynthese der Myxocheline	24
1.3.2 Das Wirkungsspektrum der Myxocheline	26
2 Motivation und Zielstellung	29
2.1 Untersuchungen zur Myxochelin-Biosynthese	29
2.2 Untersuchungen zur biologischen Funktion der Myxocheline	30
3 Material und Methoden	32
3.1 Generierung neuer Myxochelin-Derivate mittels Präkursor-gesteuerter Biosynthese	32
3.1.1 Kultivierungsbedingungen	32
3.1.2 Integration nicht nativer Bausteine in den Myxochelin-Biosyntheseweg	32
3.1.3 Produktion und Isolierung neuer Myxochelin-Derivate	33
3.1.4 Bestimmung der Eisenaffinität	35
3.2 Genetische Veränderungen der Myxochelin-Biosynthese in <i>M. xanthus</i>	36
3.2.1 Bioinformatische Analysen	36
3.2.2 Stämme und Kultivierungsbedingungen	36
3.2.3 Verwendete Plasmide und Nukleinsäuren	36
3.2.4 Allgemeine DNA-Standardarbeiten	38
3.2.5 Extraktion von genomischer DNA aus <i>M. xanthus</i>	38
3.2.6 Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>M. xanthus</i>	39
3.2.6 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	40
3.2.7 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	40
3.2.8 Produktion und Aufreinigung von rekombinantem His ₆ -MxcM	41

3.2.9 <i>In vitro</i> -Studien mit His ₆ -MxcM	42
3.2.10 Studien zur Transformierbarkeit von <i>M. xanthus</i> DSM16526	42
3.2.11 Konstruktion von Expressionsvektoren für <i>M. xanthus</i>	43
3.2.12 Entwicklung eines <i>M. xanthus</i> -Expressionsstamms	45
3.2.13 Heterologe Produktion von Pseudochelin A in <i>M. xanthus</i>	46
3.2.14 Klonierung eines Vektors zur Disruption des <i>M. xanthus</i> <i>mxCG</i> -Gens	47
3.2.15 Generierung von Myxochelin-defizienten <i>M. xanthus</i> -Mutanten	48
<u>4 Ergebnisse und Diskussion</u>	49
4.1 Erweiterung der Myxochelin-Vielfalt	49
4.1.1 Integration nicht nativer Bausteine in den Myxochelin-Biosyntheseweg	49
4.1.2 Aufreinigung und Charakterisierung von neuen Myxochelin-Derivaten	51
4.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Pseudochelin A	54
4.2.1 Myxochelin- und Pseudochelin-Biosynthesegencluster im Vergleich	54
4.2.2 MxcM als ein Enzym aus der Amidohydrolase-Superfamilie	56
4.2.3 <i>In vitro</i> -Charakterisierung von MxcM	57
4.2.4 Konstruktion eines Plasmid-basierten Expressionssystems für <i>M. xanthus</i>	58
4.2.5 Heterologe Expression des <i>mxCM</i> -Gens in <i>M. xanthus</i> DSM16526	60
4.3 Unterbrechung der Myxochelin-Biosynthese in <i>M. xanthus</i>	64
4.3.1 Konstruktion eines Disruptionsvektors für das Gen <i>mxCG</i>	64
4.3.2 Generierung von Myxochelin-defizienten Mutanten	65
4.3.3 Einfluss der Myxochelin-Biosynthese auf den Phänotyp von <i>M. xanthus</i>	69
4.4 Vorkommen und Verbreitung der Myxochelin-Biosynthese	72
4.5 Abschließende Bemerkungen	75
4.5.1 Myxobakterien als vielversprechende Labororganismen mit Perspektive	75
4.5.2 Die Vielseitigkeit der Myxocheline	77
<u>5. Anhang</u>	80
5.1 Abbildungen	80
5.2 Tabellen	111
5.3 Literaturverzeichnis	113
5.4 Abkürzungsverzeichnis	136
<u>Eigenständigkeitserklärung</u>	139
<u>Tagungsbeiträge</u>	140
<u>Publikationen</u>	140
<u>Lebenslauf</u>	141
<u>Danksagung</u>	142

Zusammenfassung

Die Myxocheline wurden vor fast dreißig Jahren erstmalig in der Literatur erwähnt und als Brenzcatechin-haltige Siderophore der Myxobakterien beschrieben. Seither wurden insgesamt acht Vertreter dieser Gruppe entdeckt, die Myxocheline A, B, C, D, sowie die strukturell verwandten Hyalacheline A, B, C und das erst kürzlich isolierte Pseudochelin A. Aus aktuellen Studien geht hervor, dass sich die Myxochelin-Biosynthese nicht allein auf Myxobakterien beschränkt, wie lange Zeit angenommen, sondern in phylogenetisch unterschiedlichen bakteriellen Gruppen auftritt. Eine ausführliche Analyse zur Verbreitung der Myxocheline wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Myxochelin A ist ein potenter Inhibitor der menschlichen Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LOX), einem Enzym, das an der Biosynthese von Entzündungsmediatoren, den Leukotrienen, beteiligt ist. Im aktiven Zentrum besitzt die 5-LOX ein nicht Häm-gebundenes Eisenion, welches als Redoxmediator während der Katalyse agiert. An dieser Stelle wurde die Frage adressiert, ob die Hemmung der 5-LOX durch Myxochelin A auf seiner eisenkomplexierenden Eigenschaft als Siderophor basiert. Um Informationen bezüglich dem Wirkungsmechanismus zu erhalten, wurden insgesamt 14 neue Myxochelin A-Strukturanaloga unter Verwendung der Präkursor-gesteuerten Biosynthese erzeugt und ihre biologischen Aktivitäten evaluiert.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Aufklärung der Biosynthese von Pseudochelin A, einem erst kürzlich entdecktem Myxochelin-Derivat. Durch bioinformatische Analysen gelang es, das für die Pseudochelin-Bildung verantwortliche Enzym, genannt MxcM, zu identifizieren. Hierbei handelt es sich mutmaßlich um ein Mitglied aus der Amidohydrolase-Enzymfamilie. *In vitro*-Studien mit rekombinantem Enzym bestätigten, dass MxcM für die Umwandlung von Myxochelin B zu Pseudochelin A essentiell ist. Im Weiteren wurde die *in vivo*-Funktionalität von MxcM in dem Myxobakterium *Myxococcus xanthus* überprüft. Die heterologe Expression basierte jedoch nicht auf einer chromosomalen Integration des Zielgens *mxmM*, sondern auf der Verwendung eines autonom replizierbaren, stabilen Expressionsvektors, eine Vorgehensweise, die bis dato noch nicht für Myxobakterien beschrieben wurde. Auf diese Weise wurden zwei unterschiedliche Expressionsstämme generiert, die beide neben Myxochelin A und B auch Pseudochelin A produzieren konnten.

Zusammenfassung

Neben der Biosynthese wurde auch die Frage nach der biologischen Rolle der Myxocheline adressiert. Ihre Funktion als Siderophor ist unumstritten, jedoch wurden bisweilen auch natürliche Myxochelin-Derivate mit geringer Eisenaffinität gefunden. In diesem Zusammenhang wurden mehrere Thesen zu möglichen weiteren biologischen Aufgaben der Myxocheline diskutiert, u.a. als Regulatoren der eigenen Lipoxygenase-Aktivität oder als Signalmoleküle für die interzelluläre Kommunikation der Myxobakterien. Um Hinweise auf einen Einfluss der Myxocheline auf die Morphologie oder das Wachstum von Myxobakterien zu erhalten, wurde eine *M. xanthus*-Mutante mit gestörter Myxochelin-Biosynthese erzeugt. Interessanterweise zeigte diese Mutante im Vergleich zum Wildtyp keine Wachstumsdefizite, jedoch eine komplett veränderte Morphologie des Schwarmes.

Abstract

The myxochelins were first mentioned in the literature nearly 30 years ago and described as catechol-type siderophores produced by myxobacteria. Since then, totally eight members of this compound class have been discovered, namely myxochelins A, B, C, D, as well as the structurally related hyalachelins A, B, C, and the recently isolated pseudochelin A. Current studies show that myxochelin biosynthesis is not restricted to myxobacteria, as assumed for a long time, but occurs in phylogenetically diverse bacterial groups. In the present thesis, a detailed analysis of the distribution of myxochelin biosynthesis was conducted.

Myxochelin A is a potent inhibitor of the human 5-lipoxygenase (5-LOX), an enzyme involved in the biosynthesis of inflammatory mediators, i.e., the leukotrienes. Since the 5-LOX harbors a non-heme iron serving as redox mediator during catalysis, the question arose if the inhibition of this enzyme is due to the iron-binding capacity of myxochelin A. In order to gain more knowledge about the mode of action, 14 new structural analogues were generated using the precursor-directed biosynthesis approach and their biological activities were evaluated.

Furthermore, the biosynthesis of pseudochelin A, a recently discovered myxochelin derivative, was elucidated. Bioinformatic analysis led to the identification of the enzyme, which is responsible for the production of pseudochelin A, namely MxcM, a putative member of the amidohydrolase superfamily. *In vitro* studies with recombinant enzyme confirmed that MxcM catalyzes the conversion of myxochelin B to pseudochelin A. Subsequently, the *in vivo* functionality of MxcM was evaluated using the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. The heterologous expression was not based on chromosomal integration of the target gene. Instead a stable expression vector was designed and introduced into *M. xanthus*, a hitherto unprecedented procedure. Thus, two different expression strains were generated, which were able to produce pseudochelin A additionally to myxochelin A and B.

Except for their biosynthesis, the question concerning the biological role of myxochelins was addressed as well. Although it is generally accepted that they act as siderophores, some natural myxochelin derivatives were found to possess rather low iron affinities. In this context several theories about further biological functions of the myxochelins have been discussed, e.g. as regulators of the lipoxygenase activities or as signal molecules involved in intercellular communication of the myxobacteria. In

Abstract

order to test a direct influence of the myxochelins on the morphology, the growth or the development of multicellular swarms of myxobacteria, a *M. xanthus* mutant strain harboring a disturbed myxochelin biosynthesis pathway was created. Interestingly, the mutant strain was not showing any growth defects, but the morphology of its swarm was significantly altered compared to the wildtype strain.

1 Einleitung

1.1 Myxobakterien

Myxobakterien gehören zu den Deltaproteobakterien. Innerhalb dieser Klasse bilden sie eine eigene Ordnung, die *Myxococcales*, welche sich ihrerseits in die Untergruppen *Cystobacterineae*, *Nannocystineae* und *Sorangineae* gliedert.^{1,2} Die Zellen der Myxobakterien sind stäbchenförmig mit einem gramnegativen Zellwandaufbau.^{3,4} Ihr bevorzugtes Habitat ist der Boden mit einem pH-Wert zwischen 5 und 8.^{3,4} Einige Myxobakterien besiedeln auch den Dung von Pflanzenfressern, verrottendes pflanzliches Material oder Baumrinde,^{3,4} sowie vereinzelt auch salzhaltige marine⁵⁻⁷ oder süßwasserhaltige aquatische Lebensräume.⁸⁻⁹

Myxobakterien sind Spezialisten im Abbau von Makromolekülen, u.a. von Proteinen, Polysacchariden oder Nukleinsäuren.^{2,4} Je nachdem, welches Makromolekül verwertet wird, lassen sich zwei Ernährungstypen unterscheiden. Vertreter der Untergruppe *Sorangineae* sind auf den Abbau von Zellulose spezialisiert.¹⁰⁻¹² Als Stickstoffquelle verwenden sie hauptsächlich anorganische Verbindungen wie Ammonium oder Nitrat.^{11,12} Die meisten Myxobakterien sind jedoch auf die Hydrolyse von Proteinen angewiesen und leben als fakultative Räuber. Sie sekretieren Enzyme wie Proteasen, Nukleasen, Lipasen oder Glukanasen, mit denen sie andere Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen, Pilze, Algen oder auch Protozoen lysieren, und anschließend konsumieren können.^{2,4,13,14} Sollten sich keine geeigneten Beuteorganismen in unmittelbarer Umgebung befinden, können sich diese fakultativen Räuber auch saprophytisch von totem organischem Material ernähren.¹⁵

1.1.1 Charakteristische Merkmale

Eine Besonderheit der Myxobakterien ist ihre gleitende Fortbewegung. Dabei bilden sie multizelluläre Schwärme, die sich wie ein Film auf dem Untergrund ausbreiten.¹⁶⁻¹⁹ Trotz ihrer Mobilität fehlen den Myxobakterien extrazelluläre Bewegungsapparate, wie z.B. Flagellen.^{4,20} Ihre Fortbewegung basiert auf zwei verschiedenen Systemen, dem S- und dem A-System, die synergistisch zusammenwirken.²¹⁻²³ Das S-System (engl.: *social*) steuert die Bewegung von Zellen innerhalb großer Gruppen, den Schwärmen, mit Hilfe von Typ IV Pili, die sich jeweils am „vorderen“ Pol der Zellen befinden.^{18,19,24-30} In einem dynamischen Prozess werden die Pili durch mehrere Monomere des Pila-Proteins basal und distal auf- und wieder abgebaut. Das dadurch

Einleitung

1.1 Myxobakterien

entstehende Muster aus Pilus-Verlängerung, Anhaftung und anschließender Retraktion befähigt die Zellen zur Fortbewegung. Um ihre Richtung zu ändern, können die Typ IV Pili von dem einen Zellpol abgebaut und am gegenüberliegenden wieder aufgebaut werden.²⁶⁻³² Das zweite Bewegungssystem ist das A-System (engl.: *adventurous*), welches eine individuelle Bewegung von einzelnen Zellen gestattet. Am Rand eines Schwarmes gleiten die A-mobilen Zellen langsam entlang ihrer Längsachse nach vorne, können bei Bedarf jedoch auch die Richtung umkehren, um somit ihre Umgebung zu erkunden.^{18,19,25,33} Dabei sekretieren sie einen polysaccharidhaltigen Schleim aus ihren polar befindlichen Düsen. Andere Zellen folgen diesem Pfad, wodurch neue Zell-Straßen entstehen, auf denen die Zellen untereinander in Kontakt treten.^{33,34} Der genaue Mechanismus der A-Mobilität ist noch nicht vollständig bekannt. Es wird angenommen, dass mehr als 40 verschiedene Proteine an diesem Vorgang beteiligt sind.²³

Unter optimalen Bedingungen vermehren sich Myxobakterien vegetativ mittels Zellteilung. Bei Nahrungsknappheit hingegen wird die Fruchtkörperbildung eingeleitet, sofern sich eine ausreichende Anzahl von Zellen auf festem Untergrund befindet (Abb. 1).^{18,23,35-37}

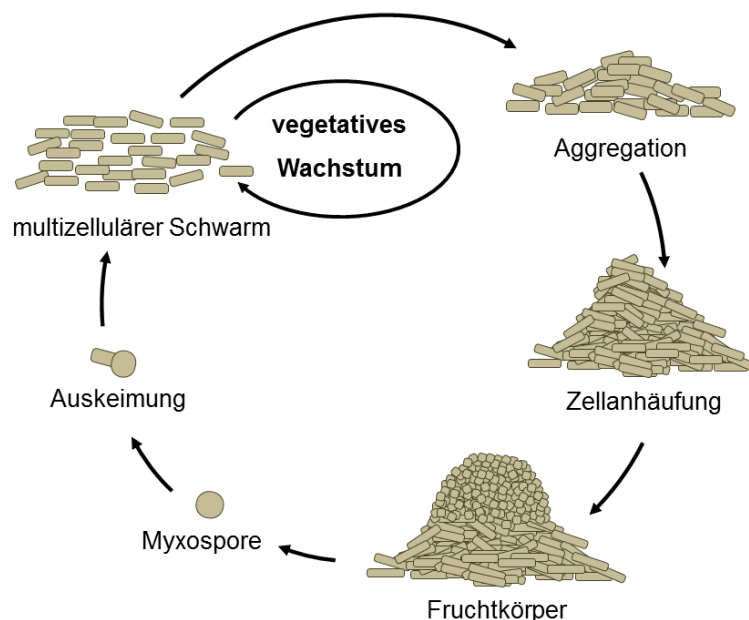


Abbildung 1: Lebenszyklus der Myxobakterien. Unter optimalen Bedingungen leben die Zellen in organisierten Gruppen, den Schwärmen, zusammen und vermehren sich vegetativ durch einfache Zellteilung. Bei Nahrungsmangel wird die Fruchtkörperbildung eingeleitet, welche zur Bildung von Myxosporen führt. Diese resistenten Dauerformen können wieder auskeimen, sobald sich die Umweltbedingungen bessern, und die Zellen kehren in das vegetative Wachstum zurück.^{2,4,18}

Einleitung

1.1 Myxobakterien

Mangelnde Verfügbarkeit einer essentiellen Aminosäure oder Versiegen einer Kohlenstoff-, Energie- oder Phosphat-Quelle sind Faktoren, welche die Fruchtkörperbildung initiieren.³⁸ In der Folge verlieren die Zellen innerhalb eines Schwarmes ihre Individualität und die vegetative Vermehrung wird eingestellt. Die Zellen aggregieren, eine unstrukturierte Ansammlung entsteht und innerhalb dieser kommt es zur Autolyse von mehr als der Hälfte aller Zellen.³⁹ Nachfolgend bilden sich die jeweils charakteristischen Strukturen der Fruchtkörper aus. In der anschließenden Reifungsphase durchlaufen die stäbchenförmigen Zellen eine zelluläre Morphogenese, die in der Bildung von Myxosporen kulminiert (Abb. 1).^{36,40} Myxosporen sind widerstandsfähige Dauerformen, unempfindlich gegenüber Trockenheit, Hitze, Ultraschall und ultravioletter Strahlung.⁴

Während der Fruchtkörperbildung kommunizieren die Zellen miteinander und koordinieren somit die komplexe Morphogenese.^{41,42} Ein dabei verwendetes Quorum Sensing Signal ist das A-Signal, das bei Nahrungsmangel von den Zellen sekretiert wird.⁴³⁻⁴⁵ Mit ansteigender Zellzahl akkumuliert das A-Signal extrazellulär und bei Erreichen eines Schwellenwertes wird die Fruchtkörperbildung eingeleitet. Somit wird gewährleistet, dass genügend Zellen für eine erfolgreiche Fruchtkörperbildung vorhanden sind.^{37,43-45} In der späteren Morphogenese koordiniert das C-Signal, ein 17 kDa großes, parakrin-wirkendes Oberflächenprotein die Formierung des Fruchtkörpers und die Sporenbildung, sowie die Expression verschiedener C-Signal-abhängiger Gene.^{46,47} Im Gegensatz zum A-Signal, welches frei zwischen den Zellen diffundieren kann,³⁷ benötigt die C-Signal-basierte Signaltransduktion einen direkten Kontakt zwischen zwei Zellen.^{48,49}

Myxobakterien der Untergruppe *Cystobacterineae* zeichnen sich durch einen fakultativ räuberischen Lebensstil aus, welcher sowohl die Jagd von lebender Beute, wie auch die Aufnahme von totem organischen Material beinhaltet.¹⁵ Lange Zeit hielt sich das Bild vom myxobakteriellen Wolfsrudel, bei dem die Zellen in der Gemeinschaft aktiv auf ihre Beute reagieren und sie im Kollektiv jagen und konsumieren.^{15,50} Neue Studien ergaben jedoch, dass der multizelluläre Schwarm permanent hydrolytische Enzyme und Toxine sekretiert und das Jagdverhalten der Myxobakterien eher dem einer wartenden Spinne in ihrem Netz gleicht.⁵¹ Sobald geeignete Beute in das nähere Umfeld des Schwarmes gelangt, wird diese durch den sekretierten Cocktail aus hydrolytischen Enzymen und Toxinen angegriffen und ihre Zellen permeabilisiert.⁵¹ Die dadurch von den Beutezellen freigesetzten Verbindungen werden vom

Einleitung

1.1 Myxobakterien

räuberischen Schwarm wahrgenommen, woraufhin dieser dann gezielt Verdauungsenzyme absondert, mit denen er das von der Beute stammende organische Material abbauen und konsumieren kann.⁵¹ Myxobakterien produzieren, wie andere gramnegative Bakterien auch, Vesikel der äußeren Membran (engl.: outer-membrane vesicles; OMVs), die entweder einzeln an die Umgebung abgegeben werden oder, in Form von langen Ketten, mit der Zelle assoziiert bleiben.^{52-54,282} Eine Analyse der von dem Myxobakterium *Myxococcus xanthus* produzierten Vesikel ergab, dass diese mit einer Mischung aus Sekundärmetaboliten (u.a. Pigmenten, Antibiotika, und Siderophoren) und Enzymen (u.a. Chitinasen, Phosphoesterasen, Nukleasen, Proteasen, Hydratasen) beladen sind.^{52,53} In einem Prädations-Assay mit *Escherichia coli* als Beute konnte gezeigt werden, dass sowohl die aufgereinigten Vesikel als auch die Vesikel-freie Kulturbrühe von *M. xanthus* lytische Funktionen auf die Beutezellen ausüben.⁵¹⁻⁵³

1.1.2 Zwei Myxobakterien im Portrait: *Myxococcus xanthus* und *Pyxidicoccus fallax*

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den beiden Myxobakterien *M. xanthus* und *P. fallax* gearbeitet, sodass diese im Folgenden etwas ausführlicher beschrieben werden. Taxonomisch gehören *M. xanthus* und *P. fallax* zur Untergruppe *Cystobacterineae*.^{4,55} *M. xanthus* gilt als myxobakterieller Modellorganismus, der bereits intensiv erforscht und beschrieben wurde. Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit der genetischen und morphologischen Charakterisierung seiner gleitenden Fortbewegung^{16,26,56-60} sowie seiner Fruchtkörpermorphogenese.^{39,46-49,61-65} Für viele Myxobakterien existieren noch keine geeigneten Methoden für ihre genetische Manipulation. Eine Ausnahme bildet *M. xanthus*, der bereits erfolgreich mittels Elektroporation^{58,66-68}, Konjugation^{69,70} und Transduktion⁷¹ auf genetischer Ebene verändert wurde. *M. xanthus* diente auch als heterologer Wirt für die Produktion verschiedener Sekundärmetabolite, u.a. von den myxobakteriellen Naturstoffen Epothilon,⁷² Myxothiazol,⁷³ Myxochromid,⁷⁴ Myxopyronin,⁷⁵ Corallopyronin,⁷⁵ und Vipriolipide,⁷⁶ sowie von dem aus einem Aktinomyzeten stammenden Polyketid Oxytetracyclin.⁷⁷ Ein Plasmid-basiertes Expressionssystem, wie es z.B. für *E. coli* etabliert ist,^{78,79} gibt es für *M. xanthus* noch nicht. Bislang wurden die jeweiligen Biosynthesegene für ihre Expression in das Chromosom von *M. xanthus* eingefügt, entweder durch gezielte homologe Rekombination oder durch eine Transposon-vermittelte Integration.⁷²⁻⁷⁷ Lange Zeit lag ausschließlich die Biologie von

Einleitung

1.1 Myxobakterien

M. xanthus im Fokus der Studien, bis sich durch die Genomsequenzierung des Stamms DK1622 im Jahr 2006 sein Potential als Naturstoffproduzent offenbarte.⁸⁰ Das Genom umfasst 9,14 Mbp und beinhaltet zahlreiche Biosynthesegene.⁸⁰

Für das Myxobakterium *P. fallax* lassen sich in der Literatur weitaus weniger Angaben finden. Die überwiegende Zahl der bisherigen Studien befasst sich mit der Isolierung von Naturstoffen aus *P. fallax*.⁸¹⁻⁸⁵ Eine Transformierbarkeit wurde bisher nur für *P. fallax* Stamm An d48 beschrieben.⁸⁵ Für den in dieser Arbeit verwendeten Stamm HKI727 existiert bislang kein verlässliches Verfahren zur genetischen Manipulation.

1.1.3 Myxobakterien als Naturstoffproduzenten

Naturstoffe sind eine wichtige Quelle für Leitstrukturen bei der Entwicklung neuer Arzneimittel. Im Verlauf der Evolution optimierten sich diese Sekundärmetabolite zu einzigartigen Wirkstoffen mit einer enormen strukturellen und chemischen Vielfalt.⁸⁶⁻⁸⁹ Myxobakterien besitzen ein bemerkenswert hohes Potential für die Produktion von Sekundärmetaboliten. Dabei kann ein einziger Stamm mehrere Verbindungen aus unterschiedlichen Strukturklassen bilden.⁹⁰⁻⁹² Die meisten der bisher isolierten myxobakteriellen Naturstoffe sind Polyketide, nichtribosomale Peptide, oder strukturelle Hybride davon.⁹⁰⁻⁹² Ihre Assemblierung wird durch Enzymkomplexe, die sich aus Polyketidsynthasen (PKS) und/oder nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) zusammensetzen, katalysiert.⁹³⁻⁹⁸ Im Folgenden wird lediglich die NRPS-katalysierte Naturstoffbiosynthese ausführlicher behandelt, da die PKS-basierte Biosynthese nicht Gegenstand dieser Arbeit war. Die Multienzymkomplexe der NRPS sind modular aufgebaut. Jedes Modul setzt sich aus mehreren katalytisch aktiven Domänen zusammen und ist für die Verlängerung der wachsenden Peptidkette um je einen Baustein verantwortlich. In der Regel spiegelt die Reihenfolge der einzelnen Module einer NRPS die Sequenz des gebildeten Peptides wieder. Die minimale Ausstattung eines Moduls besteht aus einer Adenylierungsdomäne (A), einer Peptidyl Carrier-Protein-Domäne (PCP) und einer Kondensationsdomäne (C, condensation domain).⁹⁹⁻¹⁰² Die Module werden posttranslational durch eine Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase) aktiviert. Dabei liefert Coenzym A eine Phosphopantethein-Einheit, die an einen konservierten Serinrest der PCP-Domäne angefügt wird. Dadurch erhält die PCP-Domäne einen flexiblen Arm mit einer endständigen Thiol-Gruppe, an der die jeweiligen Bausteine durch eine Thioester-Bindung anknüpfen (Abb. 2).¹⁰³⁻¹⁰⁶

Einleitung

1.1 Myxobakterien

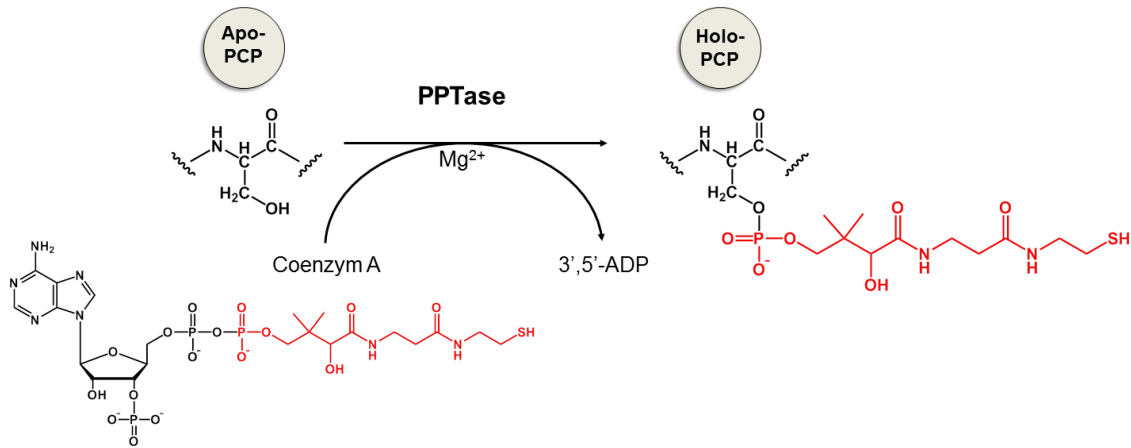


Abbildung 2: Aktivierung einer PCP-Domäne. Die PPTase transferiert die Phosphopantetheinyl-Einheit (rot) von Coenzym A auf ein konserviertes Serin im PCP-Apoprotein, wodurch dieses in das aktive Holoprotein umgewandelt wird.¹⁰³⁻¹⁰⁶

Die A-Domäne ist für die Auswahl der Aminosäure zuständig, welche in die wachsende Polypeptidkette eingebaut werden soll.¹⁰⁷ Unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) wird diese zuerst zu einem Aminoacyladenylat aktiviert und anschließend zur PCP-Domäne weitergeleitet. Die C-Domäne katalysiert schließlich die Verknüpfung zwischen zwei Aminosäuren (Abb. 3).^{99-102,108}

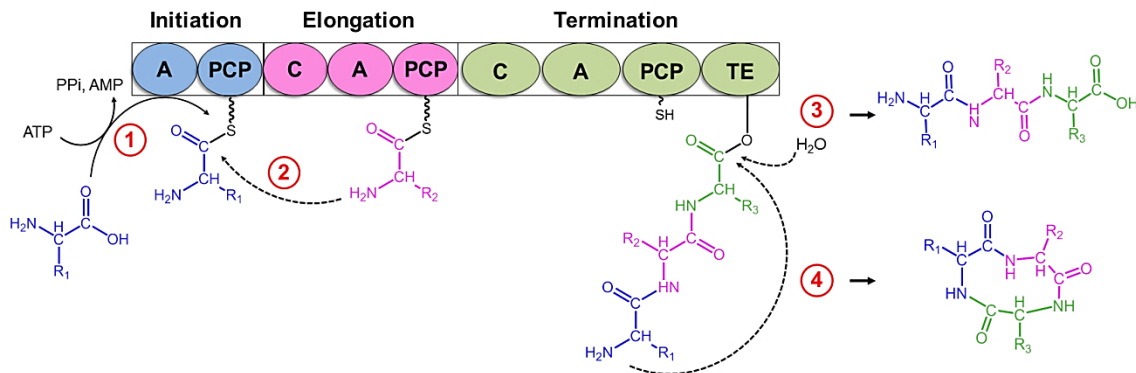


Abbildung 3: Biosynthese eines nichtribosomalen Peptids. **(1)** Die A-Domäne des Initiations-Moduls selektiert eine Aminosäure, aktiviert und leitet diese anschließend an die PCP-Domäne. **(2)** Durch die A- und PCP-Domänen des nachfolgenden Moduls wird eine zweite Aminosäure selektiert, aktiviert und gebunden. Beide Substrate werden durch Ausbildung einer Peptidbindung verknüpft, katalysiert durch die C-Domäne. Durch jedes Elongationsmodul wird die Kette um einen weiteren Baustein erweitert. Bei Erreichen des finalen Terminationsmoduls wird die Peptidkette vom Enzymkomplex getrennt. Befindet sich C-terminal eine TE-Domäne, kann die Kette entweder durch **(3)** Hydrolyse zu einem linearen Peptid oder durch **(4)** intramolekulare Zyklisierung, z.B. zu einem Lactam, abgespalten werden.^{99-102,108}

Einleitung

1.1 Myxobakterien

Neben den proteinogenen Aminosäuren werden auch nicht-proteinogene Amino-, sowie Hydroxy- und Carbonsäuren als Substrate akzeptiert und in das Peptidgerüst eingebaut.¹⁰⁷ Um das fertige Peptid vom Enzymkomplex zu lösen, besitzen die meisten NRPS eine C-terminale Thioesterasedomäne (TE). Diese katalysiert entweder die Hydrolyse der Peptidkette oder eine intramolekulare Ringbildung als Folge eines Angriffes durch ein internes Nukleophil (z.B. Hydroxyl- oder Aminogruppe) (Abb. 3).^{109,110} Alternativ gibt es auch NRPS mit C-terminaler Reduktasedomäne (Red), welche die Peptidkette durch Reduktion zu einem Aldehyd vom Komplex löst, oder C-terminaler C-Domäne, welche die Thioesterbindung zwischen dem Peptid und dem Enzymkomplex spaltet.^{109,110} Zusätzliche Domänen innerhalb eines Moduls erhöhen die strukturelle Vielfalt der nichtribosomalen Peptide. Dazu zählen z.B. Epimerisierungsdomänen, welche L-Aminosäuren in ihre D-Form epimerisieren, sowie N-, C- oder O-Methyltransferasen.^{111,112}

1.2 Eisen, ein essentielles Element, und Siderophore, die Eisenträger

Nahezu alle Lebewesen dieser Erde benötigen für ihre Existenz Eisen, das als essentieller Bestandteil von Enzymen bzw. enzymatischen Komplexen an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt ist, u.a. an der Photosynthese, der Stickstoff-Fixierung, der Atmung, der Genregulation, der DNA-Biosynthese oder dem Sauerstofftransport.¹¹³⁻¹¹⁶ Nach Sauerstoff, Silizium und Aluminium ist Eisen das vierthäufigste Element der Erdkruste.¹¹⁷ Eisen kommt überwiegend in zwei Oxidationsformen vor, die leicht ineinander umwandelbar sind. Unter anaeroben Bedingungen liegt Eisen in seiner zweiwertigen Form (Fe^{2+}) vor und besitzt eine lösliche, für Organismen gut zugängliche Form. Bei aeroben Bedingungen und physiologischem pH-Wert bildet sich jedoch dreiwertiges Eisen (Fe^{3+}), das unlösliche, für biologische Prozesse nicht nutzbare Eisenhydroxide formt. Somit herrscht letztlich ein Mangel an bioverfügbarem Eisen, obwohl dieses Metall auf der Erde so reichlich vorhanden ist.¹¹³⁻¹¹⁶ Um dennoch an das lebensnotwendige Element zu gelangen, produzieren Mikroorganismen Eisenkomplexbildner, sogenannte Siderophore, die eine äußerst hohe und spezifische Affinität für dreiwertiges Eisen besitzen.^{113,118-121} Die vom Produzenten sekretierten Siderophore binden extrazellulär an Fe^{3+} -Ionen. Mittels spezifischer Rezeptoren gelangen die eisengebundenen Siderophore wieder zurück in die Zelle, wo das Metallion durch einen reduktiven oder hydrolytischen Mechanismus vom Komplex gelöst, zu Fe^{2+} reduziert und schließlich für zelluläre Prozesse bereitgestellt wird.^{113,114,116,118-121} Neben Eisenmangel ist jedoch auch ein Überschuss an Eisen für die Zellen letal, u.a. durch die Bildung reaktiver Hydroxylradikale und Hydroxydanionen als Folge der Fenton-Reaktion.¹²²⁻¹²⁴

1.2.1 Die Siderophor-vermittelte Eisenaufnahme

Um zu gewährleisten, dass sich die Eisenkonzentration in einem für die Zelle optimalen Bereich befindet, ist die Eisenaufnahme streng kontrolliert. Bakterien mit einem gramnegativen Zellwandaufbau besitzen in ihrer äußeren Membran Rezeptoren, an denen die Fe^{3+} -Siderophor-Komplexe spezifisch binden (Abb. 4).^{113,114} Diese Rezeptoren werden in der Regel nur bei Eisenmangel gebildet und treten nicht auf, wenn ausreichend Eisen für die Zelle zur Verfügung steht.¹¹³ ExbB und ExbD sind integrale Proteine der inneren Membran und können die Energie des elektrochemischen Gradienten der Zytoplasmamembran an das Protein TonB leiten, wodurch dieses eine energiereiche Form annimmt.

Einleitung

1.2 Eisen und Siderophore

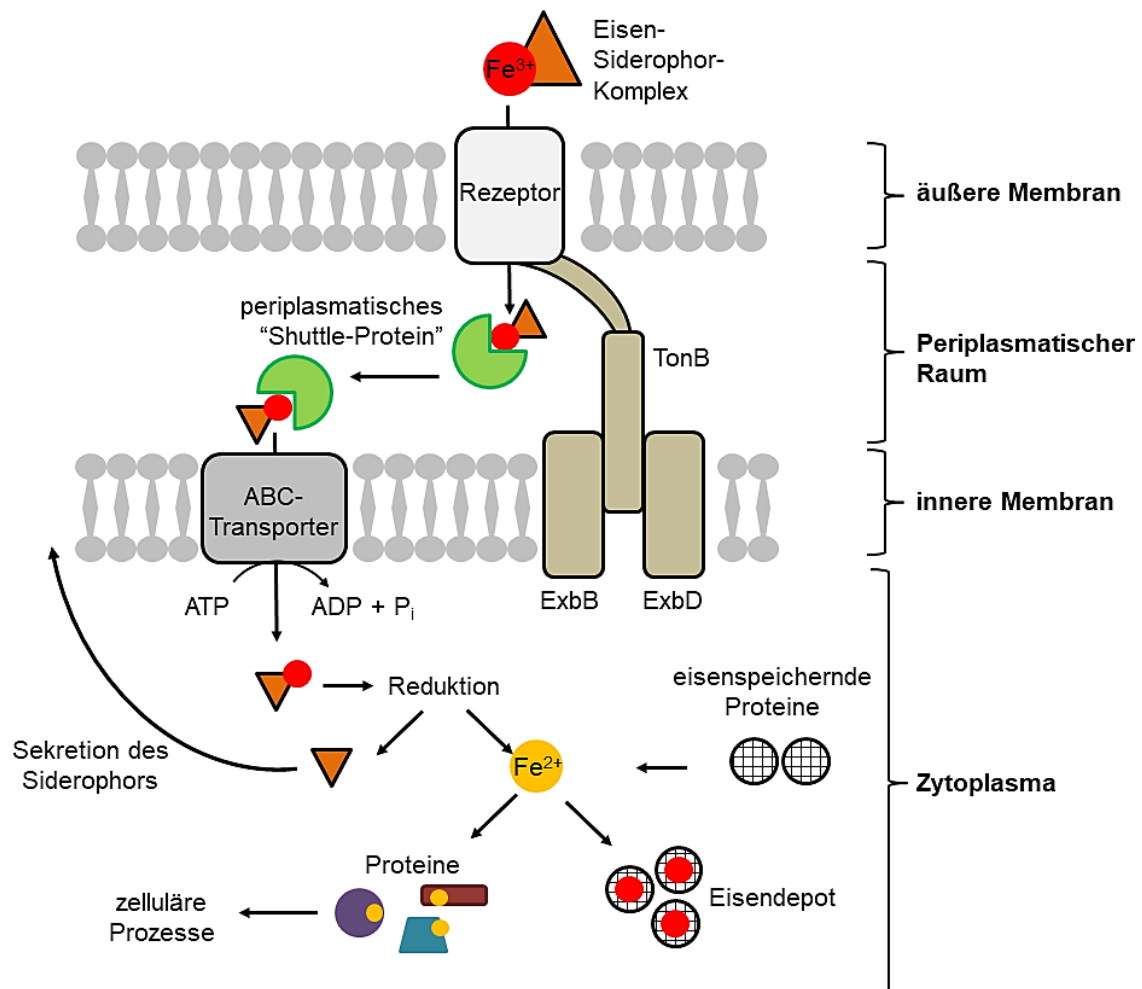


Abbildung 4: Die Siderophor-basierte Eisenaufnahme in Bakterien mit gramnegativem Zellwandaufbau. Rezeptoren der äußeren Membran vermitteln den aktiven Transport der eisengebundenen Siderophore in den periplasmatischen Raum. Die innere Membran wird dann mittels ABC-Transporter passiert. Im Zytoplasma wird das Eisen durch Reduktion vom Siderophor gelöst. Freies Fe²⁺ kann für zelluläre Prozesse verwendet oder durch eisenspeichernde Proteine vorerst eingelagert werden. Bakterien mit grampositiver Zellwand verwenden für den Transport der Fe³⁺-Siderophor-Komplexe ebenfalls membranständige Proteine und ABC-Transporter.^{113,114,119,139}

TonB besitzt eine mit der inneren Membran verankerte N-terminale Domäne, ragt mit seinem „Korpus“ aber in den periplasmatischen Raum und vermittelt somit den Kontakt zu den Rezeptoren der äußeren Membran.^{129,130} Die Energieübertragung auf das TonB-Protein löst eine Konformationsänderung im Rezeptor der äußeren Membran aus, wodurch der gebundene Fe³⁺-Siderophor-Komplex schließlich in den periplasmatischen Raum transloziert wird.^{127,131,132} Im periplasmatischen Raum führen „Shuttle“-Proteine die Komplexe zu ABC-Transportern (engl.: ATP binding cassette) der inneren Membran, wo diese dann durch einen aktiven Transport in das Zytoplasma der Bakterienzelle gelangen (Abb. 4).^{133,134} Durch die Reduktion von Fe³⁺ zu Fe²⁺ im Zytoplasma verliert das Siderophor seine Affinität für das Eisen, was

Einleitung

1.2 Eisen und Siderophore

folglich zur Dissoziation des Metallions führt. Das Siderophor kann anschließend recycelt oder erneut sekretiert werden.¹¹³ Viele Bakterien können intrazelluläre Eisenvorräte mit Hilfe von eisenspeichernden Proteinen anlegen, zu denen die Ferritine und die Dps-Proteine zählen.¹³⁵⁻¹³⁸ Durch ihre kugelartige Struktur speichern diese Proteine dreiwertiges Eisen in ihrem zentralen „Hohlraum“.¹¹³

In vielen gramnegativen Bakterien wird der Eisenmetabolismus durch das FUR-Protein (engl.: ferric uptake regulator) reguliert.¹⁴⁰⁻¹⁴³ Liegt genügend Eisen in der Zelle vor, wird das FUR-Protein durch Homodimerisierung und Bindung mit Fe²⁺ aktiviert. Das aktive FUR-Protein besitzt eine hohe Affinität gegenüber einer spezifischen DNA-Bindestelle, der sogenannten FUR-Box, die sich mit der Promotorsequenz von FUR-regulierten Genen überschneidet. Durch die Anlagerung des FUR-Proteins an die FUR-Box agiert dieses als Transkriptionshemmer. Zu den FUR-regulierten Genen zählen u.a. jene, die für die Biosynthese von Siderophoren oder für den Eisentransport kodieren. Bei Eisenmangel dissoziieren die Fe²⁺-Ionen vom FUR-Protein und in Folge dessen auch der Komplex von der FUR-Box, wodurch die Promotorregion wieder für die DNA-abhängige RNA-Polymerase zugänglich ist.¹⁴⁰⁻¹⁴³

1.2.2 Strukturelle Diversität der Siderophore

Die meisten Siderophore sind Polypeptide, deren Biosynthese durch NRPS katalysiert wird.¹⁴⁴ Einige bakterielle Siderophore entstehen jedoch NRPS-unabhängig, u.a. durch die Verknüpfung von Dicarbonsäuren oder Aminoalkoholen mittels Amid- oder Esterbindungen.^{145,146} Die spezifische Affinität der Siderophore zu dreiwertigem Eisen wird durch bestimmte strukturelle Einheiten vermittelt. Dazu zählen Hydroxamsäuren, Brenzcatechine sowie α -Hydroxy- und α -Ketocarbonsäuren (Abb. 5).^{147,148} Die Brenzcatechin-Einheiten, welche u.a. auch in den Myxochelinen vorhanden sind, stammen von der 2,3-Dihydroxybenzoesäure (2,3-DHBS), deren Biosynthese mit der Bildung von Chorismat im Shikimatweg beginnt.^{149,150} Chorismat wird nachfolgend durch eine Isochorismat-Synthase in das Strukturisomer Isochorismat umgewandelt, bevor dieses durch eine Isochorismatase und einer Alkohol-Dehydrogenase weiter zu 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoat und final zu 2,3-Dihydroxybenzoat umgewandelt wird (Abb. 6).^{151,152} Die Hydroxamsäure-Einheiten stammen in der Regel von den Aminosäuren Lysin oder Ornithin. Dabei wird die Aminogruppe in der Seitenkette durch eine Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängige Monooxygenase oxidiert, wodurch zunächst ein Hydroxylamin-

Einleitung

1.2 Eisen und Siderophore

Zwischenprodukt entsteht, welches nachfolgend durch eine Acyl Coenzym A-Transferase acyliert wird, wodurch die Hydroxamsäure-Struktur ausgebildet wird.^{145,153} Weitere häufig verwendete, aus dem Primärstoffwechsel bekannte Bausteine in der Siderophor-Biosynthese sind Salicylsäure, Asparaginsäure, α -Ketoglutar Säure oder Zitronensäure.¹⁵⁴

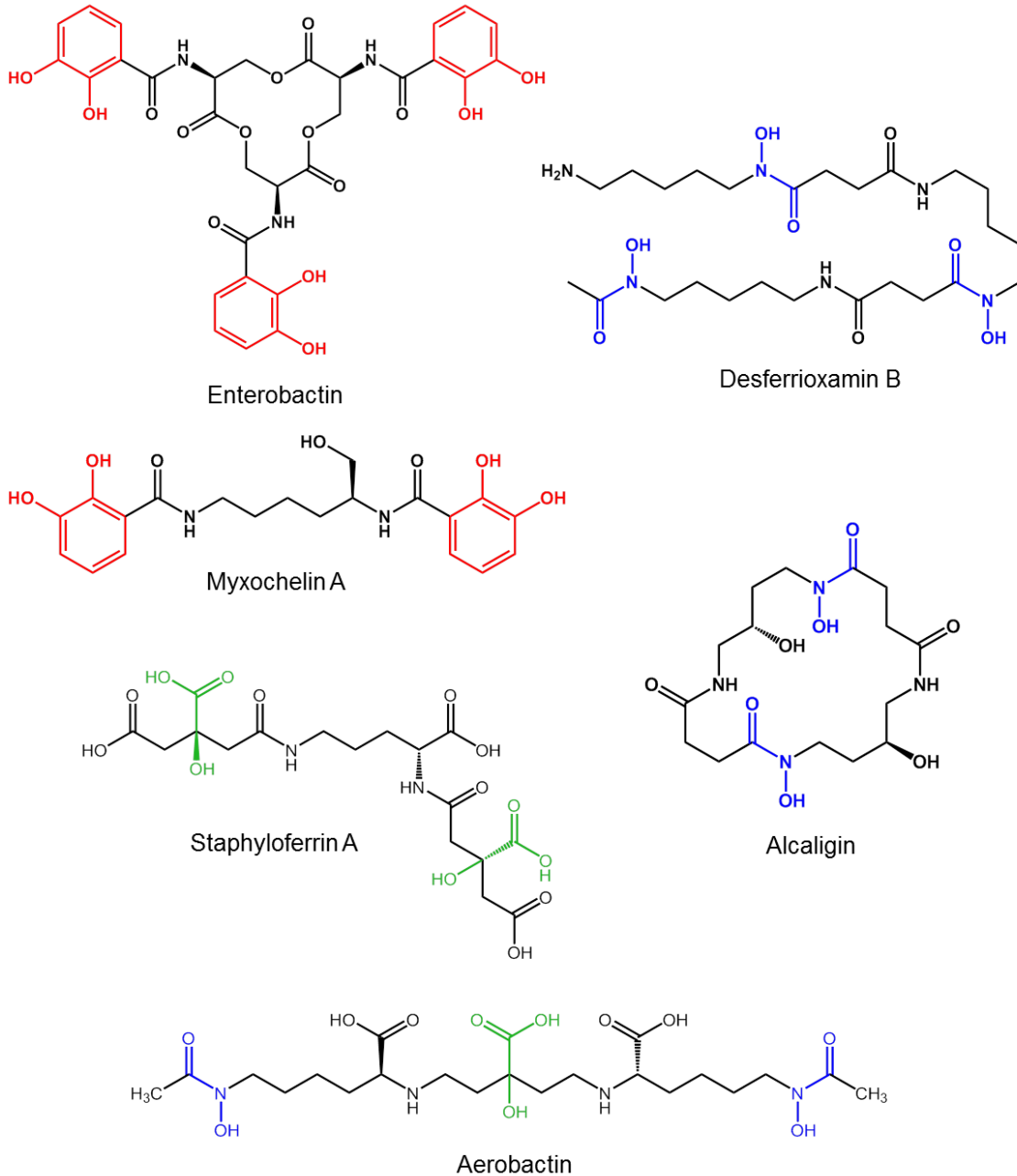


Abbildung 5: Ausgewählte bakterielle Siderophore. Typische funktionelle Einheiten von Siderophoren sind Brenzcatechine (rot), wie in Enterobactin,¹⁵⁵ und Myxochelin A,¹⁵⁶ Hydroxamsäuren (blau), wie in Desferrioxamin B,¹⁵⁷ und Alcaligin,¹⁵⁸ und α -Hydroxycarbonsäuren (grün), wie in Staphyloferrin A.¹⁵⁹ Es können auch Kombinationen dieser Einheiten auftreten, wie z.B. bei Aerobactin.¹⁶⁰

Einleitung

1.2 Eisen und Siderophore

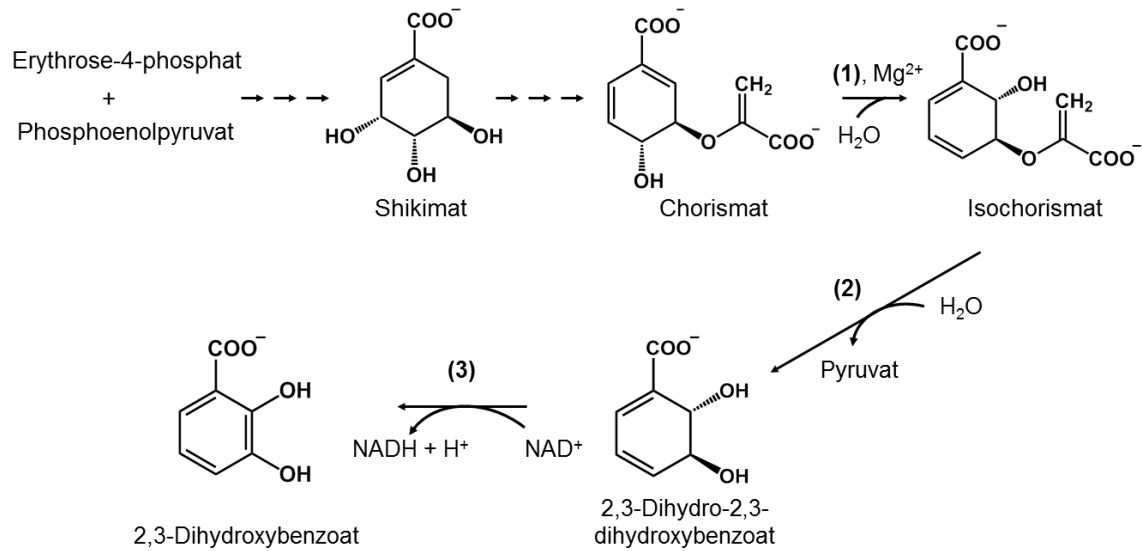


Abbildung 6: Biosynthese von 2,3-DHBS. Im Shikimatweg werden die Bausteine Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat über mehrere Zwischenprodukte zu Chorismat umgewandelt, welches für die Biosynthese von 2,3-DHBS als Vorläufer dient. An dieser Umwandlung beteiligte Enzyme sind **(1)** Isochorismat-Synthase, **(2)** Isochorismatase und **(3)** 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoat-Dehydrogenase.^{151,152,161}

1.3 Myxocheline

Das erste Myxochelin wurde im Jahr 1989 aus der Kulturbrühe des Myxobakteriums *Angiococcus disciformis* An d30 isoliert und als brenzcatechinhaltiges Siderophor namens Myxochelin A beschrieben.¹⁵⁶ Kurz darauf wurde in weiteren Myxobakterien neben Myxochelin A noch ein zweites Derivat, genannt Myxochelin B, gefunden.^{162,163} Strukturell unterscheidet sich Myxochelin B nur hinsichtlich seiner Aminogruppe, welche die primäre Alkoholfunktion des Lysinol-Restes von Myxochelin A ersetzt (Abb. 7). Zwei weitere Derivate, Myxochelin C und D, wurden aus dem Überstand von *P. fallax* HKI727 isoliert.⁸² Beide Verbindungen weisen erneut eine hohe strukturelle Übereinstimmung zu Myxochelin A auf mit dem einzigen Unterschied, dass eine bzw. zwei aromatische Hydroxylgruppen durch Methoxygruppen ersetzt sind (Abb. 7).⁸² Strukturell weniger stark konservierte Myxocheline sind die aus dem Myxobakterium *Hyalangium minutum* isolierten Hyalacheline A, B und C,¹⁶⁴ sowie das aus einem Vertreter der Ordnung Alteromonadales, dem marinen Bakterium *Pseudoalteromonas piscicida*, isolierte Pseudochelin A (Abb. 7).¹⁶⁵ Die Produktion von Myxochelin A wurde später auch in dem Aktinomycyeten *Nonomureae pusilla* und dem Chloroflexi-Bakterium *Herpetosiphon aurantiacus* nachgewiesen.^{166,167} Pseudochelin A ist jedoch das einzige Strukturderivat, dessen Biosynthese sich bis heute noch nicht in einem Myxobakterium nachweisen ließ. Zudem besitzt es eine bis dato für Myxocheline unbekannt, imidazolinhaltige Grundstruktur.¹⁶⁵

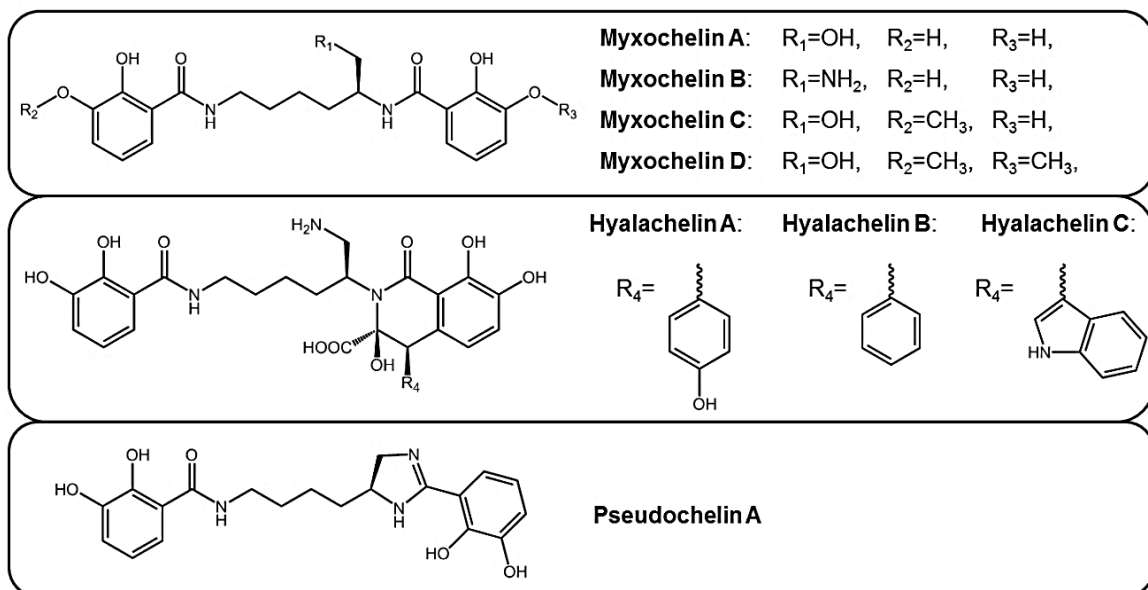


Abbildung 7: Die Gruppe der Myxocheline.^{82,156,162-165}

1.3.1 Biosynthese der Myxocheline

Das Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 ist ein gut untersuchter Produzent der Myxocheline A und B. Sein für die Biosynthese verantwortliches Gencluster wurde bereits ausführlich analysiert und umfasst insgesamt zwölf Gene (Abb. 8).¹⁶³

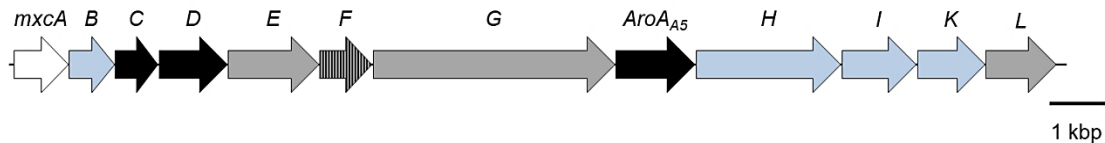


Abbildung 8: Das Myxochelin-Cluster aus *S. aurantiaca* Sg a15. Gene für die Biosynthese von 2,3-DHBS sind schwarz und Gene für die Assemblierung von Myxochelin A und B grau gefärbt. Das Gen *mxcF* (gestrichelt) ist für beide Prozesse notwendig. Weiterhin enthält das Cluster Gene für den Transport der Siderophore (blau), sowie ein nicht essentielles akzessorisches Gen (weiß).¹⁶³

Der Biosyntheseweg der Myxocheline A und B ist ebenfalls bekannt und beinhaltet insgesamt vier Enzyme, MxcE, MxcF, MxcG und MxcL (Abb. 9).^{163,168-170} MxcE ist ein Adenylierungsenzym, welches das Substrat 2,3-DHBS aktiviert und an die Aryl Carrier Protein (ArCP)-Domäne von MxcF weiterleitet. Das zentrale Enzym der Myxochelin-Biosynthese ist die NRPS MxcG, bestehend aus einer N-terminalen C-Domäne, gefolgt von einer A-Domäne, einer PCP-Domäne und einer C-terminalen Red-Domäne. MxcG aktiviert das zweite für die Biosynthese benötigte Substrat, die Aminosäure L-Lysin, und katalysiert in zwei Kondensationsreaktionen die Ausbildung der Amidbindungen zwischen insgesamt zwei DHBS-Einheiten und den beiden Aminogruppen von L-Lysin (Abb. 9). Ob diese Schritte simultan ablaufen oder ob die Katalyse sukzessiv stattfindet, ist bisher nicht bekannt. Die endständige Red-Domäne katalysiert schließlich die NADPH-abhängige Reduktion des Thioester-Zwischenproduktes zu einem Aldehyd, das vom Enzymkomplex gelöst wird. Eine erneute Reduktion des instabilen Intermediates, katalysiert durch dieselbe Red-Domäne, führt zur Bildung von Myxochelin A. Wird das Aldehyd transaminiert, katalysiert durch die Aminotransferase MxcL, entsteht Myxochelin B. Als Aminogruppen-Donor für die Ausbildung von Myxochelin B fungiert mutmaßlich Glutaminsäure (Abb. 9).^{163,168-170} *In vitro*-Studien mit rekombinanten MxcE, MxcF und MxcG bestätigten, dass diese drei Enzyme für eine erfolgreiche Assemblierung von Myxochelin A aus DHBS und L-Lysin ausreichend sind.¹⁶⁸ Weiterhin wurde beobachtet, dass eine Inkubation dieser Enzyme mit L-Lysin und einem alternativen Substrat (in diesem Fall 2- bzw. 3-Hydroxybenzoesäure) zur Bildung neuer Myxochelin A-Derivate führte.¹⁶⁹

Einleitung

1.3 Myxocheline

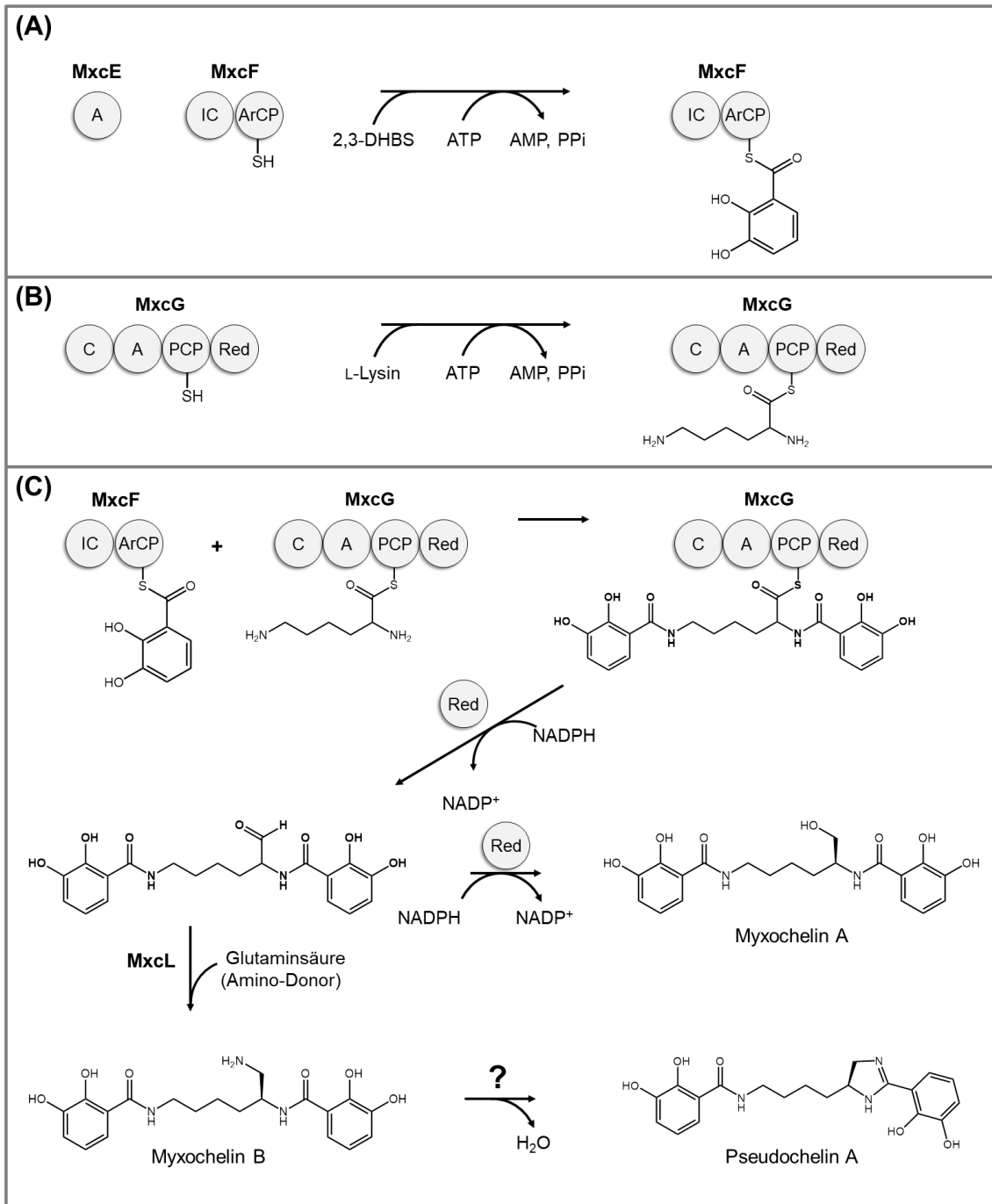


Abbildung 9: Die Biosynthese der Myxocheline A und B,^{163,168,169} sowie der mutmaßliche Biosyntheseweg von Pseudochelin A.¹⁶⁵ Aktivierung und Bindung der Substrate 2,3-DHBS **(A)** und L-Lysin **(B)**. Bildung eines Thioester-Zwischenproduktes, welches nachfolgend durch Reduktion zu einem Aldehyd vom Enzymkomplex entlassen wird **(C)**. Eine erneute Reduktion führt zur Bildung von Myxochelin A, bzw. eine Transaminierung durch die Aminotransferase MxcL zur Formierung von Myxochelin B. Letzteres dient als mutmaßliche Vorstufe für die Bildung von Pseudochelin A, vermutlich durch eine intramolekulare Kondensationsreaktion **(C)**. Das an dieser Katalyse beteiligte Enzym ist bislang noch unbekannt. **A:** Adenylierungsdomäne, **ArCP:** Aryl Carrier Protein, **IC:** Isochorismatase, **C:** Kondensationsdomäne, **PCP:** Peptidyl Carrier Protein, **Red:** Reduktase.

Einleitung

1.3 Myxocheline

MxcF setzt sich aus zwei katalytisch unterschiedlichen Domänen zusammen. Neben der ArCP-Domäne enthält es zusätzlich eine Isochorismatase, die zusammen mit MxcC, einer 2,3-Dihydro-2,3-DHBS-Dehydrogenase und MxcD, einer Isochorismat-Synthase, an der Bildung von 2,3-DHBS beteiligt ist (zum Vergleich s. Abb. 6, S. 22).¹⁶³ Das Gen *AroA₄₅* kodiert für eine 3-Desoxyarabinoheptulosanat-7-phosphat (DAHP)-Synthase (Abb. 8), welche den ersten Schritt im Shikimatweg, die Verknüpfung von Erythrose-4-Phosphat mit Phosphoenolpyruvat zu DAHP katalysiert, und somit ebenfalls in der Biosynthese des Bausteines 2,3-DHBS involviert ist.¹⁶³

Für die Bildung von Pseudochelin A gilt Myxochelin B als mutmaßliche Vorstufe (Abb. 9).¹⁶⁵ Das an dieser Katalyse beteiligte Enzym ist bislang noch nicht bekannt, wurde aber im Rahmen dieser Doktorarbeit analysiert. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Biosynthese von Pseudochelin A lassen sich in Kapitel 4.2 (S. 54 ff.) finden.

Die Hyalacheline sind zwar strukturell mit den Myxochelinen verwandt, ihre Biosynthese wurde bisher jedoch noch nicht verifiziert. Eine mögliche Hypothese ist die Biosynthese mit Myxochelin B als Intermediat, an dessen Rückgrat eine Phenylalanin-, Tyrosin-, oder Tryptophan-Einheit angefügt wird.¹⁶⁴

Die Gene *mxh*, *mxl* und *mxk* kodieren für membranständige Proteine und eine Effluxpumpe, welche mutmaßlich am Transport der Myxocheline beteiligt sind. MxcB ist eine NADPH-abhängige Reduktase, die vermutlich für die Reduktion des Eisen-Siderophor-Komplexes in der Zelle verantwortlich ist.^{163,168,169} Da *S. aurantiaca* Sg a15 kein Produzent von Pseudochelin A ist, befindet sich in seinem Myxochelin-Cluster auch kein entsprechendes Biosynthesegen (Abb. 8).

1.3.2 Das Wirkungsspektrum der Myxocheline

Myxocheline, die strukturell verwandten Hyalacheline sowie Pseudochelin A verfügen über keine signifikanten antimikrobiellen Aktivitäten.^{156,164,165} Es konnte jedoch ein Einfluss von Myxochelin A und C auf die humane K-562 Leukämie-Zelllinie beobachtet werden. Beide Verbindungen reduzierten das Wachstum der Zellen, wobei Myxochelin A bei deutlich geringeren Konzentrationen als Myxochelin C zu einer Hemmung des Zellwachstums führte.⁸² Für Myxochelin A wurde zudem eine antimetastatische Wirkung auf die Tumordinvasion von Maus-Kolonzellen beschrieben, und einige synthetische Strukturanaloga wurden in Struktur-Wirkungsbeziehungs-Studien getestet.^{166,171}

Einleitung

1.3 Myxocheline

Eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Myxochelinen und dem aus Pflanzen isoliertem Naturstoff Curcumin, einem Inhibitor der menschlichen Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LOX),¹⁷²⁻¹⁷⁴ führte letztlich dazu, dass die Myxocheline A, C und D auch auf ihre Wirkung gegenüber diesem Enzym getestet wurden.⁸² Lipoxygenasen zählen zur Familie der lipidperoxidierenden Enzyme, welche in vielen Eukaryoten vorkommen, einschließlich Säugetieren, Pflanzen, marinen Invertebraten und Pilzen.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Vorangetrieben durch die steigende Verfügbarkeit prokaryotischer Genomsequenzen wurden in den letzten Jahren zunehmend auch bakterielle Lipoxygenase-Gene gefunden, vorrangig in gramnegativen Bakterien.¹⁷⁹ Lipoxygenasen katalysieren die Dioxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit einer oder mehreren *cis,cis*-1,4-Pentadien-Einheiten zu Hydroperoxyfettsäuren mit *cis-trans* konjugierten Dienen, welche unter physiologischen Bedingungen leicht zu Hydroxyfettsäuren reduziert werden.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸

Die humane 5-LOX ist an der Biosynthese von Leukotrienen aus dem Substrat Arachidonsäure beteiligt. Als Dioxygenase katalysiert sie den Transfer von molekularem Sauerstoff (O₂) auf die Arachidonsäure und als Leukotrien A₄-Synthase die Ausbildung eines Epoxids (Abb. 10).^{175,180-182}

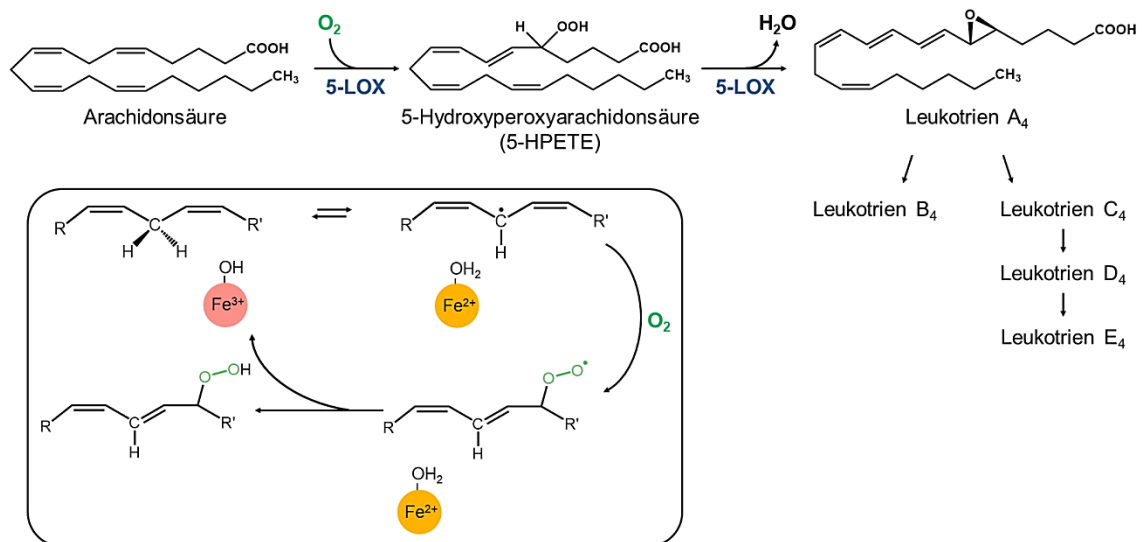


Abbildung 10: Die Rolle der humanen 5-LOX in der Leukotrien-Biosynthese. Die Dioxygenase-Funktion der 5-LOX katalysiert die Umwandlung von Arachidonsäure zu 5-HPETE durch Insertion von O₂. An dieser Reaktion ist das nicht Häm-gebundene Eisenatom im aktiven Zentrum der 5-LOX entscheidend beteiligt (siehe Detailansicht unten links). Als Leukotrien A₄-Synthase katalysiert die 5-LOX anschließend die Bildung von Leukotrien A₄, welches entweder zu Leukotrien B₄ oder zu Leukotrien C₄ und folglich zu den Leukotrienen D₄ und E₄ metabolisiert wird.^{175,182}

Einleitung

1.3 Myxocheline

Das Enzym besitzt eine N-terminale regulatorische und eine katalytisch aktive C-terminale Domäne. Letztere enthält ein prosthetisches Eisenion, welches als Redoxmediator bei der Umwandlung von Arachidonsäure in das Intermediat 5-HPETE fungiert (Abb. 10).^{175,182,187,188} Die 5-LOX kommt in verschiedenen Leukozyten vor, u.a. in den Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen und B-Lymphozyten. Leukotriene agieren als Signaltransduktoren bei Entzündungsreaktionen und initiieren u.a. die Chemotaxis von Fresszellen oder die Steigerung der Gefäßpermeabilität.¹⁸³⁻¹⁸⁶ Unter physiologischen Bedingungen liegt die Arachidonsäure in ihrer inaktiven Form als Bestandteil von Phospholipiden in Zellmembranen vor. Erst in Folge einer entzündlichen Stimulation setzt die zytosolische Phospholipase A2- α die Arachidonsäure frei und initiiert somit die Leukotrien-Biosynthese.

In einem zellfreien Testansatz wurde die Wirkung von Myxochelin A auf rekombinante 5-LOX evaluiert. Dabei inhibierte eine Konzentration von 10 μM Myxochelin A die 5-LOX-Aktivität vergleichbar gut wie 3 μM des Referenzinhibitors Zileuton.⁸² Myxochelin C und D zeigten dagegen geringere Wirkungen gegen die 5-LOX. Während 1,9 μM Myxochelin A die Produktbildung der 5-LOX bereits um 50% reduzierte, mussten im Fall von Myxochelin C bzw. D mehr als 10 μM eingesetzt werden um ein vergleichbares Resultat zu erzielen.⁸² Myxochelin C und D sind nachweislich schwächere Eisenliganden als Myxochelin A, bedingt durch die Methoxylierung ihrer Brenzcatechin-Einheiten.⁸² Hinsichtlich der Relevanz des nicht Häm-gebundenen Eisenions für die katalytische Funktionalität der 5-LOX stellte sich die Frage, ob die effektive Inhibition der Enzymaktivität durch Myxochelin A auf der Komplexierung des aktiven Eisens beruht. Dieser Fragestellung wurde in Kapitel 4.1 (S. 49 ff.) nachgegangen.

2 Motivation und Zielstellung

2.1 Untersuchungen zur Myxochelin-Biosynthese

Myxocheline sind mittlerweile seit fast dreißig Jahren als Naturstoffe bekannt.¹⁵⁶ Ihre Biosynthese wurde in dieser Zeit ausführlich analysiert und erscheint, ebenso wie ihre Struktur, wenig komplex. An der Assemblierung von Myxochelin A aus 2,3-DHBS und L-Lysin sind lediglich drei Enzyme beteiligt. Für die Generierung von Myxochelin B wird nur ein weiteres Enzym, die Aminotransferase MxCL, benötigt.^{163,168,169} Als myxobakterielle Siderophore beschrieben, blieb ihr Potential als Wirkstoffe lange unerkannt. Erst vor kurzem wurde entdeckt, dass die Aktivität der menschlichen 5-LOX durch Myxochelin A fast ebenso effektiv reduziert wird wie durch den FDA-zugelassenen Arzneistoff Zileuton, der ebenfalls ein Metallchelator ist.⁸² Die Beobachtung, dass die Myxocheline C und D schwächere Eisenliganden sind als Myxochelin A und zudem eine geringere Aktivität gegenüber der 5-LOX aufweisen, führte zu der Hypothese, dass die Inhibierung der 5-LOX durch Myxochelin A auf der Komplexierung des katalytisch aktiven nicht Häm-gebundenen Eisens beruhen könnte.⁸² Ein primäres Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Generierung neuer Myxochelin-Derivate mit strukturell modifizierten aromatischen Einheiten und wird in Kapitel 4.1 (S. 49 ff.) behandelt. Mit Hilfe dieser Strukturanaloga sollte die Annahme überprüft werden, ob es wirklich eine Korrelation zwischen der Eisenaffinität von Myxochelinen und ihrer 5-LOX-Hemmung gibt. Zur Realisierung dieses Vorhabens sollte die Präkursor-gesteuerte Biosynthese verwendet werden. Bei dieser Methode werden strukturelle Analoga eines bestimmten Biosynthese-Bausteines in die bakterielle Kulturbrühe gegeben, was zur Derivatisierung des entsprechenden Naturstoffes führt.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Dieses Vorgehen wurde bis dato noch nicht für die Erweiterung des Myxochelin-Produktspektrums angewendet. Basierend auf Ergebnissen vorangegangener *in vitro*-Untersuchungen mit rekombinanten Enzymen wurde zwar bereits über ein gewisses Maß an Substrat-Flexibilität der Myxochelin-Biosynthesenzyme berichtet,¹⁶⁹ jedoch wurden diese Beobachtungen bislang noch nicht im Rahmen von Fermentationen überprüft.

Des Weiteren sollte die Produktvielfalt der Myxocheline auf genetischer Ebene erweitert werden. In diesem Fall sollte das Myxobakterium *M. xanthus*, ein nativer Produzent der Myxocheline A und B,^{162,192,193} genetisch modifiziert werden, sodass es zusätzlich das erst kürzlich entdeckte Pseudochelin A produzieren kann. Dieser Themenkomplex wird in Kapitel 4.2 (S. 54 ff.) aufgegriffen. Im Zuge dieser

Aufgabenstellung ergab sich gleichzeitig eine zweite Herausforderung, die innerhalb dieser Arbeit adressiert wurde, und zwar die Erstellung eines Plasmid-basierten Expressionssystems für *M. xanthus*. Dass *M. xanthus* für die heterologe Produktion von komplexen Naturstoffen geeignet ist, wurde in der Literatur bereits beschrieben.⁷³⁻⁷⁷ Der aktuelle Stand der Technik beinhaltet jedoch die chromosomale Integration der jeweiligen Biosynthesegene. Berichte über die Verwendung von Expressionsvektoren existieren bisher aber noch nicht. Ein dabei zu überwindendes Problem lag in dem Mangel an replikativen Plasmiden für Myxobakterien, denn bislang konnte nur ein myxobakterielles Plasmid, pMF1 aus *Myxococcus fulvus*, isoliert werden.¹⁹⁴ Ein Abkömmling davon, Plasmid pZJY156, wurde zwar bereits für Komplementierungsstudien eingesetzt, um bestimmte Genfunktionen in *M. xanthus* Null-Mutanten wieder herzustellen,^{194,195} jedoch nicht für die heterologe Produktion eines Naturstoffes. In der vorliegenden Doktorarbeit sollten daher verschiedene, auf pZJY156-basierende Expressionsvektoren für *M. xanthus* erstellt werden. Gleichzeitig sollte eine Promotorsequenz identifiziert werden, welche für die Expression des Zielgens geeignet ist. Im Zuge dieser Aufgabenstellung sollte auch die Biosynthese von Pseudochelin A, die bisher noch nicht experimentell validiert worden war, aufgeklärt werden. Dazu gehörte, dass mögliche Enzymkandidaten mittels vergleichender genomischer Untersuchungen identifiziert und ihre katalytische Funktion im Rahmen von *in vitro*-Untersuchungen überprüft werden sollten. Des Weiteren sollte das entsprechende Enzym unter Verwendung der im Vorfeld erstellten Expressionsvektoren heterolog in *M. xanthus* gebildet werden. Dadurch sollte ein neuer Stamm generiert werden, der, im Gegensatz zum Wildtyp, neben Myxochelin A und B auch zusätzlich noch Pseudochelin A produzieren kann.

2.2 Untersuchungen zur biologischen Funktion der Myxocheline

Durch ihre hohe Affinität zu dreiwertigem Eisen gelten Myxocheline im Allgemeinen als Siderophore,¹⁵⁶ deren Produktion bei Eisenmangel der Aufrechterhaltung des intrazellulären Eisenlevels dient.^{113,120} Bisher wurden zwei verschiedene Arten von Siderophoren aus Myxobakterien isoliert, die hydroxamsäurehaltigen Nannocheline,¹⁹⁶ sowie die Brenzcatechinhaltigen Myxocheline.^{82,156,162-164} Die Produktion von Myxochelin-Derivaten mit modifizierten Brenzcatechin-Einheiten und damit einhergehend verringerter Eisenaffinität, wie z.B. bei Myxochelin C und D,⁸² wirft die Frage auf, ob die biologische Funktion dieser Verbindungen einzig auf der Beschaffung von Eisen liegt. Diese Fragestellung wird in Kapitel 4.5 (S. 75 ff.)

Motivation und Zielstellung

aufgegriffen. Da sich bisher keine signifikanten antimikrobiellen Wirkungen für die Myxocheline feststellen ließen,^{156,164,165} wird vorerst eine Beteiligung dieser Naturstoffe am räuberischen Lebensstil der Myxobakterien bzw. an der direkten Abwehr gegenüber Konkurrenten nicht in Betracht gezogen. Die Entdeckung, dass Myxochelin A ein potenter Inhibitor der menschlichen 5-LOX ist,⁸² lässt jedoch über mögliche andere biologische Funktionen spekulieren. Interessanterweise werden Lipoxygenase-Gene mehr und mehr auch in prokaryotischen Organismen gefunden, hauptsächlich in gramnegativen Bakterien,¹⁷⁹ wie in den Proteobakterien *Sorangium cellulosum*,¹⁹⁷ *Pseudomonas aeruginosa*,¹⁹⁸ und *Burkholderia thailandensis*,¹⁹⁹ oder den Cyanobakterien *Anabaena* sp.²⁰⁰ und *Nostoc punctiforme*.²⁰¹ Auch in *M. xanthus* DK1622 wurden bereits zwei LOX-Gene gefunden und die rekombinanten Enzyme hinsichtlich ihrer Struktur und Substratspezifität untersucht.^{202,203} In dem Pilz *Ceratocystis ulmi* konnte die Aktivität der Lipoxygenase mit seiner zellulären Morphogenese in Verbindung gebracht werden.²⁰⁴ Damit einhergehend war ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu prüfen, ob die Myxochelin-Produktion einen direkten Einfluss auf die Morphologie oder das Wachstum von *M. xanthus* hat. Um dieser Frage nachzugehen, sollte eine Myxochelin-defiziente Mutante generiert und nach phänotypischen Unterschieden gegenüber dem Wildtyp-Stamm gesucht werden. Ergebnisse dazu finden sich in Kapitel 4.3 (S. 64 ff.).

Das Potential zur Biosynthese von Myxochelinen wurde bereits bei Vertretern der Aktinomyzeten (*Nonomureae pusilla*),¹⁶⁶ der Chloroflexi-Bakterien (*Herpetosiphon aurantiacus*),¹⁶⁷ der Deltaproteobakterien (*Archangium disciformis*,¹⁵⁶ *Archangium gephyra*,¹⁶³ *Hyalangium minutum*,¹⁶⁴ *M. xanthus*,^{192,193} *P. fallax*,⁸² *Sorangium cellulosum*,¹⁶⁹ *S. aurantiaca*,¹⁶³ und der Gammaproteobakterien (*P. piscicida*)¹⁶⁵ beschrieben. Aus diesen Daten lässt sich bereits ein erster Eindruck über die klassenübergreifende Verbreitung dieser Verbindungen gewinnen. Durch bioinformatische Analysen der öffentlich zugänglichen Genomsequenzen sollten innerhalb dieser Doktorarbeit weitere bakterielle Produzenten identifiziert und Vorhersagen zu den mutmaßlich produzierten Myxochelinen getroffen werden. In diesem Kontext sollte schließlich untersucht werden, ob sich ein Zusammenhang zwischen den gebildeten Myxochelinen und bestimmten Bakteriengruppen, ihrem Lebensstil oder Habitat ableiten lässt. Die Angaben dazu finden sich in Kapitel 4.4 (S. 72 ff.).

3 Material und Methoden

3.1 Generierung neuer Myxochelin-Derivate mittels Präkursor-gesteuerter Biosynthese

3.1.1 Kultivierungsbedingungen

Flüssigkulturen von *P. fallax* HKI727 wurden in MD1-Medium (0,3% (w/v) Casiton; 0,07% (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mg L^{-1} Vitamin B₁₂; 1,0 ml L^{-1} Spurenelementelösung SL-4; pH 7,2) bei 30 °C auf einem Schüttelinkubator mit 130 UpM kultiviert.⁸²

3.1.2 Integration nicht nativer Bausteine in den Myxochelin-Biosyntheseweg

Um einen Überblick über geeignete Bausteine für die Präkursor-gesteuerte Biosynthese zu erhalten, wurden initial kleinere *P. fallax* HKI727 Screening-kulturen mit verschiedenen DHBS-Analoga gefüttert und anschließend analysiert. Diese Arbeiten entstanden in Kollaboration mit Dr. S. Schieferdecker (Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie / Hans-Knöll-Institut, Jena). Die Screeningkulturen enthielten je 100 mL MD1-Medium mit 2,0% (w/v) Amberlite® XAD7HP (Sigma-Aldrich) in 500 mL Erlenmeyerkolben. Die Präkursoren (Tab. 1) wurden als sterilfiltrierte Lösungen (Endkonzentration: 75 mg L^{-1}) unmittelbar vor dem Animpfen der Kulturen in das Medium gegeben. Nach 7 Tagen Kultivierung bei 30 °C auf einem Schüttelinkubator wurde das Adsorberharz durch Filtration von der Kulturbrühe entfernt und mit Aceton extrahiert. Die getrockneten Extrakte wurde in je 0,5 mL Methanol suspendiert und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Für die chromatographische Auftrennung der Proben wurde ein Shimadzu HPLC-System (LC-20AT, SPD-M20A) mit einer OTU LipoMare Säule (250 x 4,6 mm, 5 μm ; AppliChrom) verwendet. Die mobile Phase enthielt A) Reinstwasser mit 0,1% Trifluoressigsäure und B) Methanol. Für die Auftrennung der Extrakte wurden folgende Bedingungen verwendet: isokratisch 10% B für 5 Minuten, gefolgt von einem linearen Gradienten bis 100% B innerhalb von 20 Minuten, und anschließend isokratisch 100% B für weitere 5 Minuten. Die Flussrate lag bei 1,0 mL min^{-1} . Die Elution der Verbindungen wurde mit einem Diodenarraydetektor verfolgt.

Material und Methoden

3.1 Generierung neuer Myxochelin-Derivate mittels Präkursor-gesteuerter Biosynthese

Tabelle 1: In einem initialen Screening getestete Substrate für die Präkursor-gesteuerte Biosynthese.^a

halogenhaltige Benzoessäuren	hydroxylhaltige Benzoessäuren
2-Fluorbenzoessäure	2-Hydroxybenzoessäure
3-Fluorbenzoessäure	3-Hydroxybenzoessäure
4-Fluorbenzoessäure	4-Hydroxybenzoessäure
2-Fluor-6-hydroxybenzoessäure ^b	2-Hydroxy-4-methylbenzoessäure
4-Fluor-2-hydroxybenzoessäure	3-Amino-2-hydroxybenzoessäure
2,3,4,5,6-Pentafluorbenzoessäure	3-Hydroxy-4-methoxybenzoessäure
2-Chlorbenzoessäure	4-Hydroxy-3-methoxybenzoessäure
3-Chlorbenzoessäure	
2-Brombenzoessäure	
heteroaromatische Carbonsäuren	andere Benzoessäuren
Picolinsäure	Benzoessäure
Isonicotinsäure	2-Cyanobenzoessäure
1-Hydroxy-6-oxo-1,6-dihydropyridin-2-carbonsäure	3-Cyanobenzoessäure
2-Aminonicotinsäure	2-Formylbenzoessäure
2-Chlornicotinsäure	2-Mercaptobenzoessäure
2-Hydroxynicotinsäure	3,4-Dimethoxybenzoessäure
Nicotinsäure-1-oxid	
Isonicotinsäure-N-oxid	
Furan-3-carbonsäure	
Thiophen-3-carbonsäure	
Pyrrol-3-carbonsäure	
1H-Imidazol-4-carbonsäure	

^aFalls nicht anders angegeben, wurden die notwendigen Substanzen über die Firmen Sigma-Aldrich, VWR International oder Carl Roth bezogen.

^bDiese Substanz wurde von Dr. S. Schieferdecker synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Produktion und Isolierung neuer Myxochelin-Derivate

Für die Produktion von neuen Derivaten mittels Präkursor-gesteuerter Biosynthese wurde *P. fallax* HKI727 in je 3,0 L MD1-Medium mit 2,0% (w/v) Amberlite® XAD7HP (Sigma-Aldrich) bei 30 °C und 130 UpM kultiviert. Die entsprechenden Präkursoren wurden als sterilfiltrierte Lösungen (Endkonzentration: 33 mg L⁻¹) unmittelbar vor dem Animpfen der Kulturen in das Medium gegeben. Dabei wurden jene Bausteine verfüttert, welche bei den initialen Screeningkulturen in vermeintlich neue Myxocheline inkorporiert worden waren. Nach 7 Tagen Kultivierung wurde das Harz XAD7HP durch Filtration von der Kulturbrühe entfernt und mit Aceton extrahiert. Der Rohextrakt wurde getrocknet, in 60%-igem wässrigen Methanol gelöst und anschließend dreimal mit dem gleichen Volumen Dichlormethan extrahiert. Die Dichlormethan-Phasen wurden vereint und durch eine offene Säulenchromatographie weiter aufgetrennt. Als stationäre Phase dienten 30,0 g Kieselgel 60 (Merck). Die

Material und Methoden

3.1 Generierung neuer Myxochelin-Derivate mittels Präkursor-gesteuerter Biosynthese

Elution der Verbindungen von der Säule startete mit 200 mL Dichlormethan, gefolgt von je 200 mL Ethylacetat, Aceton und Methanol. Die Fraktionen wurden getrocknet und mittels LC/MS- sowie ^1H -NMR-Messungen auf die Anwesenheit von Myxochelin-Derivaten hin untersucht. Für die Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: nuclear magnetic resonance; NMR) wurden die getrockneten, wasserfreien Extrakte in deuteriertem Methanol ($[\text{D}_4]\text{MeOH}$) gelöst. Ein- und zweidimensionale NMR-Daten wurden an einem Bruker Avance Spektrometer aufgenommen.

Die Aufreinigung der einzelnen Myxochelin-Derivate verlangte zwei separate HPLC-Schritte. Diese wurden an einem Shimadzu HPLC-System (LC-20AT, SPD-M20A) mit folgenden Fließmitteln durchgeführt: A) Reinstwasser mit 0,1% Trifluoressigsäure und B) Methanol. Der erste Aufreinigungsschritt erfolgte an einer Nucleodur C₁₈ HTec Säule (250 x 10 mm, 5 μm ; Macherey-Nagel) und die zweite Aufreinigung an einer Nucleodur C₁₈ Isis Säule (250 x 10 mm, 5 μm ; Macherey-Nagel) bei einer Flussrate von je 2,0 mL min⁻¹. Abhängig davon, welches Myxochelin-Derivat aufgereinigt wurde, variierte die Zusammensetzung der mobilen Phase (Tab. 2). Die Elution der Myxochelin-Derivate wurde bei den Wellenlängen 210, 245 und 310 nm detektiert. Die Strukturaufklärung der einzelnen Verbindungen erfolgte in Kooperation mit Dr. S. Schieferdecker mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie über LC/MS-Messungen.

Tabelle 2: Zusammensetzung der mobilen Phase für die Aufreinigung der Myxochelin-Derivate mittels HPLC.

Myxochelin-Derivat	Erster Aufreinigungsschritt (Gradient)	Zweiter Aufreinigungsschritt (Isokratisch)
J1, J2	50,0% → 100% B in 15 Minuten	55,0% B
J3	70,0% → 100% B in 60 Minuten	57,5% B
J4	70,0% → 100% B in 60 Minuten	65,0% B
J5	70,0% → 100% B in 60 Minuten	55,0% B
J6, J7, J8	10,0% → 100% B in 10 Minuten	55,0% B
J9, J10	70,0% → 100% B in 15 Minuten	50,0% B
J11	70,0% → 100% B in 15 Minuten	75,0% B
J12	70,0% → 100% B in 15 Minuten	50,0% B
J13, J14	60,0% → 100% B in 15 Minuten	55,0% B

Material und Methoden

3.1 Generierung neuer Myxochelin-Derivate mittels Präkursor-gesteuerter Biosynthese

3.1.4 Bestimmung der Eisenaffinität

Die neu generierten Myxochelin-Derivate wurden mittels Chromazurol S (CAS)-Assay auf ihre eisenkomplexierenden Eigenschaften getestet. Dazu wurden in eine Petrischale 20 mL eines modifizierten CAS-Agar gegossen.^{205,206} Nach Erkalten des Agars wurden Löcher ausgestanzt, in welche je 50 μL der zu testenden Lösung pipettiert wurden. Dazu wurden die Myxocheline im Vorfeld in Methanol gelöst (Endkonzentration: $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$). Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurden die Farbveränderungen im CAS-Agar optisch evaluiert.

Für die Herstellung des modifizierten CAS-Agars wurde eine blaue Färbelösung und eine sogenannte Mix-Lösung benötigt.^{205,206} Für die Färbelösung mussten 50 mL einer CAS-Lösung (0,12% (w/v) CAS in ddH₂O) mit 9 mL einer Eisen-Lösung (0,027% (w/v) FeCl₃·6H₂O in 10 mM HCl) und 40 mL einer Cetyltrimethylammoniumbromid (CTABr)-Lösung (0,18 % (w/v) CTABr in ddH₂O) gemischt werden. Die Färbelösung sollte blau erscheinen und wurde nach Anfertigung autoklaviert. Die Mix-Lösung (0,1% (w/v) CaCl₂·2H₂O; 3,24% (w/v) PIPES pH 6,8; 0,3% (w/v) Casiton; 1,5% (w/v) Agar) wurde ebenfalls autoklaviert. Zu je 1,0 L fertiger Mix-Lösung wurden final 100 mL der Färbelösung zugegeben.

3.2 Genetische Veränderungen der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

3.2.1 Bioinformatische Analysen

Für den Vergleich der Myxochelin-Cluster aus *S. aurantiaca* Sg a15, *M. xanthus* DK1622 und *P. piscicida* S2040 wurden die jeweiligen Sequenzen der Datenbank GenBank entnommen.²⁰⁷ Homologien zwischen verschiedenen Sequenzen wurden unter Verwendung des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) eruiert.²⁰⁸ Alle benötigten Proteinsequenzen wurden ebenfalls GenBank entnommen.²⁰⁷ Die frei zugängliche Software GeneStudio Pro wurde für die Assemblierung von Sequenzen sowie für die Generierung multipler Alignments verwendet. Für die Erstellung, Visualisierung und Dokumentation von Vektorkarten, Klonierungen, DNA-Fragmenten und Polymerasekettenreaktionen (engl.: polymerase chain reactions; PCR) wurde die Software SnapGene genutzt. Codon-Anpassungen wurden manuell unter Zuhilfenahme der Kazusa Datenbank durchgeführt.²⁰⁹ Vorhersagen bezüglich der Domänen-Architektur von NRPS-Enzymkomplexen wurden unter Verwendung des online Tools PKS/NRPS Predictor²¹⁰ und der Pfam Datenbank²¹¹ erstellt.

3.2.2 Stämme und Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *M. xanthus* DSM16526 erfolgte in modifiziertem CTPM-Medium (1,0% (w/v) Casiton; 0,12% (w/v) Tris; 0,02% (w/v) KH₂PO₄; 0,06% (w/v) MgSO₄; 0,5 mg L⁻¹ Vitamin B₁₂, pH 7,5).²¹² Flüssigkulturen wurden bei 30 °C auf einem Schüttelinkubator mit 130 UpM kultiviert. *Escherichia coli* DH5α- und *E. coli* BL21(DE3)-Flüssigkulturen wurden routinemäßig in LB-Medium (engl.: lysogeny broth; Carl Roth) bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator mit 200 UpM inkubiert. Falls erforderlich wurde dem Medium Ampicillin (100 µg mL⁻¹) oder Kanamycin (50 µg mL⁻¹) als Selektionsmarker zugesetzt.

3.2.3 Verwendete Plasmide und Nukleinsäuren

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 gelistet. Der *E. coli* – *M. xanthus* Shuttlevektor pZJY156^{194,214} wurde durch die Firma ATG:biosynthetics synthetisiert. Für die Erweiterung der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus* DSM16526 wurde das synthetische Gen *mxmM* in den Wildtyp-Stamm eingebracht. Das Gen stammte nativ aus *P. piscicida* S2040 und kann unter der Locus-Kennzeichnung

Material und Methoden

3.2 Genetische Veränderungen der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

TW75_RS20450 in GenBank gefunden werden. Die entsprechende Zugangsnummer für die Proteinsequenz lautet WP_045965770. Die native Gensequenz wurde manuell an die Codon-Nutzung von *M. xanthus* angepasst. Die Codon-adaptierte Sequenz des Gens wurde durch die Firma ATG:biosynthetics synthetisiert. Die Nukleotidsequenz des synthetischen *mxmM*-Gens wurde in GenBank unter der Zugangsnummer MH248775 hinterlegt.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren.

Kommerziell erworbene Plasmide		
Plasmid	relevante Eigenschaften ^a	Vektorkarten
pBHR1	Abkömmling des Plasmids pBBR122; ²¹³ Kan ^R , Cm ^R (MoBi Tec)	Abb. A1, Anhang
pET-28a(+)	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor; Kan ^R (Novagen)	Abb. A2, Anhang
pJET1.2	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor; Amp ^R (Thermo Fisher Scientific)	Abb. A3, Anhang
pMycoMar	Mutagenese-Vektor; ²¹⁵ Minitransposon <i>magellan 4</i> , <i>Himar1</i> Transposase, Kan ^R (Harvard Medical School)	Abb. A4, Anhang
pZJY156_JK	Abkömmling des Vektors pZJY156; ^{194,214} Amp ^R , Kan ^R (ATG:biosynthetics)	Abb. A5, Anhang
In dieser Arbeit erstellte Plasmide		
pJK1	Subklonierungsvektor; pJET1.2 mit der Promotorsequenz P _{cuoA} aus <i>M. xanthus</i> DSM16526; Amp ^R	Abb. A6, Anhang
pJK2	Subklonierungsvektor; pZJY156_JK- <i>mxmM</i> ; Kan ^R	Abb. A7, Anhang
pJK3	<i>M. xanthus</i> -Expressionsvektor mit P _{cuoA} Promotor; pZJY156_JK-P _{cuoA} - <i>mxmM</i> ; Kan ^R	Abb. 16A, S. 59 / Abb. A8, Anhang
pJK4 ^b	Subklonierungsvektor; pJET1.2 mit der Promotorsequenz P _{pilA} aus <i>M. xanthus</i> DSM16526; Amp ^R	Abb. A9, Anhang
pJK5 ^b	<i>M. xanthus</i> -Expressionsvektor mit P _{pilA} Promotor; pZJY156_JK-P _{pilA} - <i>mxmM</i> ; Kan ^R	Abb. 16C, S. 59 / Abb. A10, Anhang
pJK6	Subklonierungsvektor; pJET1.2 mit einer <i>mxmG</i> -Partiallysequenz aus <i>M. xanthus</i> DSM16526; Amp ^R	Abb. A11, Anhang
pJK7	<i>M. xanthus mxmG</i> -Disruptionsvektor; pBHR1- <i>mxmG</i> ; Kan ^R	Abb. A12, Anhang
pJK8	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor; pET-28a(+)- <i>mxmM</i> ; Kan ^R	Abb. A13, Anhang

^aAbkürzungen: Amp^R, Ampicillin-Resistenz; Cm^R, Chloramphenicol-Resistenz Kan^R, Kanamycin-Resistenz. ^bDie Vektoren pJK4 und pJK5 wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konzipiert und gemäß diesen Vorlagen von B. Sc. L. Winand im Labor kloniert.

Material und Methoden

3.2 Genetische Veränderungen der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

3.2.4 Allgemeine DNA-Standardarbeiten

Die Nukleotidsequenzen von Primern wurden manuell abgeleitet und mit Hilfe der online verfügbaren Plattform OligoCalc analysiert. Oligonukleotide bzw. Primer wurden sowohl von der Firma Eurofins Genomics, als auch von der Firma Sigma-Aldrich bestellt.

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese unter Verwendung von TAE-Puffer (0,5% (w/v) Tris; 0,04% (w/v) EDTA; 0,1% (v/v) Eisessig, pH 8,3 – 8,6).²¹⁶ Zur Visualisierung der DNA wurde dem Agarosegel 0,1% (w/v) Ethidiumbromid zugesetzt. Genomische DNA wurde in einem 0,8%-igem Agarosegel bei einer Spannung von 80 V, PCR-Amplifikate und DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau in einem 1,0%-igem Agarosegel bei 120 V aufgetrennt.

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers.

Die Qualität und Quantität von DNA in Lösung wurde mittels Absorptionsmessung an einem Spektralphotometer (NanoDrop 2000, PeqLab) bestimmt.

Für den Restriktionsverdau von DNA wurden FastDigest Enzyme (Thermo Fisher Scientific) mit entsprechendem FastDigest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit einer T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific). Falls erforderlich wurde die geschnittene Plasmid-DNA vor der Ligation durch Verwendung der FastAP Alkalischen Phosphatase (Thermo Fisher Scientific) dephosphoryliert.

Sequenzierungen von Nukleotidsequenzen wurden sowohl von der Firma Eurofins Genomics, als auch von der Firma Microsynth Seqlab durchgeführt.

Für die Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Roti®-Prep Plasmid MINI Kit (Carl Roth) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

3.2.5 Extraktion von genomischer DNA aus *M. xanthus*

Die genomische DNA von *M. xanthus* DSM16526 wurde mit einigen Veränderungen gemäß eines bereits veröffentlichten Protokolls extrahiert.²¹⁷ Aus einer Flüssigkultur wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet, mit einem Stößel mechanisch

Material und Methoden

3.2 Genetische Veränderungen der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

aufgeschlossen und umgehend in eisgekühltem PBS-Puffer (0,8% (w/v) NaCl; 0,14% (w/v) Na₂HPO₄; 0,027% (w/v) KH₂PO₄; 0,02% (w/v) KCl) suspendiert.²¹⁶ Die Suspension wurde zentrifugiert, das Pellet in SET-Puffer (0,44% (w/v) NaCl; 0,73% (w/v) EDTA; 0,24% (w/v) Tris) resuspendiert und mit Lysozym (Endkonzentration: 1,0 mg mL⁻¹) sowie RNase A (Endkonzentration: 1,0 mg mL⁻¹) versetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C wurden 0,1 Volumenanteile (v/v) einer 10%-igen SDS-Lösung sowie Proteinase K (Endkonzentration: 1,0 mg mL⁻¹) zugegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation der Proben für 60 Minuten bei 55 °C, bevor 0,3 Volumenanteile (v/v) einer 6 M NaCl-Lösung und 2,0 Volumenanteile (v/v) einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)-Lösung hinzugegeben wurden. Die Proben wurden gut durchmischt und anschließend zentrifugiert, um eine saubere Phasentrennung zu erhalten. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die genomische DNA durch Zugabe von 1,0 Volumenanteilen (v/v) eisgekühltem Isopropanol präzipitiert. Anschließend wurde die DNA dreimal mit 70%-igem wässrigem Ethanol gewaschen, bevor sie getrocknet und final in Reinstwasser resuspendiert wurde.²¹⁷

3.2.6 Extraktion von Plasmid-DNA aus *M. xanthus*

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus *M. xanthus* DSM16526 erfolgte mit einigen Abweichungen gemäß den Angaben von Zhao und Kollegen.¹⁹⁴ Aus einer Flüssigkultur in der frühen stationären Phase wurde eine Probe von 2,0 mL entnommen, die Zellen mittels Zentrifugation geerntet (13000 UpM, 4 °C, 5 min) und anschließend in 200 µL Resuspensions-Puffer (10,3% (w/v) Saccharose; 0,3% (w/v) Tris; 0,73% (w/v) EDTA; 0,2% (w/v) Lysozym; 10,0% (w/v) RNase A) aufgenommen und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 400 µL Lyse-Puffer (1,2% (w/v) NaOH; 2,0% (w/v) SDS) und anschließend von 500 µL eisgekühltem Neutralisierungs-Puffer (29,5% (w/v) Kaliumacetat, pH 4,8),^{194,218} bevor die Probe für weitere 5 bis 10 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Die Suspension wurde zentrifugiert (13000 UpM, 4 °C, 10 min), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1,0 Volumenanteilen (v/v) eisgekühltem Isopropanol präzipitiert. Die Probe wurde für zwei Stunden auf Eis inkubiert, zentrifugiert (10000 UpM, 4 °C, 10 min) und das Pellet mit 70%-igem wässrigem Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde getrocknet und final in Reinstwasser gelöst.

Material und Methoden

3.2 Genetische Veränderungen der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

3.2.6 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mittels Calciumchlorid-Methode.²¹⁹ Eine Vorkultur wurde in 5 mL LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator mit 200 UpM inkubiert. Am Folgetag wurde die Hauptkultur in SOB-Medium (2,0% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,06% (w/v) NaCl; 0,02% (w/v) KCl, pH 7,0) angeimpft.²²⁰ Die optische Dichte der Kultur zum Startzeitpunkt, gemessen bei 600 nm (OD₆₀₀), lag bei 0,1. Die *E. coli*-Hauptkultur wurde auf einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 UpM inkubiert, bis die OD₆₀₀ einen Wert von 0,4 erreichte. Die Kultur wurde anschließend für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor Proben von je 1,0 mL Volumen entnommen und für 10 Minuten bei 4 °C und 5600 UpM zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1,0 mL eisgekühlter 0,1 M CaCl₂-Lösung suspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µL eisgekühlter 0,1 M CaCl₂+15%-iger (v/v) Glycerol-Lösung resuspendiert. Für eine längerfristige Lagerung der chemisch kompetenten Zellen wurden diese umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C eingelagert.

Für die Transformation wurden je 100 µL der chemisch kompetenten Zellen mit 5-10 µL eines Ligationsansatzes bzw. mit 2,5-5 µL aufgereinigter Plasmid-DNA versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte die Hitzeschockbehandlung bei 42 °C für 90 Sekunden. Die Zellen kühlten anschließend für 5 Minuten auf Eis ab, bevor sie in je 1,0 mL SOC-Medium (2,0% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,06% (w/v) NaCl; 0,02% (w/v) KCl; 0,2% (w/v) MgCl₂·6H₂O; 0,36% (w/v) Glukose, pH 7,0) aufgenommen wurden.²²⁰ Die Regeneration der Zellen erfolgte in Abhängigkeit des verwendeten Selektionsmarkers für 60 bis 90 Minuten bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator mit 200 UpM. Die Selektion von Transformanten erfolgte über Nacht bei 37 °C auf LB-Agar unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums.

3.2.7 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) aufgetrennt.²²¹ Das Sammelgel setzte sich wie folgt zusammen: 25% (v/v) Sammelgelpuffer; 5% (v/v) Acrylamidlösung (Carl Roth); 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat (Merck) / 0,1% (v/v) Tetramethylethylendiamin (Carl Roth); mit folgendem Sammelgelpuffer: 1 M TrisHCl pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS. Das Trenngel hatte folgende Zusammensetzung: 25% (v/v) Trenngelpuffer; 10% (v/v)

Material und Methoden

3.2 Genetische Veränderungen der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

Acrylamidlösung (Carl Roth); 0,05% (w/v) Ammoniumpersulfat (Merck); 0,05% (v/v) Tetramethylethyldiamin (Carl Roth), mit folgendem Trenngelpuffer: 1,5 M TrisHCl pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS.

Vor dem Auftragen der Proteinproben auf das Gel wurden diese mit Roti®-Load 1 (Carl Roth) und Reducing Agent (Fermentas) versetzt, für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend zentrifugiert (12000 UpM, 10 min). Nach der Auftrennung der Proteine erfolgte ihre Fixierung im Gel. Dazu wurde das Gel für 30 Minuten in einer Fixierlösung (20% (v/v) Methanol; 7,5% (v/v) Eisessig) inkubiert. Für die Visualisierung der Proteine wurde das Gel anschließend für 30 Minuten in einer Färbelösung (0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250; 50% (v/v) Methanol; 5% (v/v) Essigsäure) und nachfolgend in einer Entfärbelösung (10% (v/v) Methanol; 5% (v/v) Essigsäure) inkubiert.

3.2.8 Produktion und Aufreinigung von rekombinantem His₆-MxcM

Die in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten entstanden in Zusammenarbeit mit B. Sc. L. Winand im Rahmen ihrer Masterarbeit. Das synthetische Gen *mxmM* wurde in die EcoRI-Schnittstelle des Plasmids pET-28a(+) kloniert. Der gebildete Vektor pJK8 (Abb. A13, Anhang) wurde anschließend in chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen eingebracht, wodurch der Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3):pJK8 generiert wurde. Für die Produktion von Hexahistidin-markiertem MxcM wurde der Expressionsstamm bei 37 °C in Terrific Broth (TB)-Medium (12,0% (w/v) Trypton, Pepton; 24,0% (w/v) Hefeextrakt; 0,4% (v/v) Glycerol; 2,3% (w/v) KH₂PO₄; 12,5% (w/v) K₂HPO₄) auf einem Schüttelinkubator mit 200 UpM kultiviert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression von *mxmM* durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; Endkonzentration: 1 mM) induziert. Die Kultivierung wurde für weitere 20 Stunden bei 16 °C fortgesetzt, bevor die Zellen durch Zentrifugation (4000 UpM, 15 min, 4 °C) geerntet und anschließend in Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0; 10 mM Imidazol; 300 mM NaCl; 10% (v/v) Glycerol) suspendiert wurden. Nach dem Aufschluss der Zellen mittels Ultraschallbehandlung wurden die Zellbruchstücke durch Zentrifugation (4500 UpM, 30 min, 4 °C) aus der Suspension entfernt. Mittels Affinitätschromatographie wurde das Hexahistidin-markierte MxcM-Enzym aus dem Überstand aufgereinigt. Als stationäre Phase diente dabei Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel) mit immobilisierten Ni²⁺-Ionen auf einer nitrilotriessigsäurehaltigen Matrix, eingebettet in einer Polypropylen-Säule

Material und Methoden

3.2 Genetische Veränderungen der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

(Qiagen). Die Elution des rekombinanten Enzyms von der Matrix erfolgte mit Lysepuffer, der insgesamt 250 mM Imidazol enthielt. Anschließend wurde die Probe durch Verwendung einer PD-10 Säule (GE Healthcare Life Sciences) entsalzt und durch Zentrifugation mit einem Amicon Zentrifugationsfilter (Ultra-15, Merck Millipore) aufkonzentriert. Die Anwendung erfolgte gemäß den Angaben der Hersteller. Das aufgereinigte His₆-MxcM Enzym wurde in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen.

3.2.9 *In vitro*-Studien mit His₆-MxcM

Die in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten entstanden in Zusammenarbeit mit B. Sc. L. Winand im Rahmen ihrer Masterarbeit. Myxochelin B wurde von Dipl.-Pharm. A. Sester (TU Dortmund / Lehrstuhl Technische Biologie) aufgereinigt und für die nachfolgenden Experimente zur Verfügung gestellt. Für die Überprüfung einer *in vitro*-Konversion von Myxochelin B zu Pseudochelin A wurde das aufgereinigte His₆-MxcM-Enzym (Endkonzentration: 2 µM) mit Myxochelin B (Endkonzentration: 0,5 mM) und TrisHCl-Puffer (Endkonzentration: 50 mM, pH 7,0) in einem Gesamtvolumen von 0,5 mL bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde Myxochelin B ohne rekombinantes Enzym sowie das rekombinante Enzym ohne Myxochelin B inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 15% (v/v) Acetonitril gestoppt. Die Produktbildung wurde mittels LC/MS-Messungen analysiert. Zudem wurde der Assay analog mit Myxochelin A als Substrat wiederholt. Das hierfür eingesetzte Myxochelin A wurde zuvor im Zuge der Präkursor-gesteuerten Biosynthese aus der Kulturbrühe von *P. fallax* HKI727 (s. Kapitel 3.1.3, S. 33 ff.) isoliert und aufgereinigt.

3.2.10 Studien zur Transformierbarkeit von *M. xanthus* DSM16526

M. xanthus wurden mittels Elektroporation transformiert.^{58,68} Folgende Plasmide wurden dabei eingesetzt: pET-28a(+), pMycoMar, pZJY156_JK und pBHR1. Der *M. xanthus* DSM16526 Wildtyp-Stamm wurde im Vorfeld als sensitiv gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin getestet. Für die Transformation wurden daher Plasmide eingesetzt, welche eine Kanamycin-Resistenz vermitteln und eine Selektion von positiven Transformanten auf kanamycinhaltigem Agar ermöglichten.

Die Generierung elektrokompenter *M. xanthus* DSM16526-Zellen erfolgte gemäß Literaturangaben.^{58,68} Eine Vorkultur von *M. xanthus* wurde in CTPM-Medium

Material und Methoden

3.2 Genetische Veränderungen der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

angeimpft und für 2 bis 3 Tage auf einem Schüttelinkubator bei 30 °C und 130 UpM kultiviert. Für die Hauptkultur wurden 2,0 mL der Vorkultur in 50 mL CTPM-Medium überführt und in einem Schikanekolben für 26 Stunden bei 30 °C und 130 UpM kultiviert. Anschließend wurden die Zellen aus je 2,0 mL Kulturbrühe durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 5000 UpM und 10 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1,0 mL eisgekühltem Reinstwasser gewaschen. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und die Zellen noch zwei weitere Male mit eisgekühltem Reinstwasser gewaschen. Die elektrokompetenten Zellen wurden final in 50 µL eisgekühltem Reinstwasser gelöst.

Die Plasmid-DNA wurde vor der Elektroporation mittels Alkohol-fällung aufgereinigt und aufkonzentriert.²¹⁶ Dazu wurde die DNA in Reinstwasser gelöst und mit 0,1 Volumenanteilen (v/v) einer 3,0 M Natriumacetat-Lösung versetzt. Nach Zugabe von einem Volumenanteil Isopropanol wurde die DNA-haltige Lösung mehrmals invertiert, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 13000 UpM für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Plasmid-DNA mehrere Male mit 70%-igem wässrigem Ethanol gewaschen, getrocknet und final in Reinstwasser resuspendiert.²¹⁶

Für die Elektroporation wurden 50 µL der elektrokompetenten *M. xanthus*-Zellen in einer eisgekühlten 0,2 cm Elektroporationsküvette mit 0,5 bis 1,0 µg aufgereinigter Plasmid-DNA versetzt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser Xcell™ Elektroporationssystem (Bio-Rad Laboratories, Inc.) unter folgenden Bedingungen: 400 Ω, 25 µF und 0,6 kV. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1,0 mL eisgekühltem CTPM-Medium aufgenommen. Die Regeneration erfolgte für 6 Stunden bei 32 °C auf einem Schüttelinkubator. Transformanten wurden auf CTPM-Agar unter Zugabe von 50 µg mL⁻¹ Kanamycin bei 30 °C selektiert. Nach 4 bis 5 Tagen Inkubationszeit konnte das Wachstum von Transformanten eindeutig identifiziert werden.

3.2.11 Konstruktion von Expressionsvektoren für *M. xanthus*

Das Rückgrat der Expressionsvektoren lieferte der *E. coli* – *M. xanthus* Shuttlevektor pZJY156_JK (Abb. A5, Anhang).^{194,214} Das Zielgen für die Expression war das synthetische Gen *mxCM*, welches zunächst in die EcoRI-Restriktionsschnittstelle des Vektors ligiert wurde, wodurch der Vektor pJK2 entstand (Abb. A7, Anhang).

Material und Methoden

3.2 Genetische Veränderungen der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

Es wurden zwei verschiedene Expressionsvektoren (pJK3 und pJK5) mit unterschiedlichen Promotorsequenzen erstellt. In Vektor pJK3 (Abb. A8, Anhang) wurde die Expression des synthetischen *mxoM*-Gens unter Kontrolle des Kupfer-induzierbaren Promotors P_{cuoA} gestellt. Die Aktivität des Promotors korreliert linear mit der Konzentration von Kupfer im Medium.^{222,223} Mit den Primern p357 (5'-GCATGGATCCGAAGCCTCTTCACGAATGATGG-3'; mit BamHI-Restriktionssequenz) und p358 (5'-GAGCTCTAGATGTGGCCATGAACGGCACTTCACG-3'; mit XbaI-Restriktionssequenz) wurde die 825 bp große Promotorregion des Kupfer-Oxidase-Gens *cuoA* (MXAN_3420) aus *M. xanthus* amplifiziert. Für die Amplifikation wurde der Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) verwendet, welcher die Phusion Flash High-Fidelity DNA-Polymerase enthält. Eine PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 20 μ L setzte sich wie folgt zusammen: Phusion Flash Master Mix (1-fach konzentriert), Primer p357 und p358 (je 0,4 μ M) und genomische DNA von *M. xanthus* (100 ng). Unter folgenden Bedingungen wurde die PCR durchgeführt: 98 °C für 10 s (1 Zyklus); 98 °C für 1 s, 64 °C für 5 s und 72 °C für 12 s (30 Zyklen); und 72 °C für 60 s (1 Zyklus). Die Amplifikate wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die 825 bp große P_{cuoA} -Promotorsequenz aus dem Gel extrahiert, in den Vektor pJET1.2 ligiert und unter Verwendung von *E. coli* DH5 α zwischenkloniert. Daraus resultierte der Subklonierungsvektor pJK1 (Abb. A6, Anhang). Anschließend wurde die P_{cuoA} -Sequenz unter Verwendung der Restriktionsenzyme BamHI und XbaI aus Vektor pJK1 ausgeschnitten. Der Vektor pJK2 wurde ebenfalls mit BamHI und XbaI verdaut, und die ausgeschnittene Rückgrat-Sequenz mit der Promotorsequenz ligiert, wodurch der Expressionsvektor pJK3 entstand (Abb. A8, Anhang).

In den zweiten Expressionsvektor pJK5 (Abb. A10, Anhang) wurde dagegen der konstitutive Promotor P_{pilA} eingebaut.²²⁴ Dafür wurde zunächst die 207 bp große Promotorsequenz des Gens *pilA* (MXAN_5783)²²⁴ unter Verwendung der Primer p493 (5'-GGATCCGGGAGCGCTTCGGATGCGTAG-3'; mit BamHI-Restriktionssequenz) und p494 (5'-GGTACCGGGGTCTCAGAGAAGG-3'; mit KpnI-Restriktionssequenz) amplifiziert. Für die PCR wurde der Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) mit den eben genannten Bedingungen durchgeführt. Das Amplifikat wurde in den Vektor pJET1.2 zwischenligiert, wodurch der Subklonierungsvektor pJK4 (Abb. A9, Anhang) gebildet wurde. Die *pilA*-Promotorsequenz wurde nachfolgend mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI aus Plasmid pJK4 ausgeschnitten und in den ebenfalls BamHI-KpnI-verdauten Vektor

Material und Methoden

3.2 Genetische Veränderungen der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

pJK2 ligiert, wodurch der zweite Expressionsvektor pJK5 (Abb. A10, Anhang) entstand.

3.2.12 Entwicklung eines *M. xanthus*-Expressionsstamms

Die Expressionsvektoren pJK3 und pJK5 wurden mittels Elektroporation in kompetente *M. xanthus* DSM16526-Zellen eingebracht. Positive Transformanten wurden auf CTPM-Agar unter Zugabe von Kanamycin selektiert. Nach einigen Subkultivierungen wurden die Transformanten mittels Kolonie-PCR auf die Anwesenheit von autonomen, nicht ins Genom integrierten Plasmiden hin untersucht. Die Primer p352 (5'-GCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACG-3') und p353 (5'-CCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGG-3') wurden für die Amplifikation der kompletten Vektorsequenz eingesetzt (Größe pJK3: 8,9 kbp; Größe pJK5: 8,3 kbp). Beide Primer hybridisierten aneinander angrenzend, aber in entgegengesetzter Orientierung zueinander, innerhalb des Kanamycin-Resistenzgens *aphII* (Abb. A8, A10, Anhang). Für die Kolonie-PCR wurde Biomasse der *M. xanthus*-Transformanten von der Agarplatte entnommen, in Reinstwasser suspendiert und für 3 Minuten bei 99 °C erhitzt. Die Suspension wurde zentrifugiert und der Überstand für die PCR eingesetzt. Eine Reaktion enthielt ein Volumen von 25 µL und setzte sich wie folgt zusammen: DreamTaq Green Buffer (1-fach konzentriert; Thermo Fisher Scientific), dNTP-Mix (0,2 mM von jedem dNTP), Primer p352 und p353 (je 0,25 µM), DMSO (5,0% (v/v)), Überstand der Zellsuspension (je 2 µL) und DreamTaq DNA-Polymerase (0,8 Units; Thermo Fisher Scientific). Die optimale Hybridisierungstemperatur der Primer p352 und p353 wurde durch einen Temperatur-Gradienten von 55 °C bis 69 °C detektiert. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 95 °C für 3 min (1 Zyklus); 95 °C für 45 s, 55 °C / 61 °C / 69 °C für 30 s und 72 °C für 8 min (30 Zyklen); und 72 °C für 10 min (1 Zyklus).

Die jeweiligen PCR-Produkte wurden nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel aufgereinigt und als DNA-Matrizen für nachfolgende PCR's eingesetzt. In dieser wurden verschiedene Abschnitte der Expressionsvektoren amplifiziert. Die Primer p268 (5'-GGATTGCACGCAGGTTCTCCGG-3') und p269 (5'-CGATAGAAGGCGA TGCGCTGCG-3') amplifizierten das Kanamycin-Resistenzgen *aphII*, die Primer p342 (5'-CTGGTGCCTGTCGTCATGGAGAC-3') und p343 (5'-CACGCACACCGACG AGTCATAG-3') den aus pMF1-stammenden Replikationsursprung, und die Primer p344 (5'-GCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC-3') und p345 (5'-GCCGAGACGAAAGGG

Material und Methoden

3.2 Genetische Veränderungen der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

CCTCGTGATACGCC-3') den aus pBR332-stammenden Replikationsursprung sowie das Ampicillin-Resistenzgen *bla*. Für die Amplifikation wurde die DreamTaq DNA-Polymerase verwendet. Eine Reaktion enthielt ein Volumen von 25 µL und setzte sich wie folgt zusammen: DreamTaq Green Buffer (1-fach konzentriert; Thermo Fisher Scientific), dNTP-Mix (0,2 mM von jedem dNTP), Primer vorwärts und rückwärts (je 0,25 µM), Dimethylsulfoxid (DMSO; 5,0% (v/v)), aufgereinigte DNA-Matrize (~20-50 ng) und DreamTaq DNA-Polymerase (0,8 Units; Thermo Fisher Scientific). Die PCR wurde wie folgt durchgeführt: 95 °C für 1 min (1 Zyklus); 95 °C für 20 s, 55 °C / 61 °C / 69 °C für 20 s und 72 °C für 1 min (30 Zyklen); und 72 °C für 2 min (1 Zyklus). Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und ihre Nukleotidsequenzen durch Sequenzierung bestimmt.

3.2.13 Heterologe Produktion von Pseudochelin A in *M. xanthus*

Der *M. xanthus* DSM16526 Wildtyp-Stamm ist ein nativer Produzent von Myxochelin A und B. Um sein natürliches Produktspektrum zu erweitern, wurde das synthetische und Codon-adaptierte Gen *mxmM* unter Verwendung der Expressionsvektoren pJK3 bzw. pJK5 in den Wildtyp eingebracht. Um die Replikation der Vektoren in den entsprechenden *M. xanthus*-Expressionsstämmen zu bewahren, wurden diese stets unter Zugabe von Kanamycin (50 µg mL⁻¹) kultiviert. Zur Steigerung der Myxochelin- bzw. Pseudochelin-Ausbeute wurde das Medium zusätzlich mit 2,3-DHBS (Endkonzentration: 30 mg L⁻¹), sowie 2,0% (w/v) Amberlite® XAD7HP (Sigma-Aldrich) supplementiert. Die Expression von *mxmM* in pJK3 wurde durch Zugabe von 115 µM Kupfer(II)sulfat induziert. Nach 5 Tagen Inkubation wurde das Adsorberharz durch Filtration von der Kulturbrühe getrennt und mit Methanol extrahiert. Die metabolischen Profile der Expressionsstämmen wurden mit dem des *M. xanthus* DSM16526 Wildtyp-Stamms verglichen. Als Referenzen dienten Chromatogramme von Myxochelin A, Myxochelin B und Pseudochelin A. Das dabei eingesetzte Myxochelin A wurde im Vorfeld aus der Kulturbrühe von *P. fallax* HKI727 im Rahmen der Präkursor-gesteuerten Biosynthese (s. Kapitel 3.1.3, S. 33 ff.) isoliert und aufgereinigt. Myxochelin B wurde von Dipl.-Pharm. A. Sester (TU Dortmund / Lehrstuhl Technische Biologie) aufgereinigt und zur Verfügung gestellt. Das verwendete Chromatogramm von Pseudochelin A stammte aus den vorangegangenen *in vitro*-Studien mit rekombinantem His₆-MxmM (s. Kapitel 3.2.9, S. 42). Die Produktion von Pseudochelin A wurde zudem durch LC/MS- und LC/MS/MS-Messungen verifiziert. Myxochelin A diente dabei als Kontrolle.

3.2.14 Klonierung eines Vektors zur Disruption des *M. xanthus mxcG*-Gens

Um den Einfluss der Myxochelin-Biosynthese auf das Wachstum und den Phänotypen von *M. xanthus* DSM16526 beurteilen zu können, wurde die Funktionalität des *mxcG*-Gens durch Einbringen einer fremden DNA-Sequenz gestört. Initial musste dazu ein Disruptionsvektor generiert werden. Das Rückgrat des Disruptionsvektors lieferte der broad-host range Vektor pBHR1 (Abb. A1, Anhang),²¹³ welcher in *M. xanthus* DSM16526 weder autonom repliziert, noch in das Genom integriert wird (diese Daten stammten aus vorangegangenen Experimenten). Zusätzlich wurde eine Teilsequenz aus dem *M. xanthus* DSM16526 *mxcG*-Gen in den Disruptionsvektor ligiert, welche später für die Integration des Vektors in die chromosomale *mxcG*-Sequenz notwendig war. Dazu wurde eine 1,95 kbp große Sequenz aus dem *mxcG*-Gen unter Verwendung der Primer p359 (5'-GCGGCCGCCGAAACACACGAAGCAGGTTG-3'; mit NotI-Restriktionssequenz) und p360 (5'-AGTACTCCTCCACGCTGGCATCGAAGTGC-3'; mit ScaI-Restriktionssequenz) amplifiziert. Als Template für die PCR diente genomische DNA von *M. xanthus* DSM16526. Eine PCR-Reaktion enthielt ein Volumen von 25 µL und setzte sich wie folgt zusammen: DreamTaq Green Buffer (1-fach konzentriert; Thermo Fisher Scientific), dNTP-Mix (0,2 mM von jedem dNTP), Primer p359 und p360 (je 0,3 µM), DMSO (5,0% (v/v)), genomische DNA (100 ng) und DreamTaq DNA-Polymerase (0,8 Units; Thermo Fisher Scientific). Die Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt: 95 °C für 3 min (1 Zyklus); 95 °C für 40 s, 64 °C für 35 s und 72 °C für 2 min (30 Zyklen); und 72 °C für 5 min (1 Zyklus). Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die 1,95 kbp große *mxcG*-Teilsequenz aus dem Gel extrahiert und in den Vektor pJET1.2 ligiert, wodurch der Subklonierungsvektor pJK6 (Abb. A11, Anhang) entstand.

Der Vektor pBHR1 wurde mit den Restriktionsenzymen NotI und ScaI geschnitten und die Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Das 3879 bp große Fragment wurde aufgereinigt und mit der *mxcG*-Teilsequenz, welche im Vorfeld ebenfalls mit den Enzymen NotI und ScaI aus dem Vektor pJK6 ausgeschnitten wurde, ligiert. Somit wurde der Disruptionsvektor pJK7 (Abb. A12, Anhang) gebildet, welcher neben der homologen *mxcG*-Teilsequenz zusätzlich über ein Replikationsprotein für die Vervielfältigung des Plasmids in *E. coli* und eine Kanamycin-Resistenz verfügt.

3.2.15 Generierung von Myxochelin-defizienten *M. xanthus*-Mutanten

Der Disruptionsvektor pJK7 wurde via Elektroporation in den *M. xanthus* DSM16526-Wildtypstamm eingebracht und positive Transformanten auf CTPM-Medium unter Zugabe von Kanamycin selektiert. Nach einigen Subkultivierungen wurden die Kanamycin-resistenten Transformanten mittels Kolonie-PCR auf die Integration des Plasmids pJK7 in ihr genomisches *mxcG*-Gen hin untersucht. Die Zellsuspensionen und PCR-Reaktionen wurden wie in Kapitel 3.2.12 (S. 45) beschrieben vorbereitet. Zwei verschiedene Primerkombinationen wurden für die Amplifikation eingesetzt: p334 (5'-CGTCGAGGACCTGTCCATCG-3') und p338 (5'-CGACTGGAGCATCTCGTCCGTGCG-3') sowie Primer p336 (5'-GGATTCAGTCGTCACCTCATGGTG-3') und p338. Die PCR wurde bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 95 °C für 3 min (1 Zyklus); 95 °C für 45 s, 61 °C für 30 s und 72 °C für 1 min (30 Zyklen); und 72 °C für 3 min (1 Zyklus). Die Größe der Amplifikate lieferte Hinweise über die Position der Plasmid-Integration in das *mxcG*-Gen.

Zusätzlich wurde das metabolische Profil des *M. xanthus*-Wildtypstamms mit zufällig ausgewählten *mxcG*-Disruptionsmutanten verglichen. Dazu wurden die jeweiligen Kulturen in je 250 mL CTPM-Medium kultiviert. Zur Aufrechterhaltung der Insertion erfolgte die Anzucht der Mutanten stets unter Zugabe von Kanamycin (50 µg mL⁻¹). Nach 5 Tagen Kultivierung wurden die Kulturbrühen mit Ethylacetat ausgeschüttelt, das Rohextrakt getrocknet, und anschließend in Methanol aufgenommen. Die produzierten Metabolite wurden durch LC/MS-Messungen verifiziert und mit einem Shimadzu HPLC-System (LC-20AT, SPD-M20A) über eine OTU LipoMare Säule (250 x 4,6 mm, 5 µm; AppliChrom) wie in Kapitel 3.1.2 (S. 32) beschrieben chromatographisch aufgetrennt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Erweiterung der Myxochelin-Vielfalt

4.1.1 Integration nicht nativer Bausteine in den Myxochelin-Biosyntheseweg

Bei einem initialen Screening wurden insgesamt 34 verschiedene Arylcarbonsäuren (s. Tab. 1, S. 33) an *P. fallax* HKI727 verfüttert und auf ihren Einbau in den Myxochelin-Grundkörper hin untersucht. Einzig die Zugabe von 1*H*-Imidazol-4-carbonsäure führte in der entsprechenden Kultur zu einem Wachstumsdefekt. Die anderen Substrate lösten keinen offensichtlichen Effekt auf das Wachstum von *P. fallax* HKI727 aus. Die Screeningkulturen wurden unter Anwesenheit des Adsorberharzes XAD7HP kultiviert, welches zu einem Anstieg der Myxochelin-Ausbeute beiträgt, womöglich durch Minimierung der Feedback-Inhibierung oder einer besseren Wiederfindungsrate der Myxocheline.²²⁵ Nach 7 Tagen Kultivierung wurden die von den Screeningkulturen produzierten Metabolite vom XAD7HP extrahiert und mittels HPLC chromatographisch aufgetrennt. Alle Extrakte enthielten Myxochelin A, welches durch Vergleich mit einem authentischen Standard identifiziert werden konnte. In acht Extrakten erschienen zusätzlich neue Peaks, deren UV-Profile zu denen von Myxochelinen passten (Abb. 11).

Ein Charakteristikum der Myxochelin-Biosynthese ist der Einbau von insgesamt zwei 2,3-DHBS-Einheiten (Abb. 9, S. 25). Nach der Fütterung von strukturell ähnlichen Substraten konnte beobachtet werden, dass eine Aminogruppe von L-Lysin mit dem natürlichen Baustein und die zweite Aminogruppe gleichzeitig mit einem nicht nativen Baustein verknüpft werden konnte. Dadurch entstanden während einer Fermentation bis zu drei neue Myxochelin-Derivate bei Fütterung von nur einem Substrat. Deutlich zu erkennen ist dies in Abb. 11 bei den Chromatogrammen A, E und F, welche aus Kulturen stammten, die mit Benzoesäure, sowie 2-Fluor- bzw. 3-Fluorbenzoesäure gefüttert wurden. In anderen Extrakten konnten während der UV-basierten metabolischen Analyse nur ein oder zwei neue Peaks detektiert werden. Nachfolgende LC/MS-Messungen ergaben, dass auch in diesen bis zu drei neue Derivate auftraten, z.T. jedoch nur in sehr geringen Konzentrationen. Interessanterweise war die Menge an produziertem Myxochelin A im Vergleich zu den neu auftretenden Derivaten relativ gering. Die nicht-supplementierte Kultur produzierte eine vergleichbare Menge an Myxochelin A wie die gefütterten Kulturen (Abb. 11), wodurch angenommen werden

Ergebnisse und Diskussion

4.1 Erweiterung der Myxochelin-Vielfalt

kann, dass die zelluläre Verfügbarkeit von 2,3-DHBS ein limitierender Faktor während der Biosynthese ist.

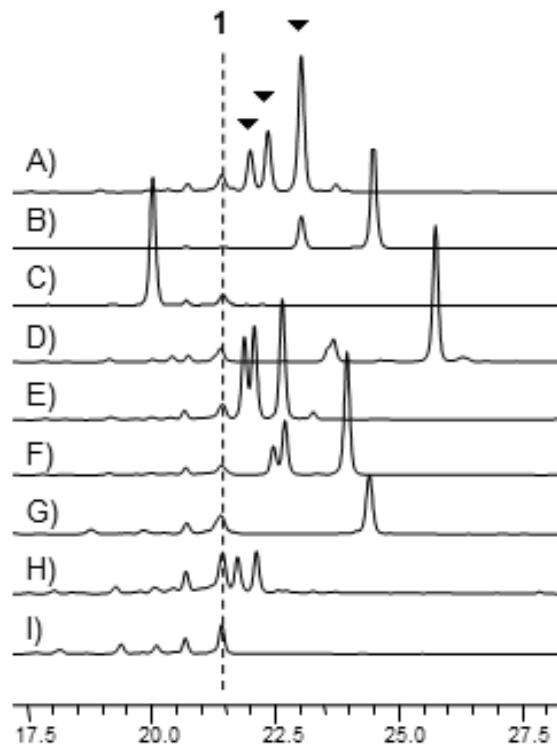


Abbildung 11: Metabolische Analyse der *P. fallax*-Screeningkulturen. Die Kulturen wurden gefüttert mit **A)** Benzoesäure, **B)** 2-Hydroxy-, **C)** 3-Hydroxy-, **D)** 2-Fluor-6-Hydroxy-, **E)** 2-Fluor-, **F)** 3-Fluor-, **G)** 4-Fluor-, und **H)** 2-Chlorbenzoesäure. **I)** Native Kultur. Alle Chromatogramme wurden bei 254 nm aufgenommen. Myxochelin A ist mit einer **1** markiert. Im Chromatogramm **(A)** wurden die neuen Myxochelin-Derivate exemplarisch durch ein Dreieck hervorgehoben. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

In Hinblick auf die Substrat-Spezifität scheinen die an der Myxochelin-Biosynthese beteiligten Enzyme besonders zugänglich für fluorsubstituierte aromatische Bausteine zu sein; eine Beobachtung, die auch schon in anderen Naturstoff-Biosynthesewegen gemacht wurde.²²⁷⁻²³⁰ Mit Ausnahme der 2-Chlorbenzoesäure wurden chlor- und bromhaltige aromatische Bausteine nicht in die Myxochelin-Biosynthese integriert, möglicherweise durch sterische Einschränkungen. Von den hydroxylhaltigen Benzoesäuren wurden die 2- und 3-Hydroxybenzoesäuren von den biosynthetischen Enzymen akzeptiert, wohingegen die 4-Hydroxybenzoesäure nicht eingebaut wurde. Die Zufütterung von verschiedenen heteroaromatischen Carbonsäuren an die *P. fallax* HKI727-Screeningkulturen führte zu keinerlei neuen Derivaten, wodurch an dieser Stelle die Grenzen der enzymatischen Flexibilität innerhalb der Myxochelin-Biosynthese erreicht sein dürften.

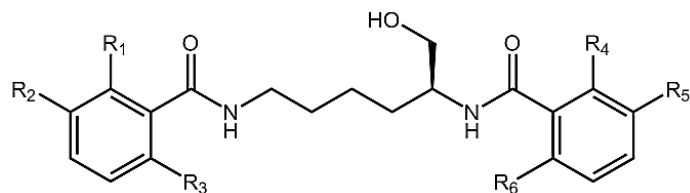
4.1.2 Aufreinigung und Charakterisierung von neuen Myxochelin-Derivaten

Die Fütterungsexperimente wurden mit jenen Substraten wiederholt, bei denen im initialen Screening Peaks von vermeintlichen Myxochelin-Derivaten in den *P. fallax* HKI727-Chromatogrammen detektiert worden waren. Um die Ausbeute zu steigern, wurde das Volumen der Kulturen auf 3,0 L erhöht und die Kultivierung unter Zugabe von XAD7HP durchgeführt. Nach 7 Tagen wurde das Adsorberharz aus der Kulturbrühe entfernt und die daran gebundenen Metabolite durch Extraktion mit Aceton gelöst. Der Rohextrakt wurde zunächst über eine offene Säule mit Kieselgel als stationäre Phase fraktioniert, bevor die Myxocheline mittels HPLC aufgereinigt wurden. Auf diesem Weg konnten, neben Myxochelin A, 14 neue Derivate aufgereinigt werden mit einem Ertrag von $\sim 0,1$ bis $> 5 \text{ mg L}^{-1}$ (Tab. 4). Derivate die nur in Kleinstmengen vorhanden waren, wurden bei der Aufreinigung nicht berücksichtigt. In Zusammenarbeit mit Dr. S. Schieferdecker wurden alle isolierten Myxocheline mittels NMR- und LC/MS-Analysen charakterisiert (Abb. A14-A55, Anhang). Die Aktivitäten der Myxocheline gegen die 5-LOX wurden in einem zellfreien Assay unter Verwendung rekombinanter 5-LOX durch S. König aus der Arbeitsgruppe von Prof. O. Wertz (Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) bestimmt. Nach Inkubation der 5-LOX mit dem entsprechenden Myxochelin-Derivat wurde die Umwandlung der Arachidonsäure zu 5-HPETE mittels HPLC ermittelt. Es stellte sich heraus, dass die Myxocheline J11 und J12 sogar bei Konzentration über $10 \mu\text{M}$ keine inhibitorischen Aktivitäten gegen die 5-LOX besitzen (Tab. 4). Interessanterweise sind dies gleichzeitig die einzigen Derivate, die keine aromatischen Hydroxylgruppen mehr besitzen; naheliegend, dass gerade diese funktionellen Gruppen eine entscheidende Rolle bei der Inhibierung spielen. Die anfängliche Annahme, dass die Brenzcatechin-Einheiten eine wesentliche Funktion bei der 5-LOX-Inhibierung übernehmen, mutmaßlich durch Komplexierung des katalytisch relevanten Eisenions, wurde durch die Beobachtung widerlegt, dass Derivate mit nur einer phenolischen Hydroxylgruppe die gleiche Hemmung der 5-LOX auslösen wie Myxochelin A. Einige Derivate mit nur einer aromatischen Hydroxylgruppe zeigten sogar eine höhere Aktivität als Myxochelin A. So weist Myxochelin A einen IC_{50} -Wert von $1,72 \mu\text{M}$ auf, während die Myxochelin-Derivate J3, J6 und J7 IC_{50} -Werte zwischen $1,18$ und $1,52 \mu\text{M}$ besitzen (Tab. 4).

Ergebnisse und Diskussion

4.1 Erweiterung der Myxochelin-Vielfalt

Tabelle 4: Struktur und Ausbeute der neuen Myxochelin-Derivate, ihre inhibitorischen Aktivitäten gegen die humane 5-LOX, sowie ihre eisenkomplexierenden Eigenschaften.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Ausbeute [mg L ⁻¹]	5-LOX IC ₅₀ [μM] ^a	CAS ^b
A	OH	OH	H	OH	OH	H	n. b.	1,715 ± 0,269	++
J1	H	H	H	OH	OH	H	0,1	3,147 ± 0,307	n. b.
J2	OH	OH	H	H	H	H	0,1	2,390 ± 0,819	n. b.
J3	OH	H	H	OH	OH	H	2,8	1,522 ± 0,156	+
J4	OH	OH	H	OH	H	H	2,2	3,539 ± 0,029	+
J5	OH	H	H	OH	H	H	3,4	9,324 ± 0,305	-
J6	F	H	OH	OH	OH	H	0,6	1,442 ± 0,063	-
J7	OH	OH	H	F	F	OH	1,0	1,180 ± 0,300	-
J8	F	H	OH	F	H	OH	4,9	3,600 ± 0,733	-
J9	F	H	H	OH	OH	H	1,9	8,395 ± 0,676	n. b.
J10	OH	OH	H	F	H	H	5,7	8,094 ± 0,793	n. b.
J11	F	H	H	F	H	H	6,0	> 10	n. b.
J12	H	F	H	H	F	H	1,0	> 10	n. b.
J13	Cl	H	H	OH	OH	H	3,0	4,596 ± 1,690	n. b.
J14	OH	OH	H	Cl	H	H	2,0	3,640 ± 0,440	n. b.

^aDie inhibitorischen Aktivitäten der Myxocheline gegen die 5-LOX wurden durch S. König aus der Arbeitsgruppe von Prof. O. Wertz (Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Pharmazie, FSU Jena) bestimmt. ^bDie Eisenaffinität der Myxocheline wurde visuell mittels CAS-Assay evaluiert (s. Abb. A56, Anhang). ++: starke / +: mäßige / -: keine Eisenaffinität. n. b.: nicht bestimmt. Die Tabelle wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

In den Myxochelinen J5 und J8 wurden die 2,3-DHBS-Einheiten durch Salicylsäure bzw. 6-Fluorsalicylsäure ausgetauscht. Während Myxochelin J5 ein relativ schwacher 5-LOX-Inhibitor ist, hemmt Myxochelin J8 die 5-LOX-Aktivität mit einem IC₅₀-Wert von 3,6 μM. An dieser Stelle ist ersichtlich, dass die Brenzcatechin-Einheiten von Myxochelin A nicht vollständig entbehrlich sind. Zusätzlich wurde die Eisenaffinität der Myxocheline mit dem CAS-Assay untersucht (Abb. A56, Anhang). Einige der neuen Derivate führten im Vergleich zu Myxochelin A nur zu einem schwachen Farbumschlag, was bedeutet, dass diese Derivate kaum dreiwertiges Eisen vom

Ergebnisse und Diskussion

4.1 Erweiterung der Myxochelin-Vielfalt

Farbkomplex lösen konnten. Besonders auffällig war, dass die Myxocheline J6 und J7, welche als sehr potente 5-LOX-Inhibitoren identifiziert worden waren, im CAS-Assay keine Eisenaffinität zeigten.

Insgesamt ließ sich, im Gegensatz zu der ursprünglichen Hypothese, kein direkter Zusammenhang zwischen den 5-LOX-Aktivitäten der Myxocheline und ihren eisenkomplexierenden Eigenschaften erkennen. Dafür konnte beobachtet werden, dass die inhibitorische Aktivität von der Anwesenheit einer freien Phenolgruppe, vor allem in *ortho*-Position abhängt. Zusätzliche aromatische Hydroxylgruppen in *meta*-Position können die Wirksamkeit gegenüber der 5-LOX noch zusätzlich erhöhen. In nachfolgenden Studien von Dr. S. Schieferdecker wurden weitere 48 Myxochelin A-Strukturanaloga auf ihre biologische Aktivität hin untersucht,²³¹ wobei die in der vorliegenden Doktorarbeit gemachten Beobachtungen bestätigt werden konnten. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Alkoholfunktion der Lysinol-Einheit von Myxochelin A keinen Einfluss bei der Inhibierung spielt.²³¹

4.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Pseudochelin A

4.2.1 Myxochelin- und Pseudochelin-Biosynthesecluster im Vergleich

Die Myxobakterien *S. aurantiaca* Sg a15 und *M. xanthus* DK1622 sind als Produzenten der Myxocheline A und B bekannt.^{163,193} Das Myxochelin-Cluster von *S. aurantiaca* Sg a15 wurde bereits ausführlich charakterisiert (s. Abb. 8, S. 24).¹⁶³ Die Gene *aroA_{A5}*, *mxuC*-*mxuG* und *mxuL* sind für die Biosynthese von 2,3-DHBS und die Assemblierung von Myxochelin A und B essentiell. Für den Siderophor-Transport und die Eisenaufnahme werden die Gene *mxuB*, *mxuH*, *mxuI* und *mxuK* benötigt.^{163,168,169} Die von *mxuA* kodierte Oxidoreduktase ist dagegen für die Myxochelin-Biosynthese nicht essentiell.¹⁶⁹ Unter Verwendung der Angaben bezüglich des Clusters aus *S. aurantiaca* Sg a15, konnte das entsprechende Myxochelin-Gencluster aus *M. xanthus* DK1622 identifiziert werden. Dieses umfasst insgesamt neun Gene, deren Produkte eine Übereinstimmung zwischen 64% bis 82% zu den von *S. aurantiaca* Sg a15 kodierten Proteinen aufweisen (Abb. 12).

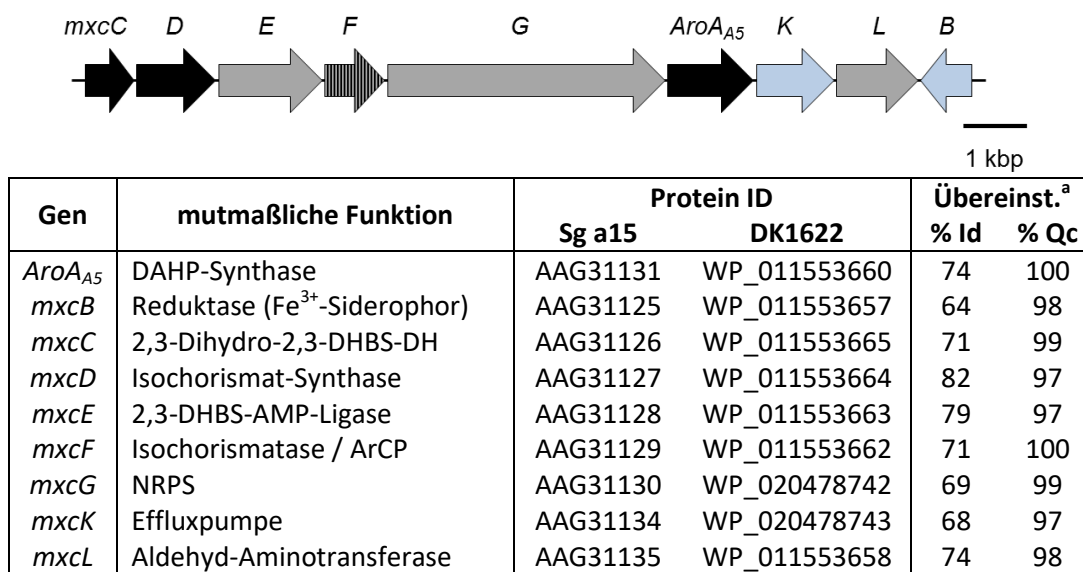


Abbildung 12: Myxochelin-Cluster aus *M. xanthus* DK1622. Der Farbcode der Gene entspricht jenem aus Abb. 8 (S. 24) und Abb. 13 (S. 55). Die Nukleotidsequenz des Clusters wurde GenBank entnommen (Zugangsnummern: NC_008095).⁸⁰

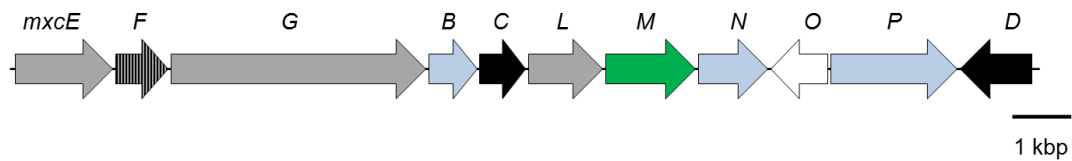
^aÜbereinstimmung (% Id: identische Aminosäuren in %; % Qc: Sequenzabdeckung in %).

Das marine Bakterium *P. piscicida* S2040 wurde kürzlich als Produzent von Pseudochelin A, dem einzigen Myxochelin-Derivat mit intramolekularem Imidazolin-Ring, beschrieben. Zusätzlich wurden, neben Pseudochelin A, auch die Myxocheline A und B aus der Kulturbrühe von *P. piscicida* isoliert.¹⁶⁵ Um mehr Informationen über die

Ergebnisse und Diskussion

4.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Pseudochelin A

Biosynthese von Pseudochelin A zu gewinnen, wurde das entsprechende Biosynthesegencluster von *P. piscicida* S2040 identifiziert (Abb. 13).



Gen	mutmaßliche Funktion	Sg a15 vs. S2040 ^a		DK1622 vs. S2040 ^a	
		%Id	%Qc	%Id	%Qc
<i>mxcE</i>	2,3-DHBS-AMP-Ligase	51	98	50	98
<i>mxcF</i>	Isochorismatase / ArCP	44	97	44	97
<i>mxcG</i>	NRPS	37	98	38	99
<i>mxkB</i>	Reduktase (Fe ³⁺ -Siderophor)	37	90	36	86
<i>mxnC</i>	2,3-Dihydro-2,3-DHBS-DH	50	96	50	95
<i>mxCL</i>	Aldehyd-Aminotransferase	58	93	62	93
<i>mxCM</i>	Cytosin-Deaminase	-	-	-	-
<i>mxCN</i>	MFS-Transporter	-	-	-	-
<i>mxCO</i>	Regulator (AraC-Typ)	-	-	-	-
<i>mxCP</i>	TonB-abhängiger Rezeptor	-	-	-	-
<i>mxCD</i>	Isochorismat-Synthase	36	93	36	92

Abbildung 13: Pseudochelin-Cluster aus *P. piscicida* S2040. Gene für die 2,3-DHBS-Biosynthese und Myxochelin-Assemblierung sind schwarz und grau hinterlegt. Gene für den Siderophor-Transport sind blau markiert und jene, mit regulatorischer Funktion weiß. Das Gen, welches mutmaßlich für die Bildung von Pseudochelin A relevant ist, wurde grün hervorgehoben. Die Nukleotidsequenz des Clusters wurde der GenBank Datenbank entnommen (Zugangsnummer: NZ_JXXW01000072).²³²

^aDie Übereinstimmungen zwischen den jeweiligen Proteinen auf Aminosäure-Level für *S. aurantiaca* Sg a15, *M. xanthus* DK1622 und *P. piscicida* S2040 sind angegeben. % Id: identische Aminosäuren in %; % Qc: Sequenzabdeckung in %. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2018 entnommen.²⁴⁴

In diesem Fall dienten die Aminosäuresequenzen der Genprodukte aus den *S. aurantiaca* Sg a15 und *M. xanthus* DK1622 Myxochelin-Clustern als Vorlage für ein Alignment. Das in *P. piscicida* S2040 detektierte Cluster erstreckt sich über eine 17 kbp große, durchgehende DNA-Sequenz, die insgesamt elf Gene beinhaltet (TW75_RS20420 bis TW75_RS20470). Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden im Folgenden die Bezeichnungen der Gene an die bereits bestehende Nomenklatur (*mxmA-mxL*)¹⁶³ angepasst. Sieben Gene im Pseudochelin-Cluster kodieren für Enzyme, die auch durch das Myxochelin-Cluster kodiert werden (Abb. 13). Dazu zählen neben den an der 2,3-DHBS-Biosynthese beteiligten Genen *mxnC*, *mxnD*, *mxnF* und den für die Assemblierung der Myxochelin A und B notwendigen Genen *mxnE*, *mxnF*, *mxnG*, *mxnL* auch das Gen *mxnB*, welches für eine NADPH-abhängige Reduktase kodiert und an der Freisetzung des dreiwertigen Eisens aus dem Siderophor-Eisen-Komplex beteiligt ist.

Ergebnisse und Diskussion

4.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Pseudochelin A

Vier Gene, *mxmM*, *mxmN*, *mxmO*, und *mxmP*, treten jedoch nur im Pseudochelin- und nicht in den Myxochelin-Clustern auf (Abb. 13). Die offenen Leserahmen von *mxmN* und *mxmP* sind voraussichtlich am Transport und an der Aufnahme des Siderophors beteiligt, während *mxmO* für einen Transkriptionsregulator aus der AraC-Familie kodiert. Deshalb scheint es, als könne lediglich das von *mxmM* kodierte Protein eine entscheidende Funktion in der Biosynthese von Pseudochelin A innehaben; MxmM wurde auf GenBank als Cytosin-Deaminase annotiert.²³²

4.2.2 MxmM als ein Enzym aus der Amidohydrolase-Superfamilie

Manuelle Sequenzanalysen des im Pseudochelin-Cluster kodierten Enzyms MxmM ergaben eine Zugehörigkeit zu der Amidohydrolase-Superfamilie.^{233,234} Ein Vertreter dieser Enzymfamilie ist die Imidazolonpropionase HutI, welche die Spaltung eines Imidazolin-Ringes während des Histidin-Abbaus katalysiert.²³⁵ Die Rückreaktion, eine intramolekulare Kondensation, erinnert an die postulierte Umwandlung von Myxochelin B in Pseudochelin A.¹⁶⁵ Die Sequenzen von HutI-homologen Proteinen wurden schließlich mit jener von MxmM abgeglichen, wobei primär keine signifikanten Übereinstimmungen zu erkennen waren (Tab. A1, Anhang). Jedoch ergab eine manuelle Analyse der Sequenzen, dass die konservierten, katalytisch aktiven Aminosäure-Reste von HutI²³⁶⁻²³⁸ auch in MxmM vorhanden sind (Abb. A57A, Anhang). Nur der Glutaminsäure-Rest an Position 252 von HutI, welcher an der Initiierung der Hydrolyse-Reaktion beteiligt ist,²³⁶⁻²³⁸ konnte in MxmM nicht gefunden werden.

Dem Enzym MxmM am ähnlichsten ist die Amidohydrolase CbxE aus dem Aktinomyzeten *Streptomyces* sp. NTK937 (Abb. A57B, Tab. A2, Anhang), einem essentiellen Enzym in der Biosynthese des Antibiotikums Caboxamycin.²³⁹ Die postulierte Funktion von CbxE ist die Katalyse einer Zwei-Stufen-Reaktion, bestehend aus einer intramolekularen Zyklisierung und einer Wasserabspaltung, die zur Ausbildung eines Oxazolin-Ringes führt (Abb. 14).²³⁹

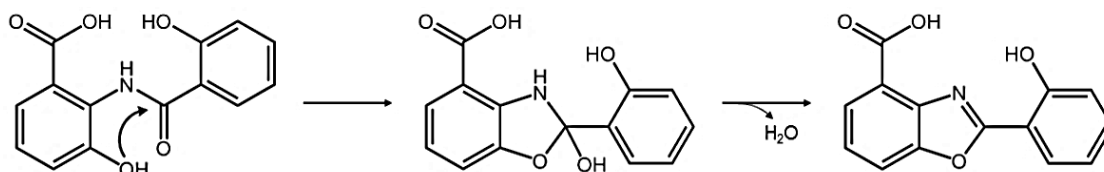


Abbildung 14: Die von CbxE katalysierte Bildung eines Oxazolin-Ringes während der Biosynthese von Caboxamycin.²³⁹

Ergebnisse und Diskussion

4.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Pseudochelin A

Neben den Sequenzähnlichkeiten von MxcM und CbxE besteht womöglich auch eine Analogie zwischen der von CbxE katalysierten Bildung eines Oxazolins und der von MxcM katalysierten Bildung eines Imidazolins. Ein weiteres Protein homolog zu MxcM konnte in *Streptomyces megasporus* NRRL B-16372 (Zugangsnummer: WP_031508998) gefunden werden (Abb. A57B, Tab. A2, Anhang). Der dazugehörige offene Leserahmen liegt eingebettet in einem Gencluster, das auffallende Ähnlichkeiten zu den Biosynthese-Loci der Antibiotika A33853^{240,241} und Nataxazol^{242,243} besitzt, welche in den Genomen von *Streptomyces* sp. NRRL 12068 bzw. *Streptomyces* sp. Tü 6176 gefunden wurden.

4.2.3 *In vitro*-Charakterisierung von MxcM

Um die Rolle von MxcM für die Pseudochelin A-Biosynthese zu verifizieren, wurde das entsprechende Gen in Codon-adaptierter Form durch ATG:biosynthetics synthetisiert, in den Expressionsvektor pET-28a(+) kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Das rekombinante Enzym His₆-MxcM wurde mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt und nachfolgend mit Myxochelin A und B als Substrate inkubiert (Abb. 15).

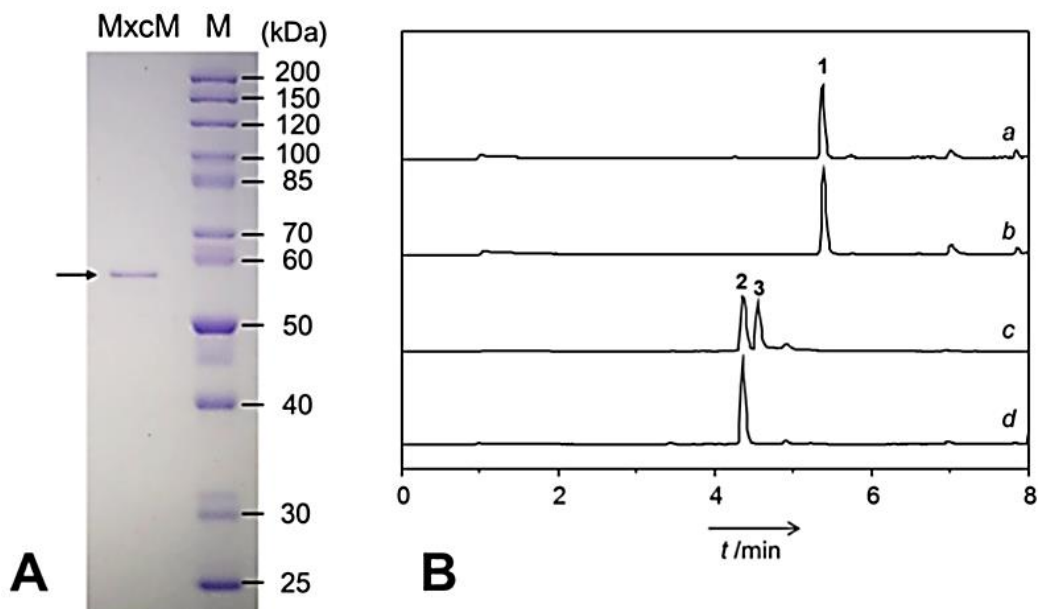


Abbildung 15: (A) His₆-MxcM, aufgetrennt mittels SDS-PAGE. Das errechnete Molekulargewicht des rekombinanten Proteins beträgt 58,786 kDa. Die Ausbeute lag bei ~0,7 mg aufgereinigtem His₆-MxcM aus 100 mL *E. coli*-Expressionskultur. M: Protein-Größenstandard. (B) Ergebnisse der *in vitro*-Testungen von His₆-MxcM. Dargestellt sind die Totalionenchromatogramme. **Profil a:** Myxochelin A (1) mit His₆-MxcM. **Profil b:** Myxochelin A ohne His₆-MxcM. **Profil c:** Myxochelin B (2) mit His₆-MxcM. **Profil d:** Myxochelin B ohne His₆-MxcM. Die Bildung von Pseudochelin A (3) konnte bei Inkubation von His₆-MxcM mit Myxochelin B beobachtet werden. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2018 entnommen.²⁴⁴

Ergebnisse und Diskussion

4.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Pseudochelin A

Diese Arbeiten entstanden in Zusammenarbeit mit B. Sc. L. Winand im Rahmen ihrer Masterarbeit. Myxochelin B wurde von Dipl.-Pharm. A. Sester zur Verfügung gestellt. Die Produktbildung in den Reaktionsansätzen wurde anschließend durch LC/MS-Messungen validiert. Nach Inkubation von rekombinantem MxcM mit Myxochelin B konnte ein neuer Peak detektiert werden, dessen hochauflösende Masse zu der exakten Masse von Pseudochelin A passte (Abb. 15B, Profil c). Wurde Myxochelin B ohne His₆-MxcM inkubiert, konnten keine neuen Peaks detektiert werden, wodurch eine spontane Umwandlung von Myxochelin B an dieser Stelle ausgeschlossen werden kann (Abb. 15B, Profil d). Zudem wurde getestet, ob Myxochelin A möglicherweise auch als Substrat von His₆-MxcM geeignet ist. Allerdings konnte keine Umwandlung beobachtet werden, sodass diese Annahme nicht bestätigt werden konnte (Abb. 15B, Profile a,b).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die Bildung von Pseudochelin A Myxochelin B als direkte Vorstufe dient und für die Konversion nur ein Enzym, MxcM, benötigt wird. Zudem war das rekombinante Enzym MxcM ohne Zugabe von Cofaktoren allein in Tris-Puffer aktiv. Nebenprodukte konnten bei der *in vitro*-Umsetzung von Myxochelin B zu Pseudochelin A nicht detektiert werden.

4.2.4 Konstruktion eines Plasmid-basierten Expressionssystems für *M. xanthus*

Um die Funktionalität von MxcM unter *in vivo*-Bedingungen zu testen, wurde das Codon-adaptierte *mxcM*-Gen in *M. xanthus* DSM16526, einem nativen Produzenten von Myxochelin A und B,^{192,193} exprimiert. Dafür wurden im Vorfeld zwei replikative Expressionsvektoren, pJK3 und pJK5 (Abb. 16A,C), erstellt. Die Rückgrat-Sequenz beider Vektoren stammte dabei von Plasmid pZJY156, welches in vorherigen Studien eine stabile Replikation in *M. xanthus* und *E. coli* aufwies.^{194,214} Im Vektor pJK3 wurde die Expression des Gens *mxcM* unter Kontrolle des Kupfer-induzierbaren Promotors P_{cuoA} gestellt,^{222,223} wohingegen Vektor pJK5 den konstitutiven Promotor P_{pilA} trägt.²²⁴ Die finalen Expressionsvektoren wurden mittels Elektroporation in *M. xanthus* DSM16526 eingebracht und positive Transformanten durch ihre neu erworbene Kanamycin-Resistenz selektiert. Nach einigen Subkultivierungen wurden die Transformanten unter Verwendung der Kolonie-PCR auf das Vorhandensein von freien, nicht-chromosomal-integrierten Expressionsplasmiden hin untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

4.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Pseudochelin A

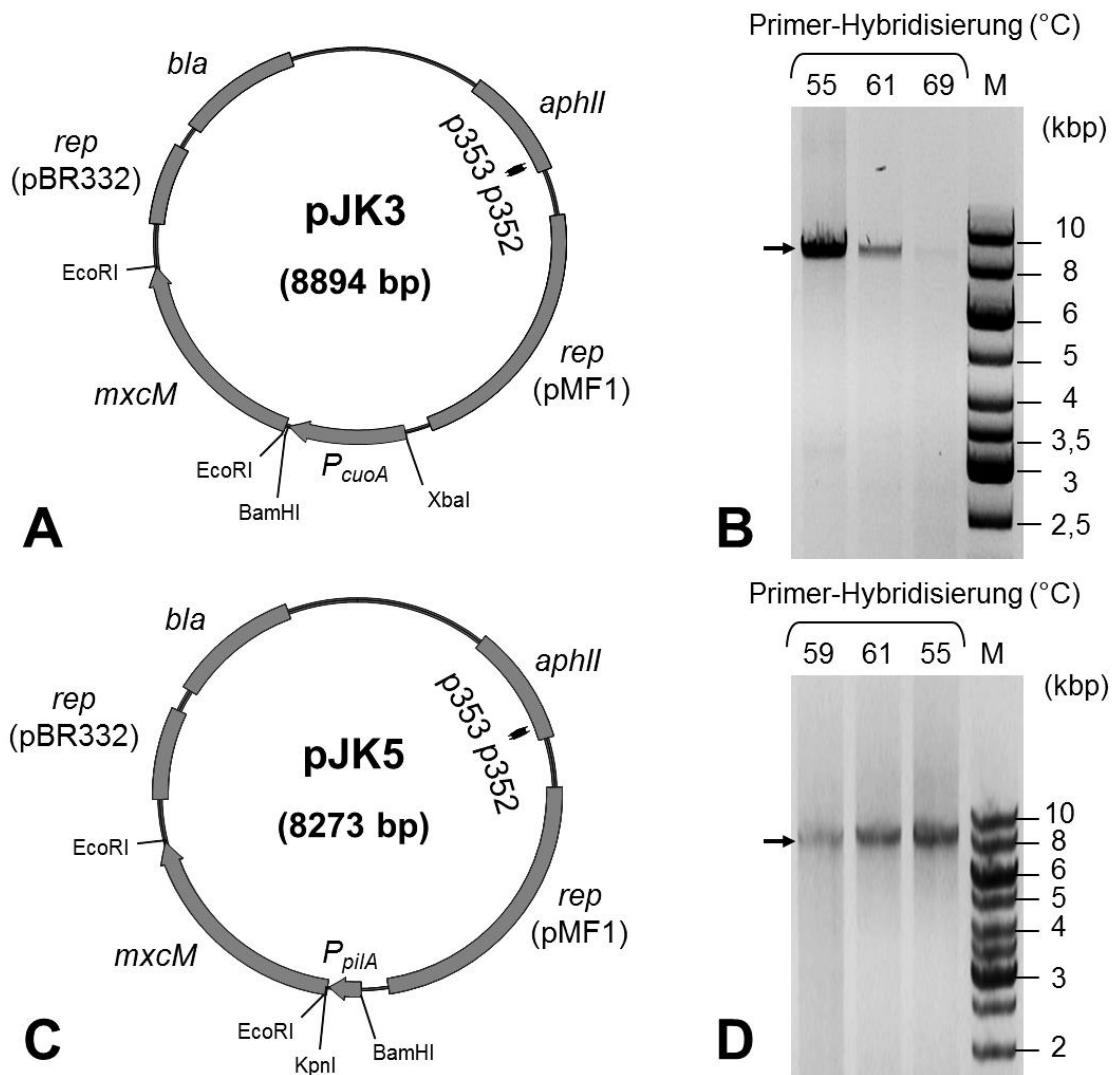


Abbildung 16: Vektorkarten der Expressionsvektoren pJK3 und pJK5 (A), (C). Die Hybridisierungsstellen der Primer p352 und p353 sind als schwarze Pfeile angedeutet. Die Kanamycin-Resistenz wird durch das Gen *aphII* vermittelt, welches für eine Aminoglykosid-3'-O-Phosphotransferase kodiert.²⁴⁵ Das β -Lactamase-Gen *bla* ist für die Ampicillin-Resistenz verantwortlich.²⁴⁶ Der pBR322-basierte Replikon dient der Replikation des Vektors in *E. coli*, und der pMF1-basierte Replikon der stabilen Vervielfältigung in *M. xanthus*.^{194,214} Ergebnis der Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer p352/p353 und Biomasse von *M. xanthus*-pJK3- (B) und *M. xanthus*-pJK5-Transformanten (D) als Template. Für die Hybridisierung der Primer wurden verschiedene Temperaturen zwischen 55 °C und 69 °C verwendet. Die erwarteten PCR-Produktgrößen entsprachen den Größen der Expressionsvektoren (pJK3, pJK5) und wurden mit einem Pfeil markiert. M: Größenstandard GeneRuler 1 kbp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2018 entnommen.²⁴⁴

Die eingesetzten Primer p352 und p353 hybridisierten direkt nebeneinander innerhalb des Kanamycin-Resistenzgens *aphII* (Abb. 16A,C), wodurch der komplette Expressionsvektor amplifiziert werden konnte. Die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese zeigte die erwarteten Fragmente mit einer Größe von 8,9 kbp für pJK3 (Abb. 16B) und 8,3 kbp für pJK5 (Abb. 16D). Im Falle einer

Ergebnisse und Diskussion

4.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Pseudochelin A

Vektor-Linearisierung innerhalb der *M. xanthus*-Zelle, z.B. durch die Integration von Vektorsequenzen in das Wirts-Genom, hätte keine Amplifikation stattfinden können. Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde das 8,9 kbp große PCR-Produkt von pJK3 als Template für weitere PCR-Reaktionen eingesetzt und die entsprechenden Amplifikate sequenziert (Tab. A3, Anhang).

4.2.5 Heterologe Expression des *mxcM*-Gens in *M. xanthus* DSM16526

In Vektor pJK3 wurde die Expression von *mxcM* durch den Kupfer-induzierbaren Promotor P_{cuoA} reguliert. Als Induktor diente dabei eine Kupfer(II)sulfat (CuSO_4)-Lösung (Endkonzentration: 115 μM). Im Vorfeld wurde jedoch zunächst geprüft, ob diese erhöhte Kupfer-Konzentration im Medium einen Effekt auf die Myxochelin-Biosynthese im *M. xanthus* DSM16526-Wildtypstamm ausüben könnte. Daher wurden die LC/MS-Profile einer nativen und einer CuSO_4 -supplementierten Kultur miteinander verglichen, wobei keine Veränderungen in der Produktion von Myxochelin A und B detektiert werden konnten (Abb. A58, Anhang).

Die Kultivierung der *M. xanthus*-Expressionsstämme erfolgte schließlich in CTPM-Medium unter Zugabe von XAD7HP, um die Myxochelin- bzw. Pseudochelin-Ausbeute zu steigern. Zudem wurde das Medium mit 2,3-DHBS supplementiert, da die zelluläre Verfügbarkeit dieses aromatischen Bausteins im Vorfeld als kritischer Produktionsengpass während der Myxochelin-Biosynthese identifiziert worden war (s. Kapitel 4.1.1, S. 49 ff). Direkt zum Zeitpunkt des Animpfens wurde die *mxcM*-Expression in dem pJK3-tragenden Stamm durch Zugabe von 115 μM induziert. Da sich auf dem Vektor pJK5 der konstitutive Promotor P_{pilA} befindet,²²⁴ war hierbei keine manuelle Induktion nötig. Nach 5 Tagen Kultivierung wurde das Adsorberharz von der Kulturbrühe getrennt, mit Methanol extrahiert und die metabolischen Profile der Expressionsstämme mit dem des Wildtyps verglichen (Abb. 17).

Der *M. xanthus* DSM16526-Wildtyp- und der pJK5-Expressionsstamm produzierten verhältnismäßig mehr Myxochelin B als Myxochelin A (Abb. 17A,D). Diese Beobachtung ist auch in der Literatur beschrieben.^{163,169,170} Im pJK3-Expressionsstamm konnte dagegen nicht festgestellt werden, dass mehr Myxochelin B als Myxochelin A produziert wurde (Abb. 17C,D). Generell war die Myxochelin-Ausbeute im pJK3-Stamm deutlich reduziert. Es scheint, als beeinflusse der pJK3-Vektor die Myxochelin-Biosynthese negativ.

Ergebnisse und Diskussion

4.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Pseudochelin A

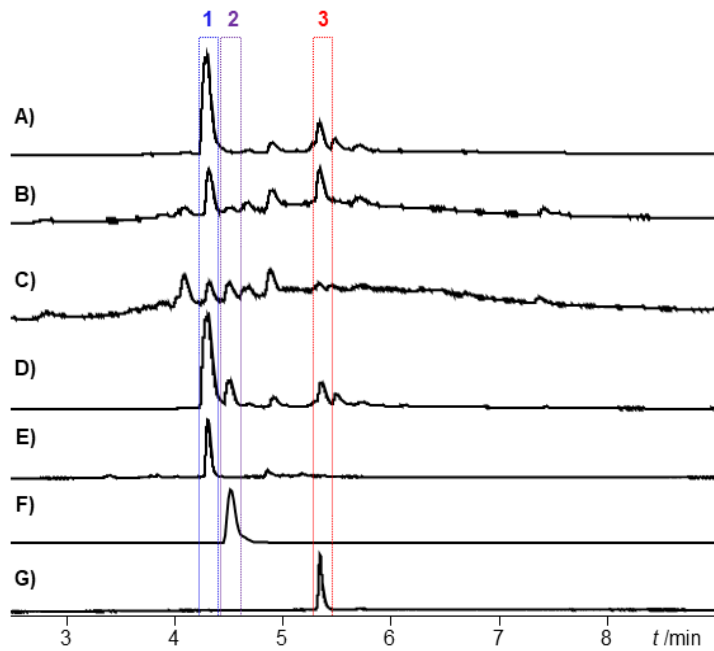


Abbildung 17: Chromatogramme vom *M. xanthus* DSM16526-Wildtypstamm (A), vom pJK3-tragenden Expressionsstamm ohne (B) und mit Kupfer-Induktion (C), sowie vom pJK5-tragenden Expressionsstamm (D). Als Referenz dienen Standardproben von Myxochelin B (1, E), Pseudochelin A (2, F) und Myxochelin A (3, G). Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm aufgenommen.

Wie erwartet konnte im *M. xanthus* DSM16526-Wildtyp kein Pseudochelin-Peak detektiert werden (Abb. 17A), jedoch tauchte in den Chromatogrammen der beiden Expressionsstämme ein entsprechender Peak auf (Abb. 17C,D), welcher in seiner Retentionszeit mit dem Pseudochelin-Peak der Referenzprobe übereinstimmt (Abb. 17F). Die pJK3-basierte Expression von *mxcM* scheint in geringem Maße auch ohne Induktion mit Kupfer(II)sulfat zu einer Bildung von Pseudochelin A zu führen (Abb. 17B). Möglicherweise liegt dies daran, dass das Wachstumsmedium vor der Kultivierung nicht explizit von Kupfer-Ionen befreit worden war, und somit eine minimale Basalexpression von *mxcM* vorgelegen hat. Im Gegensatz zum pJK3-Vektor scheint der Expressionsvektor pJK5 die Myxochelin-Biosynthese nicht negativ zu beeinflussen (Abb. 17A,D). Im Chromatogramm des pJK5-tragenden Expressionsvektors ist neben Myxochelin A und B deutlich ein weiterer, neuer Peak zu erkennen, der durch Vergleiche mit der Referenzprobe als Pseudochelin A identifiziert werden konnte und dessen Intensität mit jener von Myxochelin A vergleichbar ist (Abb. 17D).

Um eine eindeutige Aussage über die pJK3-vermittelte heterologe Produktion von Pseudochelin A treffen zu können, wurde das Extrakt des Expressionsstamms mit dem

Ergebnisse und Diskussion

4.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Pseudochelin A

des Wildtyps zusätzlich mittels LC/MS/MS-Messungen verglichen. Dabei konnte eindeutig Pseudochelin A nachgewiesen werden (Abb. 18).

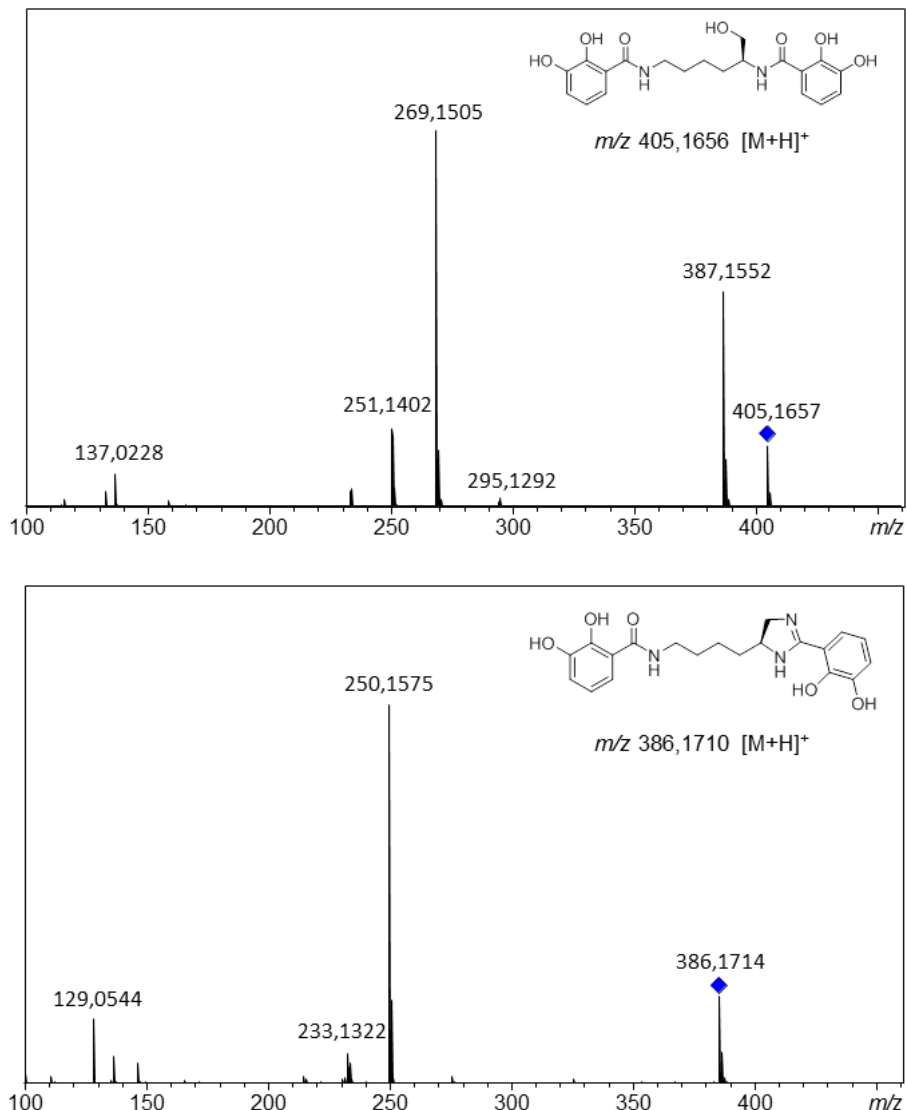


Abbildung 18: Fragmentierungsmuster von Myxochelin A (oben) und Pseudochelin A (unten) in der Tandem-MS. Eltern-Ionen wurden mit blauem Viereck gekennzeichnet. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2018 entnommen.²⁴⁴

Die MS/MS-Spektren von Pseudochelin A und einem Myxochelin A Standard weisen beide ein $\Delta 136$ -Fragment (Myxochelin A: m/z 405 \rightarrow 269; Pseudochelin A: m/z 386 \rightarrow 250) auf, welches durch die Abspaltung einer 2,3-Dihydroxybenzaldehyd-Einheit entstanden ist. Zusätzlich konnte der Wegfall einer 2,3-Dihydroxybenzamid-Einheit wahrgenommen werden (Pseudochelin A: m/z 386 \rightarrow 233). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit vorangegangenen Berichten.^{165,192} In dem MS/MS-Spektrum von Myxochelin A ist zudem ein markantes $\Delta 18$ -Fragment zu sehen, welches auf die Elimination der primären Alkoholfunktion in der Lysinol-Einheit zurückzuführen ist.

Ergebnisse und Diskussion

4.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Pseudochelin A

Diese strukturelle Einheit ist in Pseudochelin A nicht vorhanden. Die Identität von Pseudochelin A wurde zusätzlich von Dipl.-Pharm. A. Sester mittels NMR-Analysen bestätigt.²⁴⁴

Eine *in vivo*-Funktionalität von MxcM in dem Myxobakterium *M. xanthus* DSM16526 konnte durch die heterologe Produktion von Pseudochelin A eindeutig nachgewiesen werden. Zudem konnte ein stabiles Expressionssystem auf Basis des Plasmids pJK5 etabliert werden. Der P_{cuoA} -tragende Expressionsvektor pJK3 erwies sich dagegen für die heterologe Expression von Siderophoren als ungeeignet. An dieser Stelle ist es jedoch unklar, inwiefern die verwendete Promotorsequenz einen Einfluss auf die Myxochelin-Produktion ausübt. Es ist bekannt, dass einige Siderophore neben Eisen- auch Kupfer-Ionen komplexieren können,^{247,248} und somit bestand anfänglich die Frage, ob die niedrige Myxochelin- und Pseudochelin-Produktion in dem pJK3-Expressionsstamm durch die erhöhte Kupfer-Konzentration im Medium ausgelöst wurde. Die Siderophor-Produktion wird durch Transkriptionsregulatoren der FUR-Familie gesteuert, deren DNA-Bindungsaktivität vorrangig durch das intrazelluläre Level an zweiwertigen Metallionen kontrolliert wird.¹⁴⁰⁻¹⁴⁴ Neben den Fe^{2+} -gesteuerten FUR-Proteinen existieren auch Cu^{2+} -abhängige FUR-Proteine, wie z.B. BosR aus dem pathogenen Bakterium *Borrelia burgdorferi*.²⁴⁹ Doch ein Zusammenhang zwischen der Zugabe von Kupfer(II)sulfat und der Myxochelin-Biosynthese konnte im Vorfeld durch Kontroll-Experimente unter Verwendung des Wildtyps ausgeschlossen werden (Abb. A58, Anhang). Zudem trat die verminderte Myxochelin-Produktion auch in dem nicht-induzierten pJK3-Stamm auf (Abb. 17B).

Da Myxocheline als Siderophore vom Produzenten sekretiert werden, kann es an dieser Stelle lediglich möglich sein, dass die P_{cuoA} -gesteuerte Expression von *mxmM* zu spät beginnt. In diesem Fall wäre dann der Großteil der biosynthetisierten Myxochelin B-Moleküle bereits aus der Zelle ausgeschleust und die enzymatische Umsetzung zu Pseudochelin A kann durch einen Mangel an Substrat innerhalb der Zelle nicht stattfinden. Die Kupferabhängigkeit und Funktionalität des P_{cuoA} -Promotors in *M. xanthus* wurden zwar bereits verifiziert, dabei gab es jedoch Hinweise, dass der Promotor erst 24 bis 48 Stunden nach Induktion sein Aktivitätsmaximum erreicht.^{222,223}

4.3 Unterbrechung der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

4.3.1 Konstruktion eines Disruptionsvektors für das Gen *mxCG*

Eine Plasmid-DNA-Sequenz sollte in das chromosomale *mxCG*-Gen von *M. xanthus* DSM16526 eingebracht werden, um damit die Funktionalität der NRPS MxcG zu zerstören und die Biosynthese der Myxocheline zu unterbrechen. Um dies zu realisieren, musste im Vorfeld ein Vektor identifiziert werden, der in *M. xanthus* DSM16526 weder selbstständig repliziert, noch in das Wirtsgenom integriert wird. In einem initialen Screening wurden deshalb elektrokompente Zellen mit verschiedenen Plasmiden transformiert.^{58,68} Die anschließende Selektion basierte auf der neu erworbenen Kanamycin-Resistenz der Transformanten.

Eine Transformation von *M. xanthus* DSM16526 mit den Plasmiden pET-28a(+), pMycoMar und pZJY156_JK führte zu resistenten Kolonien auf kanamycinhaltigem CTPM-Agar. Plasmid pZJY156_JK besitzt einen für *M. xanthus* kompatiblen Replikationsursprung und kann deshalb autonom in der Wirtszelle replizieren.^{194,214} Der Mutagenese-Vektor pMycoMar kodiert für ein Minitransposon, welches in das Wirtsgenom integrieren kann.²¹⁵ Vektor pET-28a(+) wird normalerweise für Expressionsversuche in *E. coli*-Wirtszellen eingesetzt und es existieren keine Berichte über eine Replikation dieses Plasmids in Myxobakterien. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Kanamycin-resistenten *M. xanthus* DSM16526-Transformanten entweder eine Teil- oder die komplette DNA-Sequenz des pET-28a(+)-Plasmids, einschließlich dem Kanamycin-Resistenzgen, in ihr Genom integriert haben. Allein die Elektroporation mit Vektor pBHR1 erzeugte keine Kanamycin-resistenten Transformanten, sodass dieses Plasmid als Grundgerüst für die Erstellung eines Disruptionsvektors verwendet wurde. Für die Konstruktion des Disruptionsvektors wurde zunächst ein ca. 1,9 kbp großes DNA-Fragment aus dem *M. xanthus mxCG*-Gen amplifiziert und über mehrere Zwischenschritte final in das Plasmid pBHR1 ligiert, wodurch Vektor pJK7 entstand (Abb. 19).

Ergebnisse und Diskussion

4.3 Unterbrechung der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

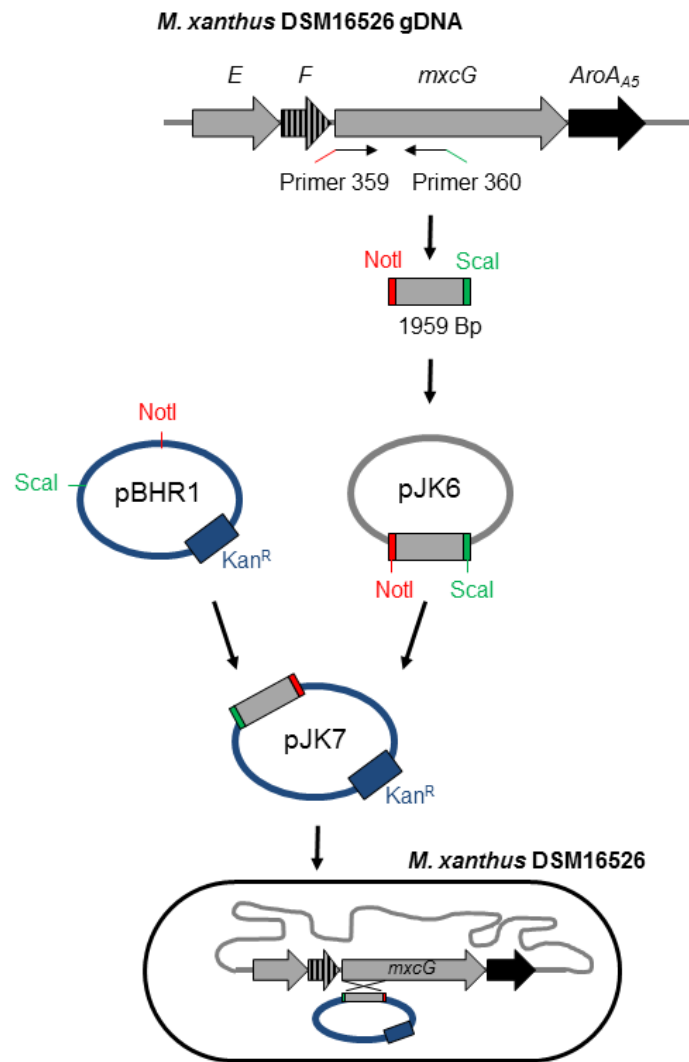


Abbildung 19: Der *mxcG*-Disruptionsvektor pJK7 enthält neben einer aus pBHR1-stammenden Rückgrat-Sequenz incl. Kanamycin-Resistenzgen (Kan^R) eine 1,9 kbp große Sequenz des *M. xanthus mxcG*-Gens. Nach Transformation von *M. xanthus* mit pJK7 wurde die Plasmid-Sequenz in das genomische *mxcG*-Gen durch homologe Rekombination integriert, angetrieben durch den Selektionsdruck auf kanamycinhaltigem CTPM-Agar.

4.3.2 Generierung von Myxochelin-defizienten Mutanten

Der *M. xanthus* DSM16526-Wildtypstamm wurde mit dem *mxcG*-Disruptionsvektor pJK7 transformiert und anschließend auf kanamycinhaltigem Agar inkubiert. Resistente Kolonien wurden mehrmals subkultiviert und schließlich auf die Integration des Plasmids in das chromosomale *mxcG*-Gen hin untersucht. Zwei verschiedene Möglichkeiten der homologen Integration waren an dieser Stelle denkbar, die mittels Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer p334, p336 und p338 verifiziert wurden. Primer p336 hybridisierte innerhalb der pBHR1-abstammenden Sequenz, p334 in der homologen und p338 in der nativen *mxcG*-Sequenz (Abb. 20).

Ergebnisse und Diskussion

4.3 Unterbrechung der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

Drei zufällig ausgewählte Transformanten wurden per Kolonie-PCR auf die Integration des pJK7-Plasmids in ihr Chromosom überprüft. Als Kontrolle diente Biomasse des *M. xanthus* DSM16526-Wildtypstamms. Die PCR-Amplifikate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit den errechneten Fragmentgrößen verglichen (Abb. 21). Bei Verwendung der Primer p334 und p338 konnte ein circa 0,9 kbp großes Amplikon detektiert werden, welches zu der erwarteten Größe bei einer Insertion in das *mxgG*-Gen gemäß Variante II passte (Abb. 20B). Im Einklang mit diesem Ergebnis wurde ebenfalls ein Fragment mit derselben Größe im *M. xanthus*-Wildtyp detektiert (Abb. 21). Bei Verwendung der Primer p336 und p338 konnte ein circa 3,6 kbp großes Fragment bei den Transformanten amplifiziert werden. Diese Größe stimmt ebenfalls mit dem errechneten PCR-Produkt bei einer Insertion gemäß Variante II überein. Weil der Primer p336 innerhalb der pBHR1-abstammenden Sequenz hybridisiert, konnte dieser im Wildtyp nicht binden, wodurch kein PCR-Produkt gebildet wurde (Abb. 21).

Durch die Integration des pJK7-Disruptionsvektors hat sich der offene Leserahmen innerhalb des *mxgG*-Gens in der Mutante verschoben und verkleinert (Abb. A59, Anhang). Das native Enzym MxgG besteht aus einer N-terminalen C-Domäne, gefolgt von einer A-, PCP- und Red-Domäne.^{163,168-170} Durch die Insertion des Plasmids in die chromosomale *mxgG*-Sequenz wurde der Leserahmen dahingehend verändert, dass die C-Domäne in der Mutante nicht mehr vollständig ist (Tab. A4, Anhang). Die native und verkürzte MxgG-Sequenzen wurden anschließend manuell auf das Vorhandensein von Domänen-spezifischen Core-Regionen hin untersucht, welche neben einer hohen Konservierung auch für die Katalyse wichtige Aminosäuren enthalten.²⁵⁰ Unter Verwendung der MxgG-Sequenz aus *S. aurantiaca* Sg a15 als Referenz¹⁶³ konnten in der nativen C-Domäne der *M. xanthus* DSM16526-MxgG-Sequenz sechs Core-Regionen identifiziert werden (Abb. A60, Anhang). Die Mutante dagegen besitzt durch die Verkürzung der MxgG-Aminosäuresequenz die Core-Regionen 1 und 2 nicht mehr. Für die Ausbildung der Amidbindung ist insbesondere die dritte Core-Region essentiell,²⁵⁰ welche in der Mutante noch intakt war. An dieser Stelle ist jedoch zu bedenken, dass sich durch das Einbringen des pJK7-Disruptionsvektors der komplette Aufbau des *mxgG*-Gens verändert hat. Somit ist es fraglich, ob der verkürzte Leserahmen in der Mutante während der Translation und Transkription überhaupt zugänglich ist, in Anbetracht dessen, dass sich die Bindestellen für die DNA-abhängige RNA-Polymerase sowie Ribosomen verschoben haben.

Ergebnisse und Diskussion

4.3 Unterbrechung der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

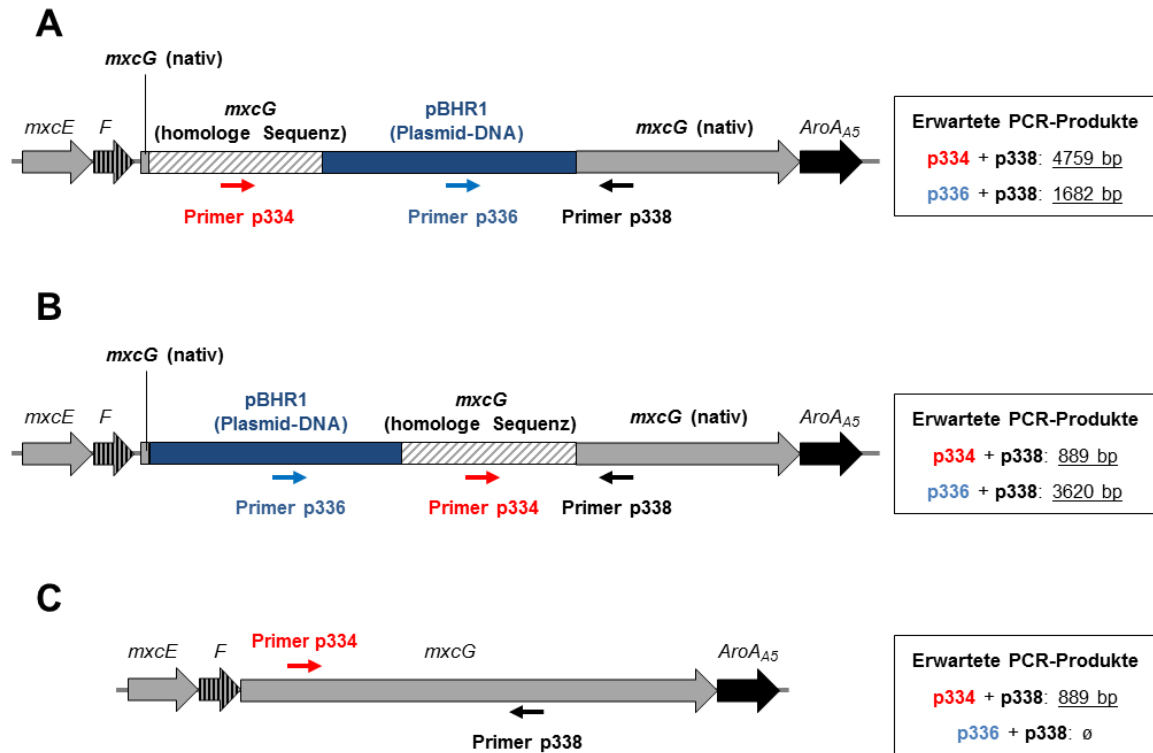


Abbildung 20: (A), (B) Mögliche Insertionen von pJK7 in das chromosomale *mxcG*-Gen. (C) Das intakte *mxcG*-Gen im Wildtyp. Die Hybridisierungsstellen der verwendeten Primer sowie die errechneten PCR-Produktgrößen sind für alle drei Varianten dargestellt.

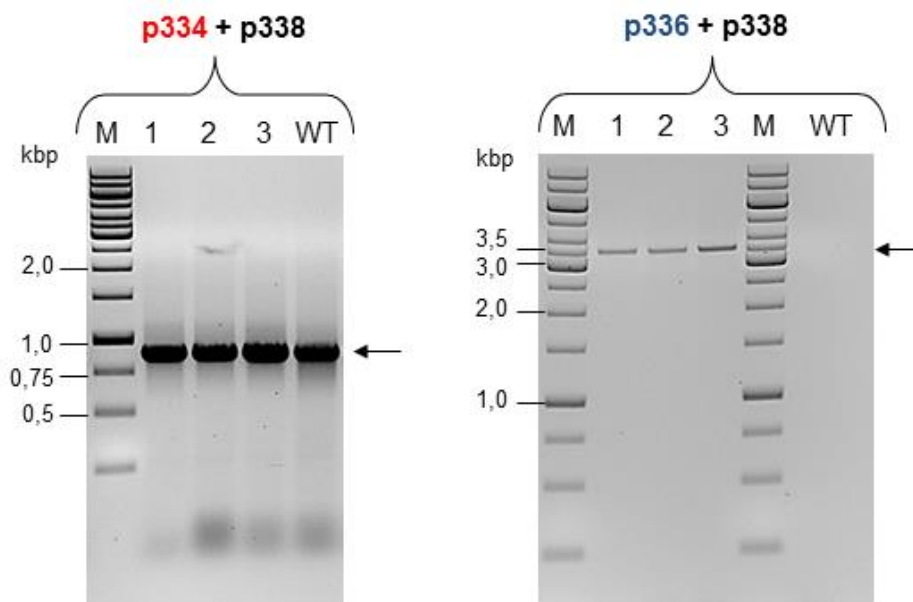


Abbildung 21: Ergebnis der Kolonie-PCR mit den Primern p334/p338 (links), bzw. p336/p338 (rechts), und Biomasse von drei Kanamycin-resistenten *M. xanthus*-Transformanten nach dem Einbringen des Disruptionsvektors pJK7 (1 – 3). Als Kontrolle diente der Wildtyp-Stamm (WT). Die errechneten Produktgrößen für eine Insertion des Plasmids gemäß Variante II (s. Abb. 20B) wurden mit einem Pfeil gekennzeichnet. M: Größenstandard GeneRuler 1 kbp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Ergebnisse und Diskussion

4.3 Unterbrechung der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

Um die Auswirkungen der pJK7-Integration auf die Myxochelin-Produktion zu verifizieren, wurde das metabolische Profil der *M. xanthus* *mxCG*-Disruptionsmutante Nr. 1 (entspricht der Transformante Nr. 1 in Abb. 21) untersucht. Die Kultivierung erfolgte in CTPM-Medium unter Zugabe von Kanamycin auf einem Schüttelinkubator. Nach 5 Tagen wurde die Kulturbrühe mit Ethylacetat extrahiert und die produzierten Metabolite chromatographisch aufgetrennt. Als Vergleich diente das metabolische Profil des *M. xanthus* DSM16526-Wildtyps, welches ebenfalls durch Extraktion der Kulturbrühe mit Ethylacetat gewonnen wurde (Abb. 22).

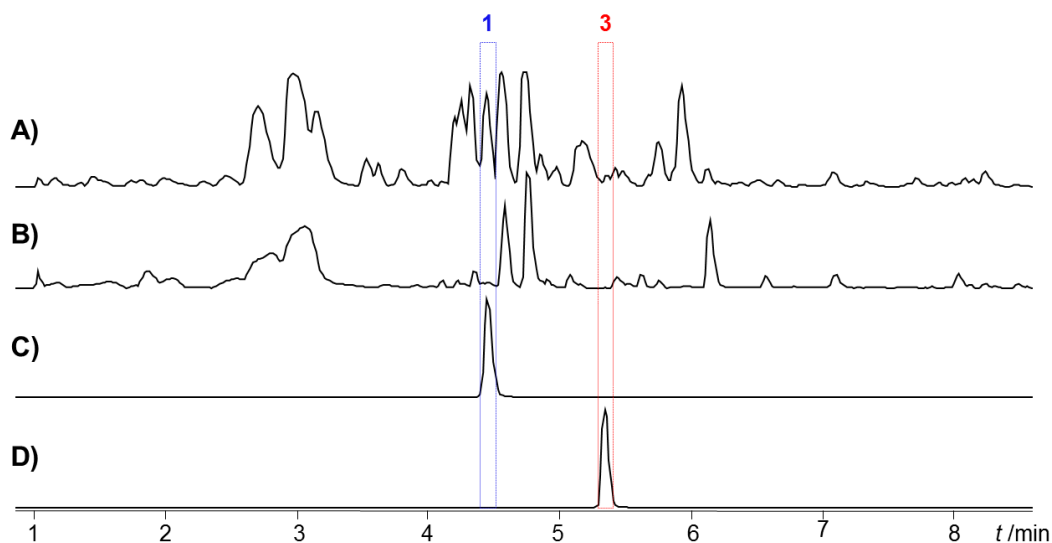


Abbildung 22: Totalionenchromatogramme vom *M. xanthus* DSM16526-Wildtypstamm (**A**) und von der *M. xanthus* DSM16526-*mxCG*-Disruptionsmutante (**B**). Als Referenz dienten Standardproben von Myxochelin B (**1, C**) und Myxochelin A (**3, D**).

Es ist zu erkennen, dass Myxochelin B bei einer Retentionszeit von 4,4 Minuten und Myxochelin A nach 5,4 Minuten von der Säule eluierte, was mit Literaturangaben zum Laufverhalten dieser beiden Siderophore übereinstimmt.^{163,169,170} Im Chromatogramm des *M. xanthus*-Wildtyps konnte sowohl ein Peak für Myxochelin B, wie auch einer für Myxochelin A detektiert werden. Wie in Kapitel 4.2.5 (S. 60 ff.) bereits erwähnt, besitzt auch hier der Myxochelin B-Peak eine deutlich höhere Intensität als jener von Myxochelin A, was sich an dieser Stelle ebenfalls mit den Informationen aus der Literatur deckt.^{163,169,170} Das Chromatogramm der *mxCG*-Disruptionsmutante enthielt dagegen keine Peaks bei den Myxochelin-typischen Retentionszeiten.

Zusätzlich wurden die Massen der Eluenten bei 4,3-4,4 min, sowie bei 5,3- 5,4 min Retentionszeit im Chromatogramm des *M. xanthus* DSM16526-Wildtyps und der *mxCG*-Disruptionsmutante analysiert (Abb. A61, Anhang). Die Massen für

Ergebnisse und Diskussion

4.3 Unterbrechung der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

Myxochelin A und B konnten dabei im Wildtyp detektiert werden, wohingegen diese in der Mutante nicht mehr auftraten. Anschließend wurden die Massen aller Metabolite, die in den ersten 8 Minuten eluierten, in dem für Myxochelin A und B relevanten Bereich von m/z 400 bis 410 untersucht (Abb. A62, Anhang). Zwar tauchte in der *mxcG*-Disruptionsmutante eine Masse ähnlich der für Myxochelin B auf (m/z 404,2017 [M+H]⁺), jedoch mit sehr geringer Intensität. Zudem wich bereits die erste Nachkommastelle vom theoretischen Wert (m/z 404,1816 [M+H]⁺) ab - im Gegensatz zu der im Wildtyp detektierten Myxochelin B-Masse (m/z 404,1825 [M+H]⁺). Hierbei liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine andere Verbindung handelt, die innerhalb der ersten 8 Minuten im Chromatogramm der Mutante auftaucht und eine dem Myxochelin B ähnliche Masse besitzt.

4.3.3 Einfluss der Myxochelin-Biosynthese auf den Phänotyp von *M. xanthus*

Auf festem Untergrund bilden Myxobakterien dynamische Zellverbände (sog. Schwärme), die abhängig von den gegenwärtigen Umweltbedingungen ausschwärmen, im Kollektiv jagen oder bei Nahrungsmangel Fruchtkörper mit widerstandsfähigen Myxosporen ausbilden. Um diese komplexen Vorgänge koordinieren zu können, stehen die Zellen innerhalb des Verbundes im ständigen Austausch miteinander.^{41,42,251-253} Analog zum Biofilm sind die Zellen im Schwarm von einer extrazellulären Matrix umgeben, die aus Polysacchariden, Proteinen und Nukleinsäuren besteht.²⁵⁴⁻²⁵⁶ Der Schwarm von *M. xanthus* besitzt eine für Myxobakterien typische radiale Symmetrie mit einer nach außen abnehmenden Zelldichte. Im Zentrum des Schwarms befindet sich eine Erhöhung, die zum Rand hin ausläuft und abflacht (Abb. 23A,E). Der Rand selber erscheint unregelmäßig, gar ausgefranst (Abb. 23B).²⁵⁷ Im Gegensatz zum Schwarm besitzt eine Kolonie einen klar abgrenzbaren Rand und eine einheitliche Höhe (Abb. 23D).²⁵⁷ Vergleicht man den Durchmesser eines Schwarmes mit dem Durchmesser einer Kolonie von einer nicht motilen *M. xanthus*-Mutante, die sich beide in derselben Wachstumsphase befinden (Abb. 23A,D), wird ersichtlich, dass die Ausdehnung eines Schwarmes primär durch die Bewegung der Zellen entsteht, wohingegen die Ausdehnung der Kolonie auf der Zunahme der Gesamtzellzahl durch Zellteilung beruht.²⁵⁷

Ergebnisse und Diskussion

4.3 Unterbrechung der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

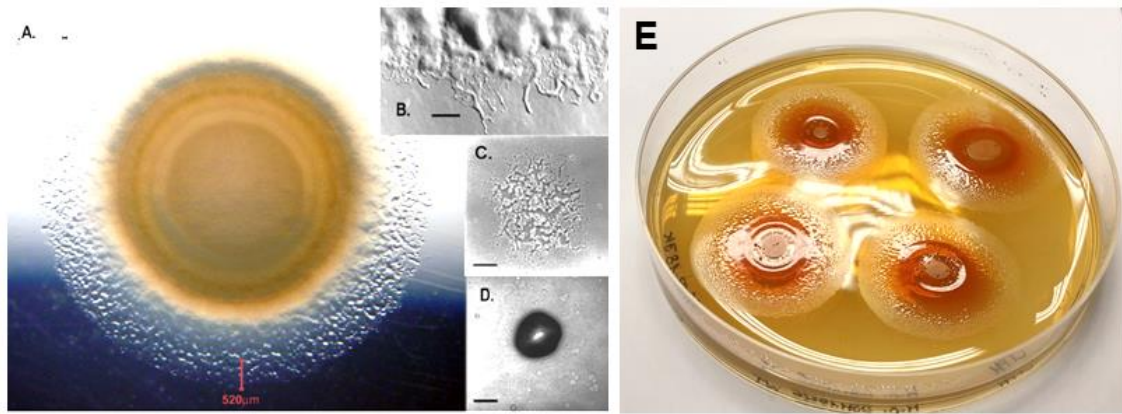


Abbildung 23: (A) Multizellulärer Schwarm von *M. xanthus* DZ2 auf Agar nach 7 Tagen Inkubation bei 20°C. Maßstabsbalken, 21 mm. (B) Der Randbereich des Schwarmes in Vergrößerung. Maßstabsbalken, 500 µm. (C) Ein junger Schwarm von *M. xanthus* DK101. Maßstabsbalken, 100 µm. (D) Eine nicht motile (A⁻S⁻)-Kolonie von *M. xanthus* DK1622 auf Agar. Maßstabsbalken, 100 µm. Die Abbildungen A – D wurden dem Artikel von Kaiser und Warrick, 2011, entnommen.²⁵⁷ (E) Schwärme von *M. xanthus* DSM16526 auf CTPM-Agar nach 21 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur.

Im Gegensatz zum Wildtyp zeigte der Schwarm der *M. xanthus-mxcG*-Disruptionsmutante eine veränderte Morphologie (Abb. 24A-C). Der radiale Aufbau war zwar noch erkennbar, jedoch traten in der Mutante zusätzliche, spiralförmige Muster im Randbereich des Schwarmes auf. Im Zentrum befand sich eine Vielzahl von Fruchtkörpern, die farblos bzw. unpigmentiert erschienen (Abb. 24B). Analog zum Wildtyp besaß der Schwarm der Mutante ebenfalls eine zum äußersten Rand hin abnehmende Zelldichte und eine unregelmäßige Erscheinung. Wird eine der schneckenartigen Muster der Mutante vergrößert (Abb. 24C), so erscheint es, dass diese aus einer Mischung heterogener Zellen mit unterschiedlich intensiver Pigmentbildung bestehen, die sich spiralförmig umeinander drehen.

Um einen möglichen Einfluss von Kanamycin auf die veränderte Morphologie der *mxcG*-Disruptionsmutante auszuschließen, wurde parallel das Wachstum eines pZJY156_JK tragenden *M. xanthus* DSM16526-Stamms untersucht (Abb. 24D-F). Der autonom replizierbare Vektor pZJY156_JK verleiht zwar eine Kanamycin-Resistenz, hat jedoch keinen Einfluss auf die Myxochelin-Biosynthese. Der Schwarm von *M. xanthus* DSM16526:pZJY156_JK auf CTPM-Agar mit Kanamycin ähnelt dem des Wildtypstamms (Abb. 23E), wodurch ein Effekt des Antibiotikums auf die veränderte multizelluläre Erscheinung der Myxochelin-defizienten Mutante ausgeschlossen werden kann.

Der Grund für die beobachtete morphologische Veränderung in der Myxochelin-defizienten *M. xanthus* DSM16526-Mutante kann an dieser Stelle noch nicht geklärt

Ergebnisse und Diskussion

4.3 Unterbrechung der Myxochelin-Biosynthese in *M. xanthus*

werden. Mögliche Theorien über den Einfluss von Myxochelinen auf Wachstum und Erscheinung von *M. xanthus*, eventuell ausgelöst durch ihre zusätzliche biologische Funktion als Signalmoleküle oder Autoregulatoren der eigenen Lipoxygenase-Aktivität, werden in Kapitel 4.5 (S. 75 ff.) ausführlich diskutiert.

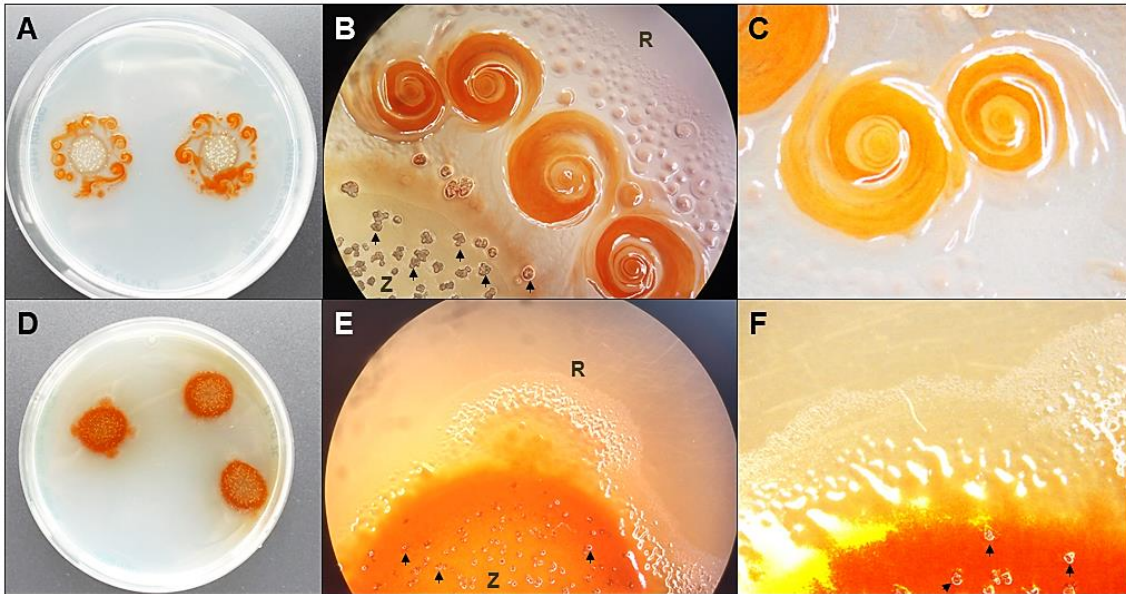


Abbildung 24: (A) Morphologie der Myxochelin-defizienten *M. xanthus*-Mutante nach 14 Tagen Inkubation auf kanamycinhaltigem CTPM-Agar. (B) Vergrößerte Darstellung eines Ausschnittes des Schwarms der Mutante. Die Fruchtkörper im Zentrum (Z) des Schwarms wurden mit Pfeilen markiert. Der äußerste Rand (R) enthält eine geringe Zellzahl und wirkt, ebenso wie die Fruchtkörper, unpigmentiert. (C) Vergrößerte Darstellung der schneckenartigen Muster im Schwarm der Mutante. (D) Morphologie von *M. xanthus*:pZJY156_JK nach 14 Tagen Inkubation auf kanamycinhaltigem CTPM-Agar, mit (E, F) vergrößerten Darstellungen in denen das erhöhte Plateau im Zentrum (Z) und der dünner werdende Rand (R) des Schwarmes gut erkennbar sind. (Abbildungen A und D wurden in Zusammenarbeit mit Dr. A. Quentmeier aus der Abteilung Technische Biochemie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.)

4.4 Vorkommen und Verbreitung der Myxochelin-Biosynthese

Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass Myxocheline rein myxobakterielle Siderophore sind, konnte ihre Biosynthese mittlerweile bereits bei phylogenetisch unterschiedlichen Bakteriengruppen verifiziert werden, und zwar innerhalb der Aktinomyzeten,¹⁶⁶ der Chloroflexi¹⁶⁷ und der Proteobakterien.^{82,156,163-165,169,192,193} Die Biosynthese-Cluster aus *S. aurantiaca* Sg a15, *M. xanthus* DK1622 und *P. piscicida* S2040 wurden bereits ausführlich beschrieben (s. Abb. 8, S. 24; Abb. 12, S. 54, Abb. 13, S. 55). Unter Verwendung der öffentlich zugänglichen Sequenz-Datenbank²⁰⁷ wurde nach weiteren Produzenten gesucht, wobei die entsprechenden Gene der bereits identifizierten Cluster als Vorlagen dienten. Auf diesem Weg konnte in insgesamt 27 Bakterienstämmen das genetische Potential für die Myxochelin- und Pseudochelin-Produktion festgestellt werden (Abb. 25).

Alle Cluster enthielten die fünf Biosynthesegene *mxuC* bis *mxuG*, welche für die Bereitstellung von 2,3-DHBS und die Assemblierung von Myxochelin A benötigt werden. In 18 Clustern konnte zusätzlich das Gen *mxuL* identifiziert werden, das für die Bildung von Myxochelin B essentiell ist. Das für die Amidohydrolase kodierende Gen *mxuM*, welches für die Umwandlung von Myxochelin B zu Pseudochelin A notwendig ist, wurde in insgesamt acht Clustern detektiert. Die Fähigkeit zur Pseudochelin-Produktion wurde interessanterweise nur bei Vertretern der Gammaproteobakterien, um genau zu sein ausschließlich bei Mitgliedern der Ordnungen Alteromonadales, Oceanospirillales und Vibrionales, gefunden. Auffällig in diesem Zusammenhang ist, dass die *mxuM*-tragenden Cluster ausschließlich von Bakterien stammen, die in marinen Habitaten vorkommen.^{165,258-261} Möglicherweise bietet die Bildung von Pseudochelin A einen ökologischen Vorteil gegenüber den Myxochelinen in einem aquatischen Lebensraum.

Bisher konnte noch nicht einwandfrei geklärt werden, warum so viele Myxochelin-Derivate von unterschiedlichen Bakterien gebildet werden. Weiterhin ist unklar, ob diese minimalen strukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Derivaten eine wichtige Bedeutung für den Produzenten besitzen, z.B. im Hinblick auf den Transport dieser Moleküle. Myxobakterien scheinen mehrheitlich auf die Produktion von Myxochelin B spezialisiert zu sein (Abb. 25). Die Biosynthese von Myxochelin A als einziges Derivat tritt dagegen eher seltener auf. Weiterhin erkennbar, dass in den myxobakteriellen Clustern die Gene *mxuH*, *mxuI* und *mxuK* für Funktionen im Transport der Myxocheline kodieren. Homologe Gene konnten in den Clustern der

Ergebnisse und Diskussion

4.4 Vorkommen und Verbreitung der Myxochelin-Biosynthese

Gammaproteobakterien nicht gefunden werden, dafür jedoch die Gene *mxnN* und *mxnP*, welche ebenfalls für membranständige Transporter und Rezeptoren kodieren.

(Auf Folgeseite 74):

Abbildung 25: Vorkommen der Myxochelin-Biosynthesegene in verschiedenen Bakterien mit den voraussichtlichen Produkten. Farbige Felder markieren die Anwesenheit, weiße Felder die Abwesenheit eines Gens mit Homologie zum Gencluster aus *S. aurantiaca* Sg a15 bzw. *P. piscicida* S2040. Schwarz: DHBS-Biosynthese. Grau: Myxochelin-Biosynthese. Blau: Transporter, regulatorische und akzessorische Gene. Grün: Amidohydrolase Gen für die Pseudochelin-Bildung. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2018 entnommen.²⁴⁴

	<i>mxmA</i>	<i>mxmB</i>	<i>mxmC</i>	<i>mxmD</i>	<i>mxmE</i>	<i>mxmF</i>	<i>mxmG</i>	<i>mxmH</i>	<i>mxmI</i>	<i>mxmK</i>	<i>mxmL</i>	<i>mxmM</i>	<i>mxmN</i>	<i>mxmO</i>	<i>mxmP</i>	Produkt
Actinobacteria																
<i>Nonomuraea</i> sp. (NZ_BBZG01000004)																Myxochelin A
Chloroflexia																
<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> (CP000875)																Myxochelin A
β-Proteobacteria																
<i>Andrievotia lacus</i> (NZ_FWXD01000012)																Myxochelin A
γ-Proteobacteria																
Order: Alteromonadales																
<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (FOLO01000002)																Pseudochelin A
<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> (JWIH01000019)																Pseudochelin A
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> (CAPN01000018)																Pseudochelin A
<i>Pseudoalteromonas phenolica</i> (NZ_CP013187)																Pseudochelin A
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> (NZ_JXXW01000072)																Pseudochelin A
Order: Cellvibrionales																
<i>Cellvibrio</i> sp. (NZ_BBUL01000092)																Myxochelin B
Order: Chromatiales																
<i>Chromatiaceae bacterium</i> (NZ_CP019936)																Myxochelin A
Order: Enterobacterales																
<i>Pectobacterium carotovorum</i> (NZ_CP024842)																Myxochelin A
Order: Oceanospirillales																
<i>Hahella chejuensis</i> (NC_007645)																Pseudochelin A
Order: Vibrionales																
<i>Enterovibrio pacificus</i> (NZ_LYBM01000015)																Pseudochelin A
<i>Thaumasiovibrio subtropicus</i> (NZ_BDGQ01000163)																Pseudochelin A
δ-Proteobacteria																
Order: Myxococcales																
<i>Archangium</i> sp. (MPOI01000012)																Myxochelin A
<i>Corallococcus coralloides</i> (NC_017030)																Myxochelin B
<i>Cystobacter fuscus</i> (ANAH02000020)																Myxochelin A
<i>Hyalangium minutum</i> (NZ_JMCB01000010)																Myxochelin B
<i>Melittangium boletus</i> (CP022163)																Myxochelin A
<i>Myxococcus fulvus</i> (FOIB01000003)																Myxochelin B
<i>Myxococcus macrosporus</i> (CP022203)																Myxochelin B
<i>Myxococcus stipitatus</i> (CP004025)																Myxochelin B
<i>Myxococcus xanthus</i> (NC_008095)																Myxochelin B
<i>Sorangium cellulosum</i> (NC_010162)																Myxochelin B
<i>Stigmatella aurantiaca</i> (AF299336)																Myxochelin B
<i>Stigmatella erecta</i> (FOIJ01000009)																Myxochelin B
<i>Vitiosangium</i> sp. (PZOX01000001)																Myxochelin A

4.5 Abschließende Bemerkungen

4.5.1 Myxobakterien als vielversprechende Labororganismen mit Perspektive

Myxobakterien haben sich mittlerweile an die verschiedensten Klimazonen adaptiert und sind weltweit verbreitet.⁴ Räuberische Myxobakterien lassen sich unter Verwendung des sogenannten Baiting-Assays relativ einfach aus ihrem natürlichen Habitat isolieren, indem Umweltproben auf nährstoffarme Agarplatten aufgebracht werden, die im Vorfeld mit potentiellen Beute-Organismen beimpft wurden.²⁶² Diese Mikroben wirken als Lockmittel um ein Wachstum der räuberischen Bakterien aus der Umweltprobe zu induzieren. Eine optische Zuordnung der Myxobakterien auf der Agarplatte wird durch ihr Schwarmverhalten und die Fruchtkörperbildung bei Nahrungsmangel erleichtert.^{4,263} Auf diese Weise ist es möglich, mit geringem Aufwand verschiedenste myxobakterielle Wildtyp-Stämme in die Laboratorien zu transferieren. Ihre Nichtpathogenität erleichtert die Laborarbeit zusätzlich.

Ein weiteres Merkmal der Myxobakterien, neben ihrer gleitenden Fortbewegung und ihrem hochentwickeltem Sozialverhalten,^{18,36} ist ihre Genomgröße. Denn Myxobakterien besitzen die größten bisher identifizierten prokaryotischen Genome mit DNA-Sequenzen von 9 bis zu 15 Mbp, die zwischen 7.285 und 11.599 Proteinkodierende Sequenzen umfassen (Tab. 5).^{80,264-268} Im Gegensatz dazu enthält das Genom des Standard-Laborbakteriums *E. coli* gerade einmal 4,6 Mbp DNA.²⁶⁹ Studien ergaben, dass die myxobakteriellen Genome eine beachtliche Anzahl an Biosynthese-Genclustern enthalten.²⁷⁰ Es konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen der Menge an vorhandenen Biosynthese-Loci und der jeweiligen Genomgröße gefunden werden. Die höchste Anzahl an Naturstoff-Genclustern wurde in dem fakultativ räuberischen *Coralloccoccus coralloides* DSM 2259²⁶⁵ detektiert und nicht in den beiden Zellulose-abbauenden *Sorangium cellulosum*-Stämmen,^{267,268} obwohl jene deutlich größere Genome besitzen (Tab. 5). Interessanterweise scheinen räuberisch lebende Myxobakterien generell einen größeren Anteil ihrer Genom-Sequenz der Biosynthese von Sekundärmetaboliten zu widmen, als ihre Zellulose-abbauenden Verwandten (Tab. 5).²⁷⁰

Tabelle 5: Taxonomische Zuordnung, Ernährungsweise, genomische und biosynthetische Merkmale verschiedener Myxobakterien.

	<i>M. fulvus</i> HW-1	<i>M. xanthus</i> DK1622	<i>C. coralloides</i> DSM 2259	<i>M. stipitatus</i> DSM 14675	<i>S. cellulosum</i> So ce56	<i>S. cellulosum</i> So0157-2
Untergruppe	Cystobacterineae	Cystobacterineae	Cystobacterineae	Cystobacterineae	Sorangiiineae	Sorangiiineae
Familie	Myxococcaceae	Myxococcaceae	Myxococcaceae	Myxococcaceae	Polyangiaceae	Polyangiaceae
Ernährung	saprotroph, räuberisch	saprotroph, räuberisch	saprotroph, räuberisch	saprotroph, räuberisch	saprotroph, zellulolytisch	saprotroph, zellulolytisch
Genomgröße [bp]	9.003.593	9.139.763	10.080.619	10.350.586	13.033.779	14.782.125
Protein-kodierende Sequenzen	7.285	7.388	8.033	8.043	9.367	11.599
GenBank Nr.	CP002830	CP000113	CP003389	CP004025	AM746676	CP003969
Quellenangabe	[264]	[80]	[265]	[266]	[267]	[268]
Anzahl der BGC ^a	25	24	36	29	31	34
Anzahl der BGC je Mbp	2,78	2,63	3,57	2,80	2,38	2,30
Gesamtlänge aller BGC [bp] ^a	1.147.796	1.329.413	1.571.607	1.672.930	1.199.901	1.450.537
Der Biosynthese gewidmeter Anteil des Genoms [%]	12,75	14,55	15,59	16,16	9,21	9,81

^aDie Anzahl und Größe der Biosynthese-Loki wurde unter Verwendung von antiSMASH²⁷¹ bestimmt. BGC, Biosynthese-Gencluster. Die Tabelle wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2016 entnommen.²⁷⁰

Ergebnisse und Diskussion

4.5 Abschließende Bemerkungen

Obwohl Myxobakterien auf genetischer Ebene wie kleine Naturstoff-Fabriken erscheinen, konnte bisher nur ein Bruchteil der möglichen Sekundärmetabolite isoliert und beschrieben werden. An dieser Stelle wird die besondere Bedeutung dieser Bakterien für die Naturstoff-Forschung deutlich. Auch auf molekularbiologischer Ebene gewinnen Myxobakterien immer mehr an Relevanz, vorangetrieben u.a. durch die intensive Forschung an dem Modellorganismus *M. xanthus*.⁶⁶⁻⁷⁰ Die Entdeckung des ersten myxobakteriellen Plasmids pMF1 im Jahr 2008 und damit einhergehend die Etablierung von Shuttle-Vektoren, die gleichermaßen in *E. coli* wie auch in *M. xanthus* replizierbar sind,^{194,214} ebnete den Weg für völlig neue Methoden der genetischen Manipulation und Modifikation von Myxobakterien. Eine davon ist die in dieser Arbeit demonstrierte Möglichkeit der Plasmid-basierten heterologen Produktion von Pseudochelin A in *M. xanthus*. Durch den relativ simplen Aufbau ermöglichen die Expressionsvektoren pJK3 und pJK5 einen einfachen Austausch des Ziel-Gens bzw. der Promotorsequenz (s. Abb. 16, S. 59) und liefern somit ein geeignetes Grundgerüst für zukünftige Expressionsstudien.

4.5.2 Die Vielseitigkeit der Myxocheline

Die Myxochelin-Produktion wurde sowohl in den räuberisch lebenden, wie auch in den zellulolytischen Myxobakterien gefunden (s. Abb. 25, S. 74), was die anfänglich genannte Annahme stützt, dass Myxocheline keine signifikante Rolle für den räuberischen Lebensstil besitzen. Dass Myxocheline als Siderophore fungieren, wurde jedoch bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. Durch ihre Brenzcatechin-Einheiten eignen sie sich hervorragend als Komplexbildner für dreiwertiges Eisen.^{156,163,164} Im Myxochelin-Cluster von *S. aurantiaca* Sg a15 wurde zudem eine Bindestelle für das FUR-Protein identifiziert und über eine FUR-abhängige Regulation der Myxochelin-Biosynthese, wie es für Siderophore typisch ist, berichtet.¹⁶³

Es ist jedoch gut vorstellbar, dass Myxobakterien die Myxocheline nicht nur als Siderophore einsetzen, sondern diese noch weitere, bisher unbekannte Funktionen übernehmen. Denn anders als in der Literatur dargestellt,¹⁵⁶ wurden in der vorliegenden Arbeit alle Kultivierungen in komplexen Nährmedien durchgeführt, deren Eisenkonzentrationen im Vorfeld nicht durch die Zugabe von Chelatbildnern reduziert wurden. Auch die Glaskolben wurden vor der Kultivierung nicht von Eisen befreit, z.B. durch Waschen mit einer EDTA- oder HCl-Lösung. Obwohl somit keine eisenlimitierenden Bedingungen während der Kultivierung herrschten, konnte eine

Ergebnisse und Diskussion

4.5 Abschließende Bemerkungen

solide Myxochelin-Produktion in *P. fallax* HKI727 und *M. xanthus* DSM16526 beobachtet werden. Eine Steigerung der Produktionsrate wurde lediglich durch Zugabe von 2,3-DHBS in das Kulturmedium realisiert (s. Kapitel 4.1.1., S. 49 ff.). Offensichtlich liegt die limitierende Engstelle während der Myxochelin-Biosynthese in der zellulären Verfügbarkeit von 2,3-DHBS.

Myxochelin A wurde vor einigen Jahren als Inhibitor der humanen 5-LOX identifiziert,⁸² einem Enzym, das an der Biosynthese von Leukotrienen beteiligt ist.¹⁸⁰⁻¹⁸² Es ist an dieser Stelle eher unwahrscheinlich, dass es einen evolutionären Zusammenhang zwischen der bakteriellen Produktion von Myxochelin A und der Inhibierung der 5-LOX im Menschen gibt. Denn welche Vorteile sollten diese nicht-pathogenen Bakterien von einer Störung der Leukotrien-Biosynthese haben?

Prokaryotische Lipoxygenasen wurden bisher hauptsächlich in gramnegativen Bakterien gefunden.¹⁷⁹ Nur ein Bericht über Lipoxygenasen aus grampositiven Bakterien existiert bis heute und zwar aus den Aktinomyzeten *Streptomyces canosus* und *Streptomyces masasporeus*.²⁷² Interessanterweise beschränkt sich die Verteilung der Myxochelin-Biosynthesegene ebenfalls nur auf gramnegative Bakterien, mit einer Ausnahme, den grampositiven Aktinomyzeten (s. Abb. 25, S. 74). Die Lipoxygenasen der Säugetiere katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäure zu verschiedenen Eicosanoiden,^{273,274} wohingegen die Lipoxygenasen der Pflanzen und Pilze hauptsächlich α -Linolensäure und Linolsäure als Substrate verwenden.²⁷⁵⁻²⁷⁷ Die bisher beschriebenen prokaryotischen Lipoxygenasen nutzen überwiegend Linolsäure,^{199-201,278} jedoch auch Arachidonsäure als Substrat.^{179,198} Auch in *M. xanthus* DK1622 konnten bereits zwei Lipoxygenasen nachgewiesen werden (GenBank-Code: WP_011551853, WP_011551854).^{202,203} Untereinander weisen die beiden Enzyme nur eine geringe Sequenzidentität auf,²⁰³ jedoch besitzt eine der identifizierten *M. xanthus*-Lipoxygenasen (MxLOX) strukturelle Ähnlichkeiten mit der eukaryotischen 5-LOX.²⁰² Die beiden MxLOX-Enzyme zeigten eine Spezifität für die Substrate Linolsäure und Arachidonsäure.^{202,203} Weitere mögliche Substrate, mit geringerer Präferenz, waren die α - und γ -Linolsäure, die Eicosapentaen- und die Docosahexaensäure.²⁰³ In Cyanobakterien besitzen die bisher gefundenen Lipoxygenasen eine Substrat-Spezifität, die mit der zellulären Fettsäure-Zusammensetzung korreliert.²⁷⁸⁻²⁸⁰ In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese aufgestellt, dass die prokaryotischen Lipoxygenasen an der Aufrechterhaltung der dynamischen Plastizität der Zellmembranen beteiligt sind.¹⁷⁹ Jedoch wurde auch berichtet, dass *P. aeruginosa* eine

Ergebnisse und Diskussion

4.5 Abschließende Bemerkungen

Arachidonsäure-spezifische Lipoxygenase besitzt, obwohl keine mehrfach ungesättigten Fettsäuren in seinen Zellen vorkommen. Denn das opportunistisch pathogene Bakterium sekretiert seine Lipoxygenase und metabolisiert extrazellulär die vom Menschen stammende Arachidonsäure während einer Infektion, um somit die lokale Entzündungsreaktion zu verändern.¹⁹⁸ In *M. xanthus* nimmt die 13-Methylmyristinsäure den größten Anteil der zellulären Fettsäuren ein, entgegen der beobachteten Substratspezifität der beiden MxLOX.^{202,203} C₁₈-Fettsäuren kommen in *M. xanthus* nur in Spuren als Ölsäure und γ -Linolensäure vor.²⁰³ Eine Möglichkeit an dieser Stelle ist, dass die *M. xanthus*-Lipoxygenase womöglich exogene statt zelluläre Substrate umwandelt,²⁰³ jedoch fehlen an dieser Stelle weitere Informationen, sodass dies nur Spekulationen sind. In dem Pilz *C. ulmi* wurde beobachtet, dass die Lipoxygenase-Aktivität entscheidend für seine morphologische Erscheinung ist und den Wechsel zwischen Myzel-Wachstum und Hefen-Bildung beeinflusst.²⁰⁴ Es ist denkbar, dass die Myxocheline in *M. xanthus* ebenfalls eine regulatorische Funktion auf die eigenen Lipoxygenasen ausüben. Eine Störung der Myxochelin-Biosynthese, wie sie in der *mxCG*-Disruptionsmutante erzeugt wurde, könnte demnach zu einer Fehlregulierung der MxLOX-Aktivität führen. Um an dieser Stelle jedoch eindeutige Aussagen treffen zu können, sind weiterführende Experimente notwendig. Hierbei interessant wäre die Generierung verschiedener Knock-Out-Mutanten, in denen die beiden Gene für die bisher identifizierten MxLOX-Gene nacheinander sowie gemeinsam ausgeschaltet werden müssten. Diese Ergebnisse könnten Hinweise auf die biologische Funktion der Lipoxygenasen in *M. xanthus* geben.

Eine weitere Theorie wäre, dass Myxocheline neben ihrer Funktion als Siderophore auch als Signalmoleküle agieren. Ähnliches wurde bei dem Bakterium *P. aeruginosa* entdeckt, dessen Siderophore, die Pyoverdine, die Produktion von Virulenzfaktoren kontrollieren.²⁸¹ Möglich wäre demnach auch, dass die veränderte Morphologie der *M. xanthus* DSM16526-*mxCG*-Disruptionsmutante durch den Verlust der Myxocheline als Signalstoffe entstanden ist, und nicht im Zusammenhang mit einer veränderten MxLOX-Aktivität steht. Um diese These zu verifizieren, bedarf es der Generierung von stabilen *mxCG*-Knock-Out-Mutanten. Die Aufrechterhaltung der Mutation würde dann, anders als in der vorliegenden Arbeit, nicht die permanente Zugabe eines Selektionsmarkers erfordern. Interessant in diesem Zusammenhang wäre die Frage, ob eine externe Zugabe von Myxochelin A und B zu einer stabilen *mxCG*-Knock-Out-Mutante den Phänotyp des Schwarmes wieder normalisieren könnte.

5. Anhang

5.1 Abbildungen

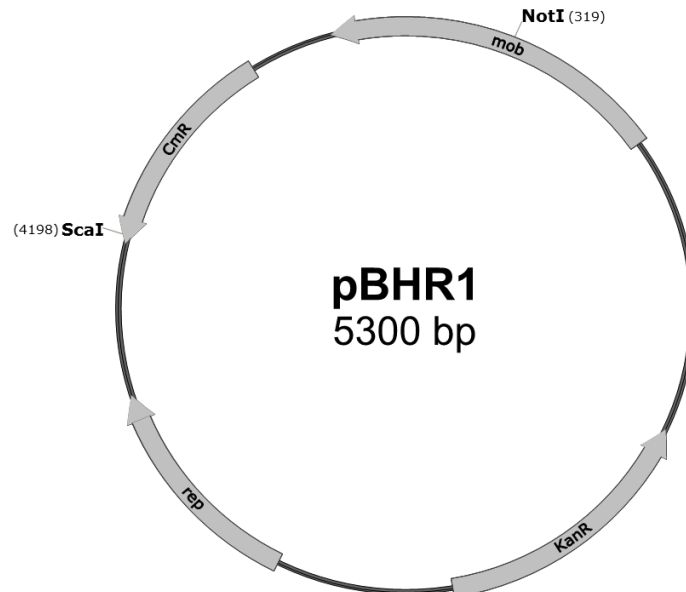


Abbildung A1: Der broad-host-range Vektor pBHR1.²¹³ Cm^R, Chloramphenicol-Resistenz; Kan^R, Kanamycin-Resistenz; *mob*, Mobilisierungsgen; *rep*, Replikationsgen.

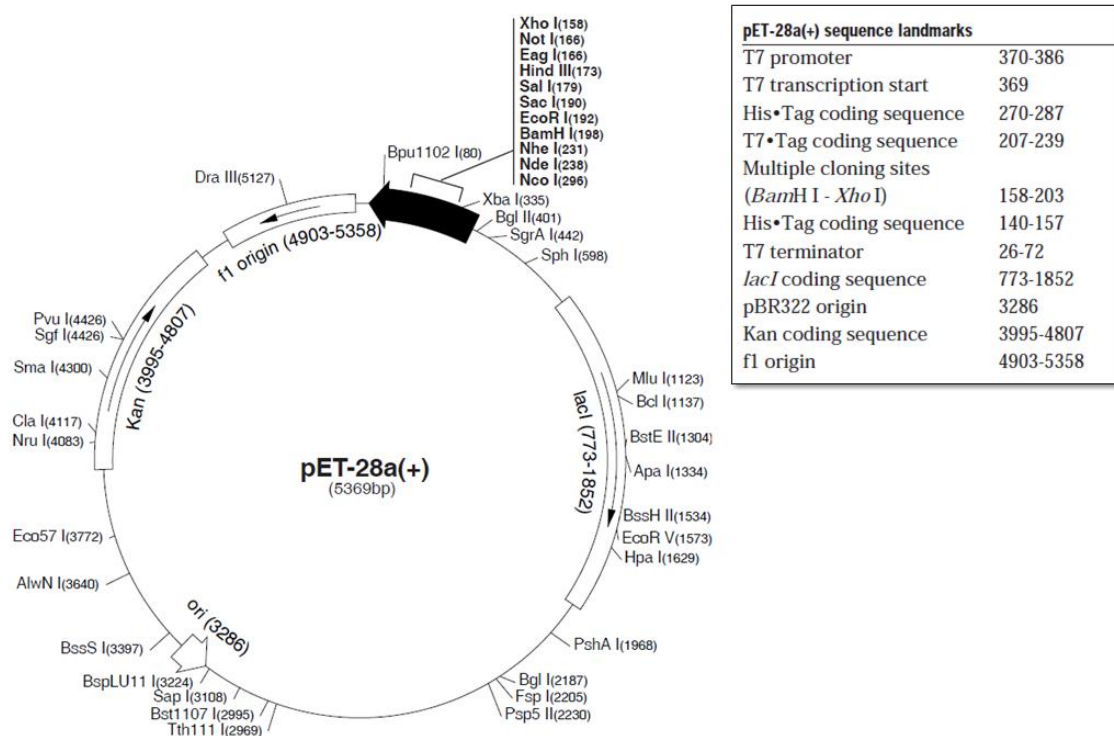


Abbildung A2: Der *E. coli*-Expressionsvektor pET-28a(+) (Novagen).

Anhang
5.1 Abbildungen

<i>bla</i>	β-Lactamase (Ampicillin-Resistenz)
<i>eco47IR</i>	Lethalitätsgen. Bei einer Selbstligation des Vektors kodiert das intakte Gen für das Restriktionsenzym Eco47I, dessen Erkennungssequenz (5'-GGWCC-3' mit W=A/T) innerhalb der Plasmid-DNS liegt. ²¹⁴
P_{lacUV5}	Modifizierter P_{lac} Promotor.
<i>rep</i> (pMB1)	Replikationsgen von Plasmid pMB1.
T7 Promotor	T7 RNA Polymerase Promoto.

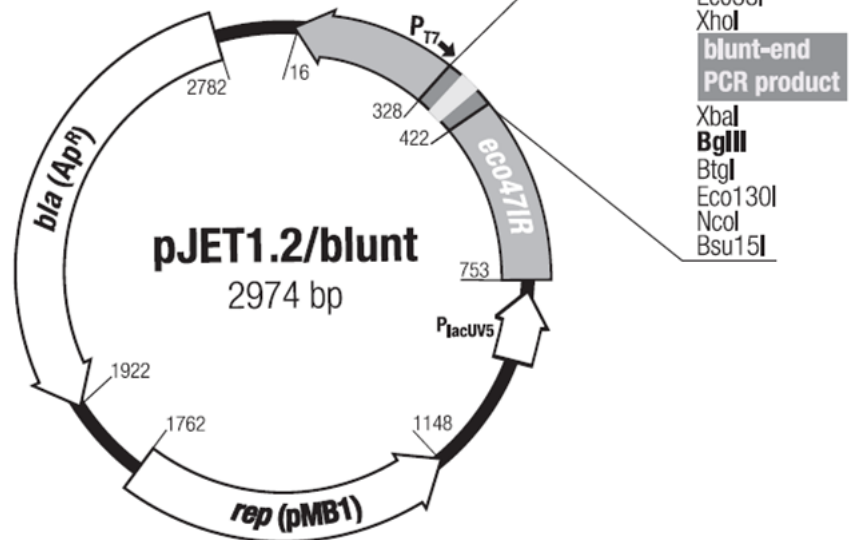


Abbildung A3: Der *E. coli*-Klonierungsvektor pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific).

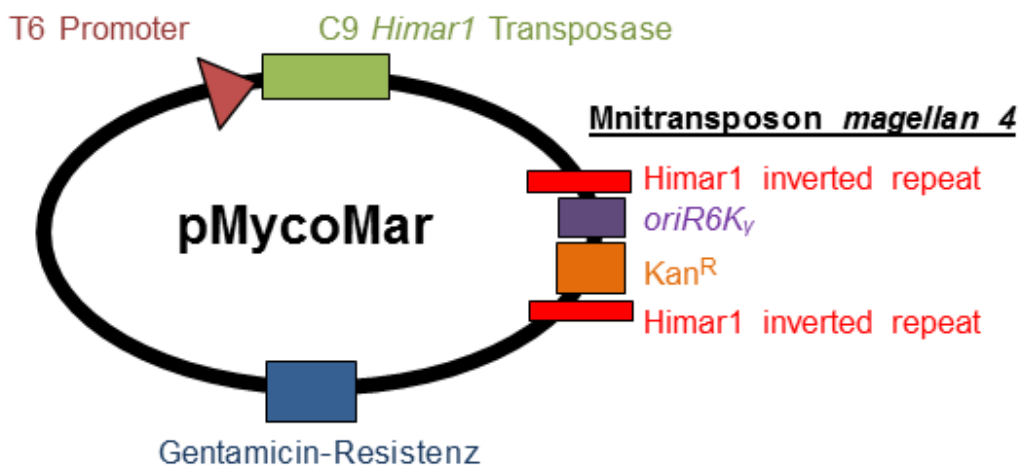


Abbildung A4: Der Mutagenese-Vektor pMycoMar mit seinem Minitransposon *magellan 4* (Harvard Medical School).²¹⁵

Anhang
5.1 Abbildungen

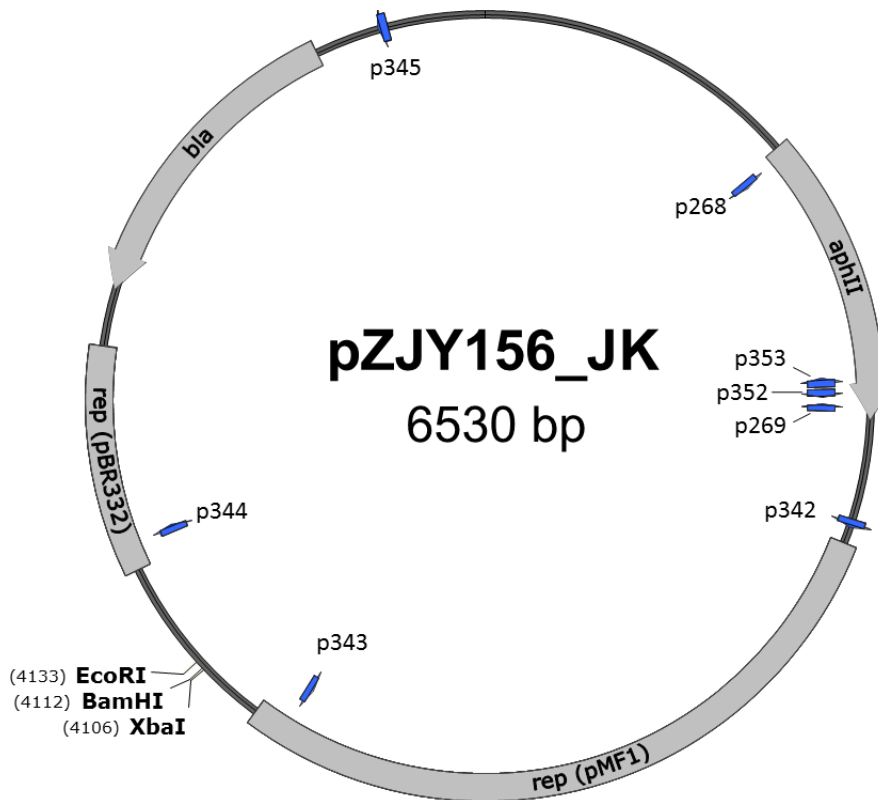


Abbildung A5: Der *E. coli* – *M. xanthus* Shuttlevektor pZJY156_JK (ATG:biosynthetics). Die blauen Pfeile zeigen die Hybridisierungsstellen der jeweiligen Primer („p“) an.

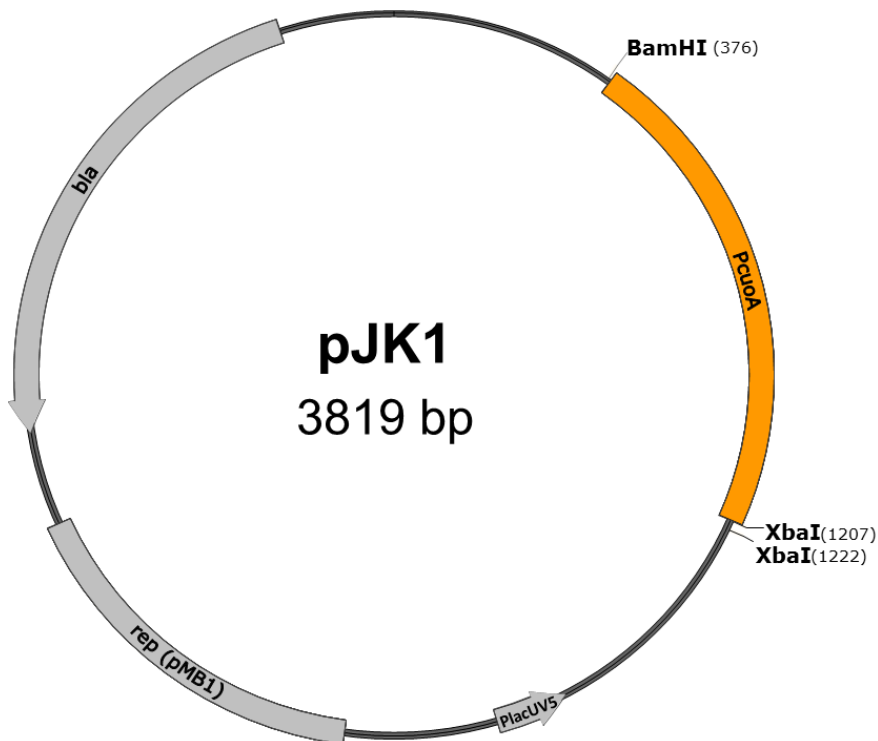


Abbildung A6: Subklonierungsvektor pJK1 (pJET1.2-P_{cuoA}).

Anhang
5.1 Abbildungen

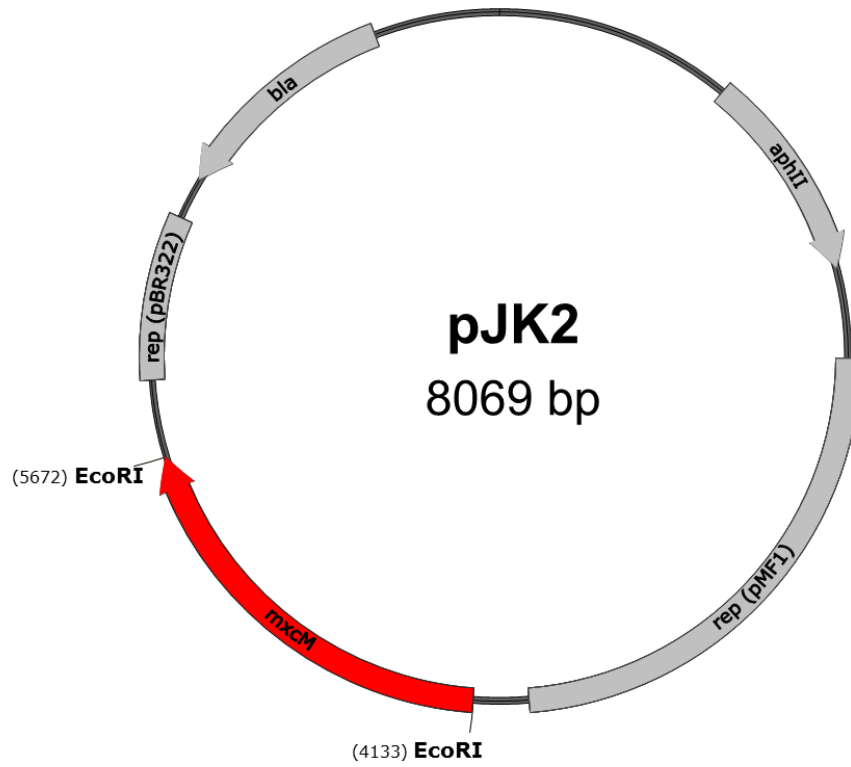


Abbildung A7: Subklonierungsvektor pJK2 (pZJY156_JK-*mxmM*).

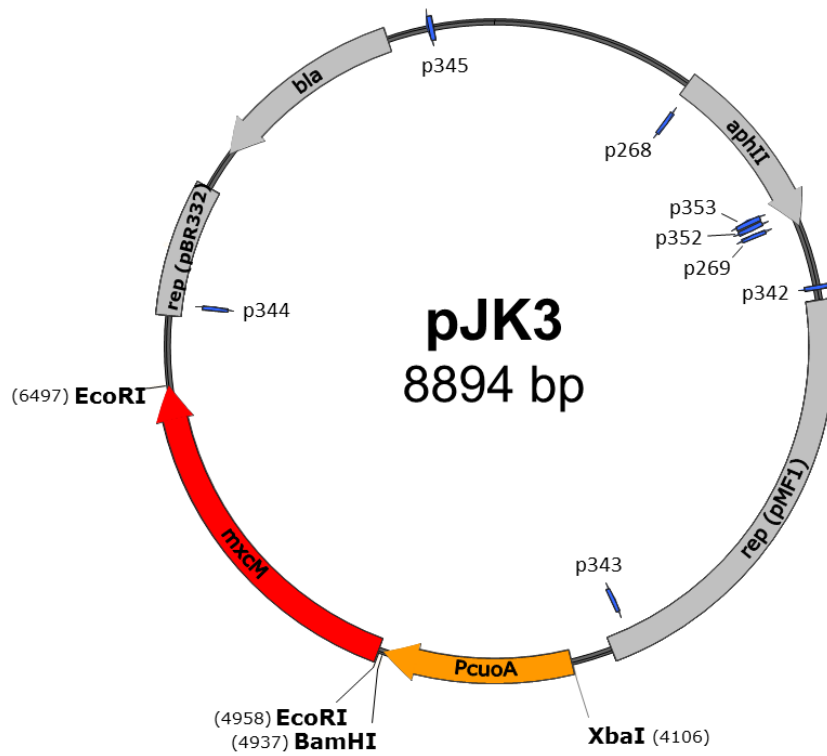


Abbildung A8: *M. xanthus*-Expressionsvektor pJK3 (pZJY156_JK-*P_{cuoA}*-*mxmM*).

Anhang
5.1 Abbildungen

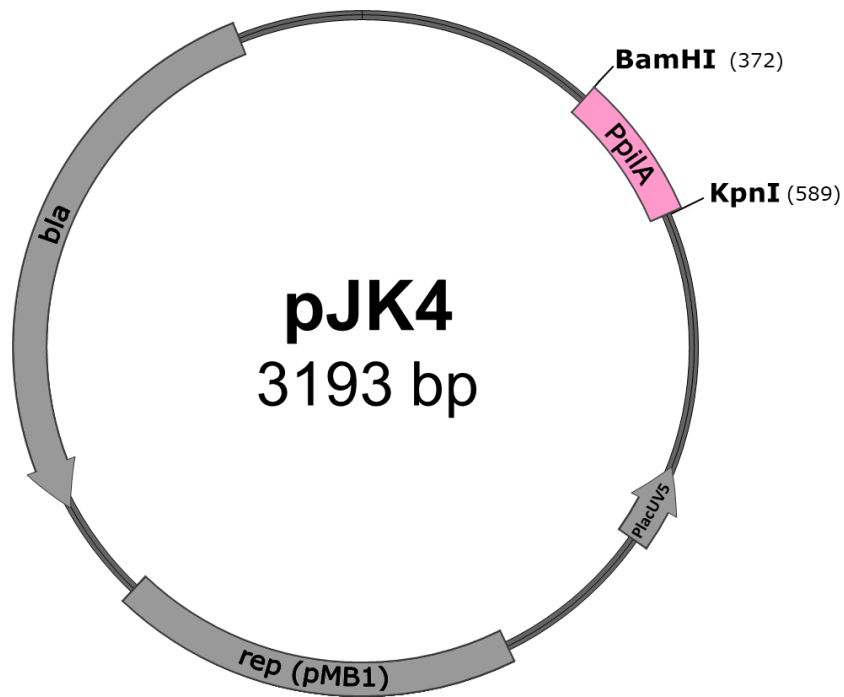


Abbildung A9: Subklonierungsvektor pJK4 (pJET1.2-*P_{piA}*).

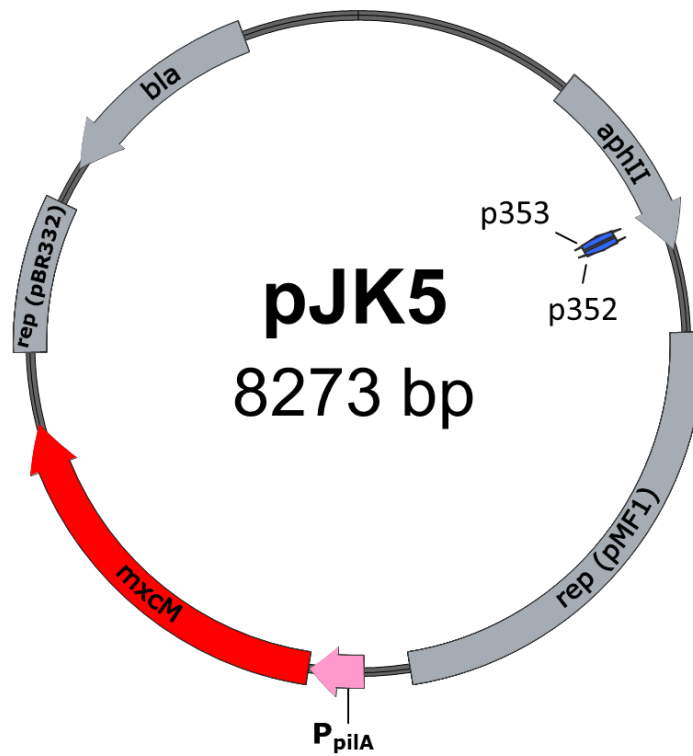


Abbildung A10: *M. xanthus*-Expressionsvektor pJK5 (pZJY156_JK-*P_{piA}*-*mxCM*).

Anhang
5.1 Abbildungen

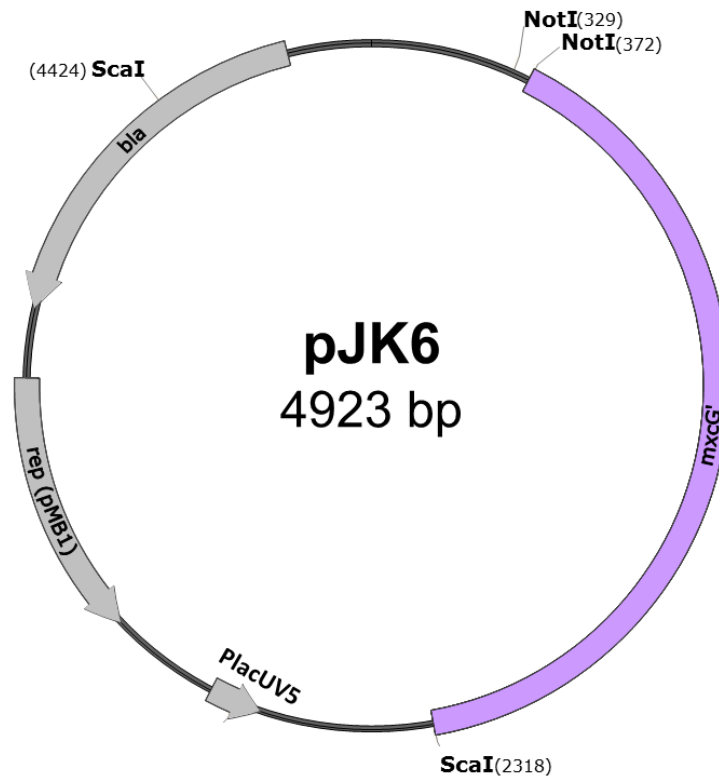


Abbildung A11: Subklonierungsvektor pJK6 (pJET1.2-*mxcG*, Partialsequenz).

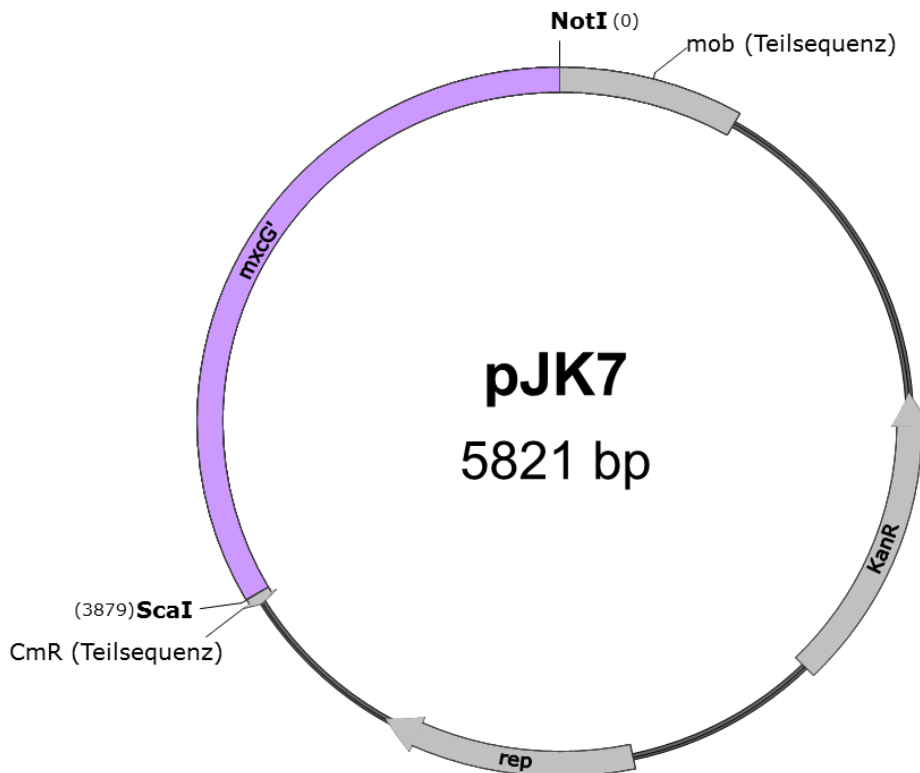


Abbildung A12: *M. xanthus* *mxcG*-Disruptionsvektor pJK7.

Anhang
5.1 Abbildungen

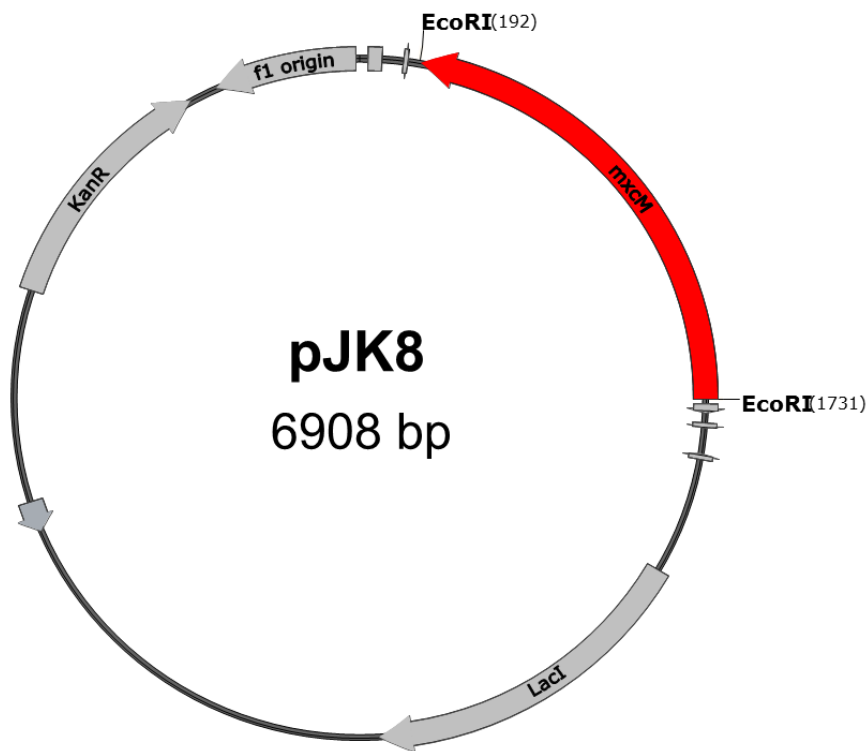
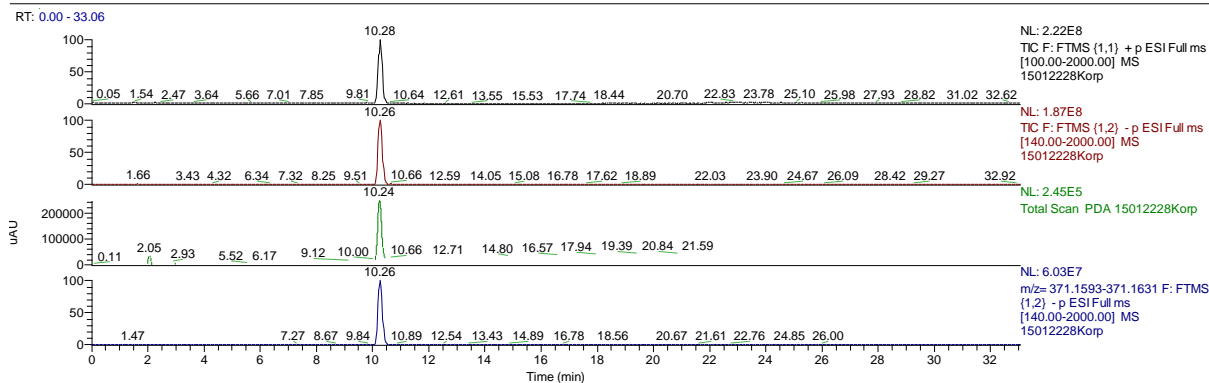


Abbildung A13: *E. coli*-Expressionsvektor pJK8 (pET-28a(+)-*mxcM*).



15012228Korp #442 RT: 10.26 AV: 1 NL: 5.96E7
T: FTMS (1,2) - p ESI Full ms [140.00-2000.00]

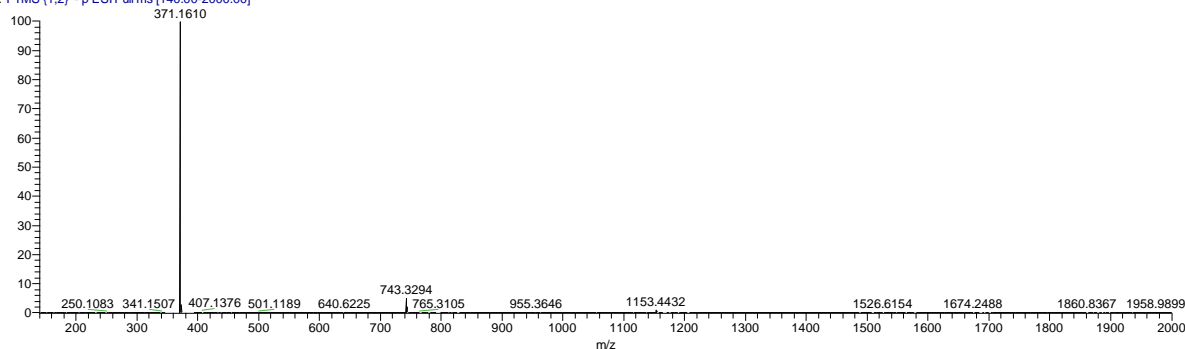


Abbildung A14: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J1. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang
5.1 Abbildungen

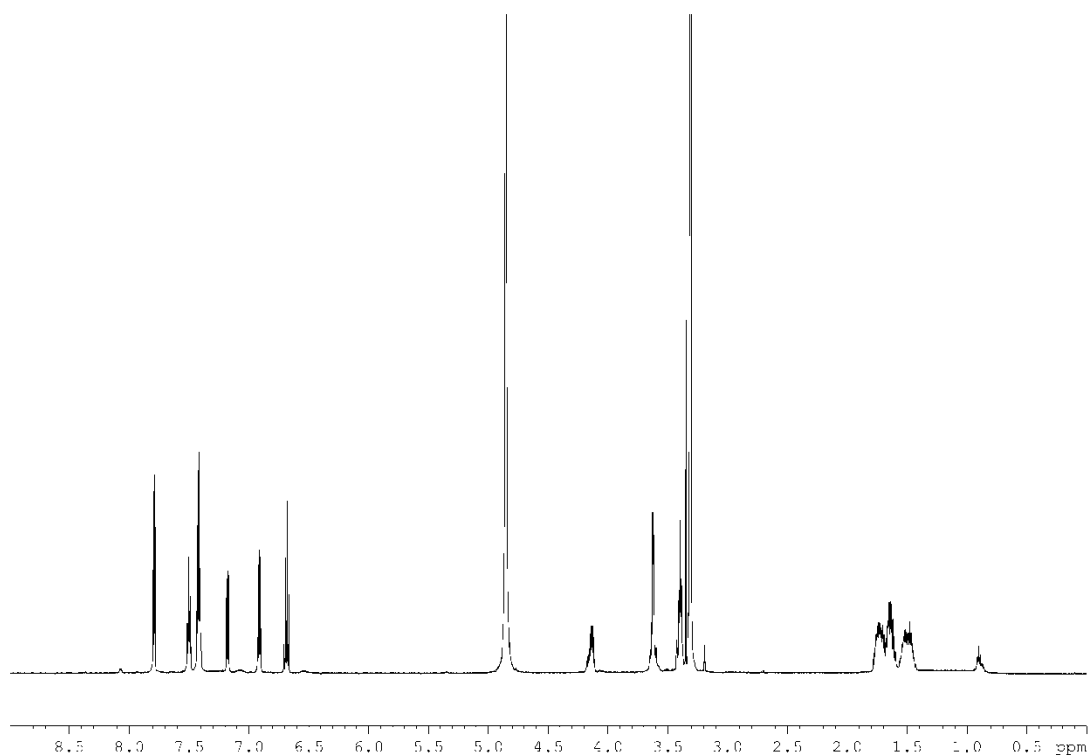


Abbildung A15: ^1H -NMR-Spektrum von Myxochelin J1 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

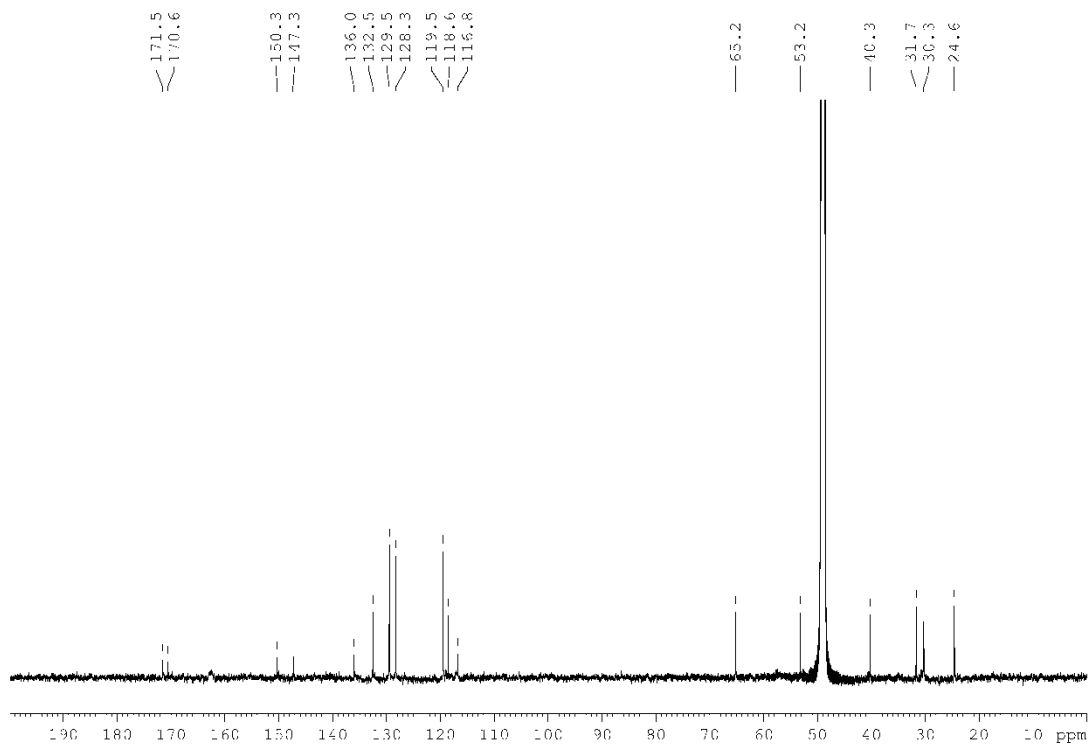


Abbildung A16: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J1 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang

5.1 Abbildungen

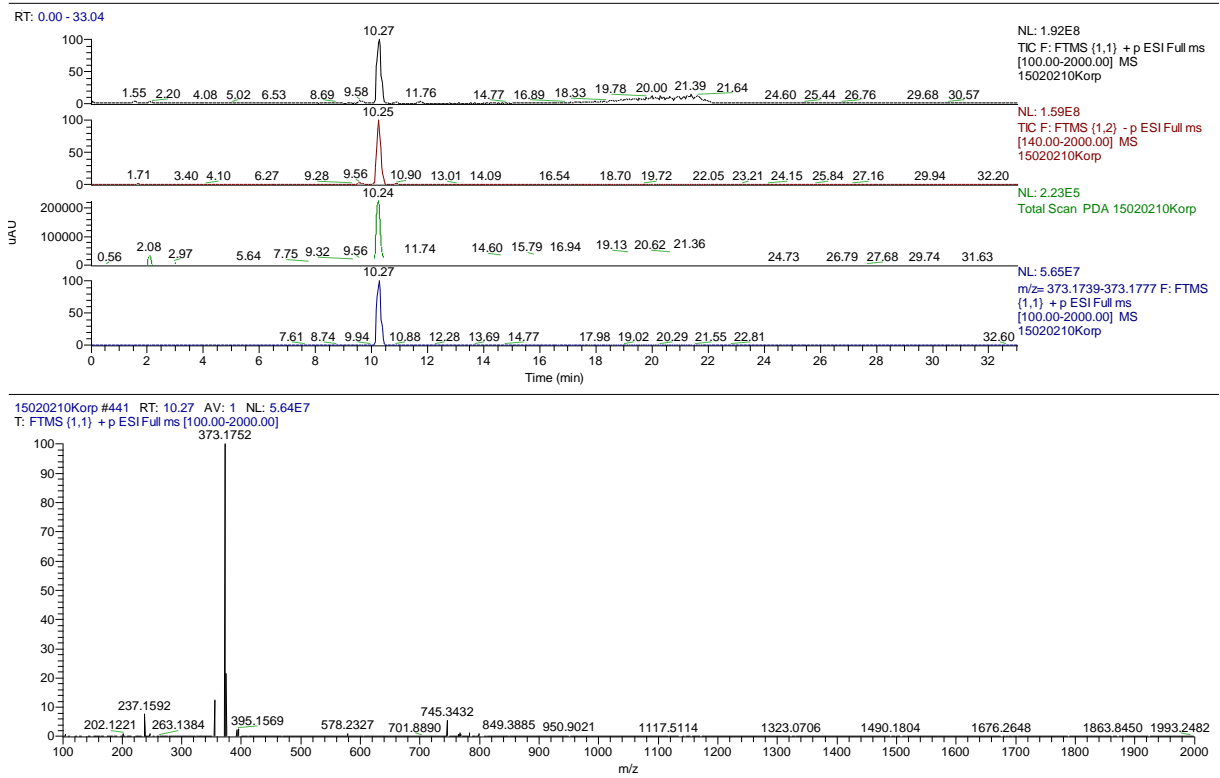


Abbildung A17: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J2. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

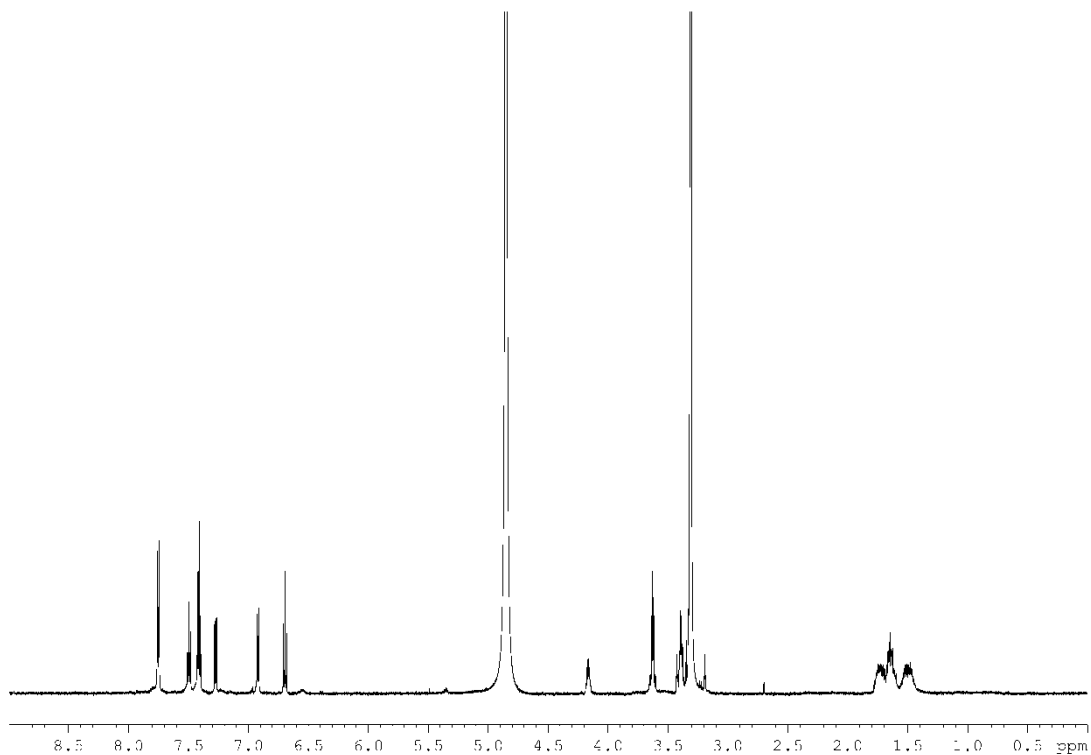


Abbildung A18: ¹H-NMR-Spektrum von Myxochelin J2 in Methanol-*d*₄. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

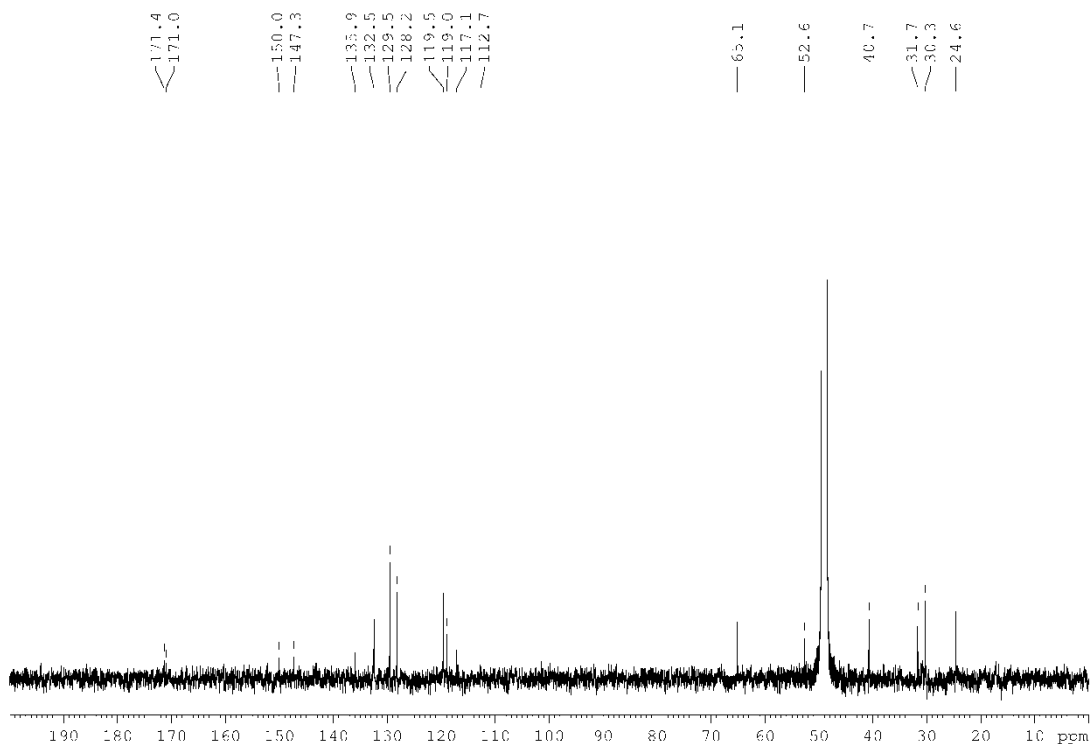
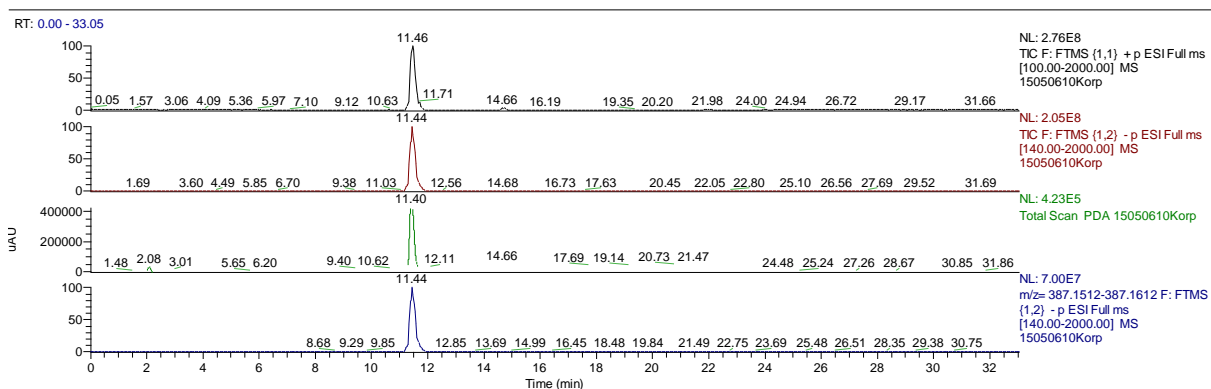


Abbildung A19: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J2 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶



15050610Korp #492 RT: 11.44 AV: 1 NL: 6.87E7

T: FTMS (1,2) -p ESI Full ms [140.00-2000.00]

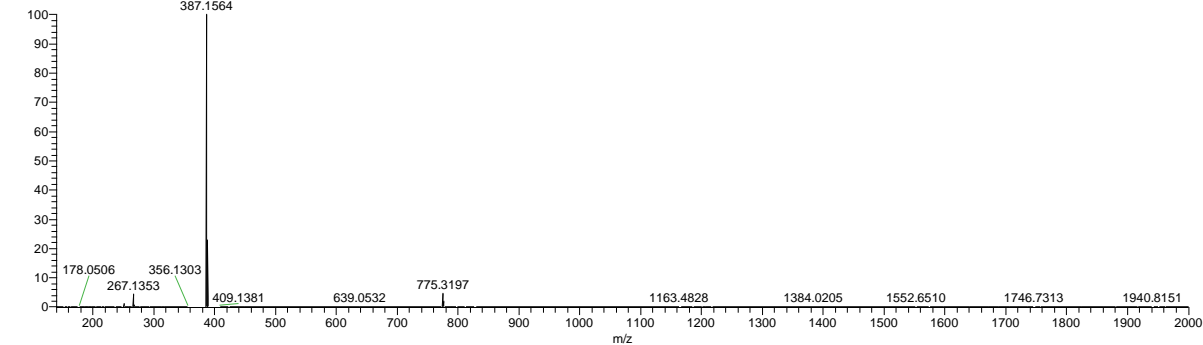


Abbildung A20: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J3. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang
5.1 Abbildungen

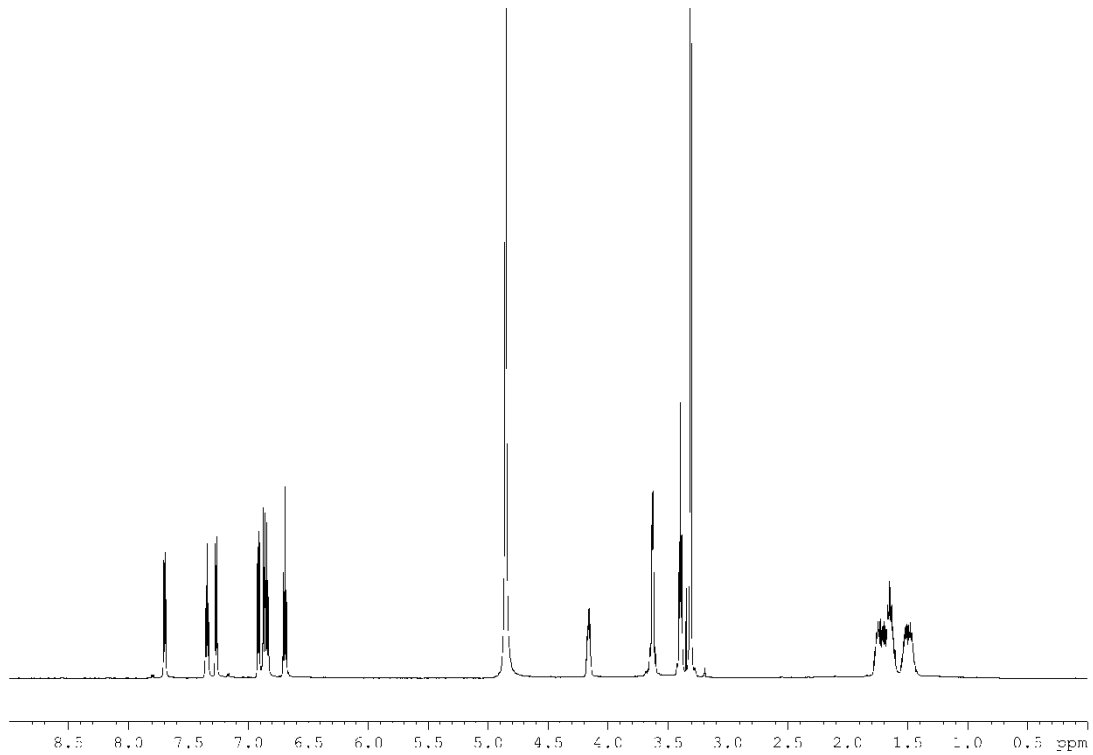


Abbildung A21: ^1H -NMR-Spektrum von Myxochelin J3 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

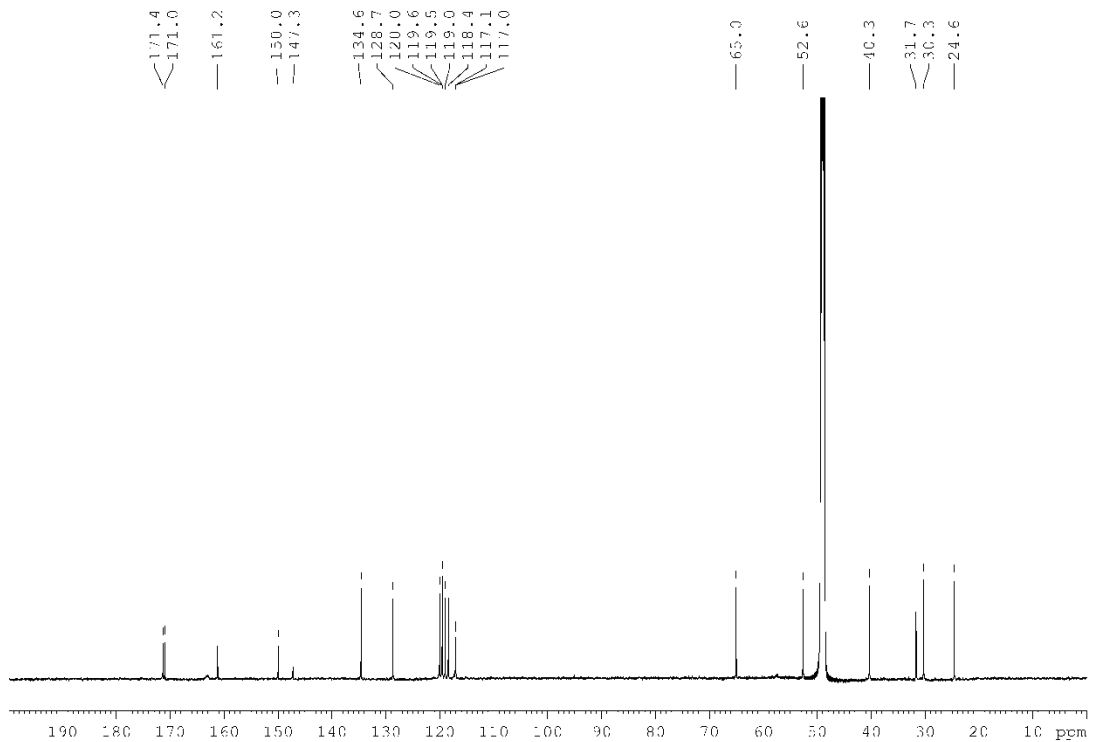


Abbildung A22: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J3 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

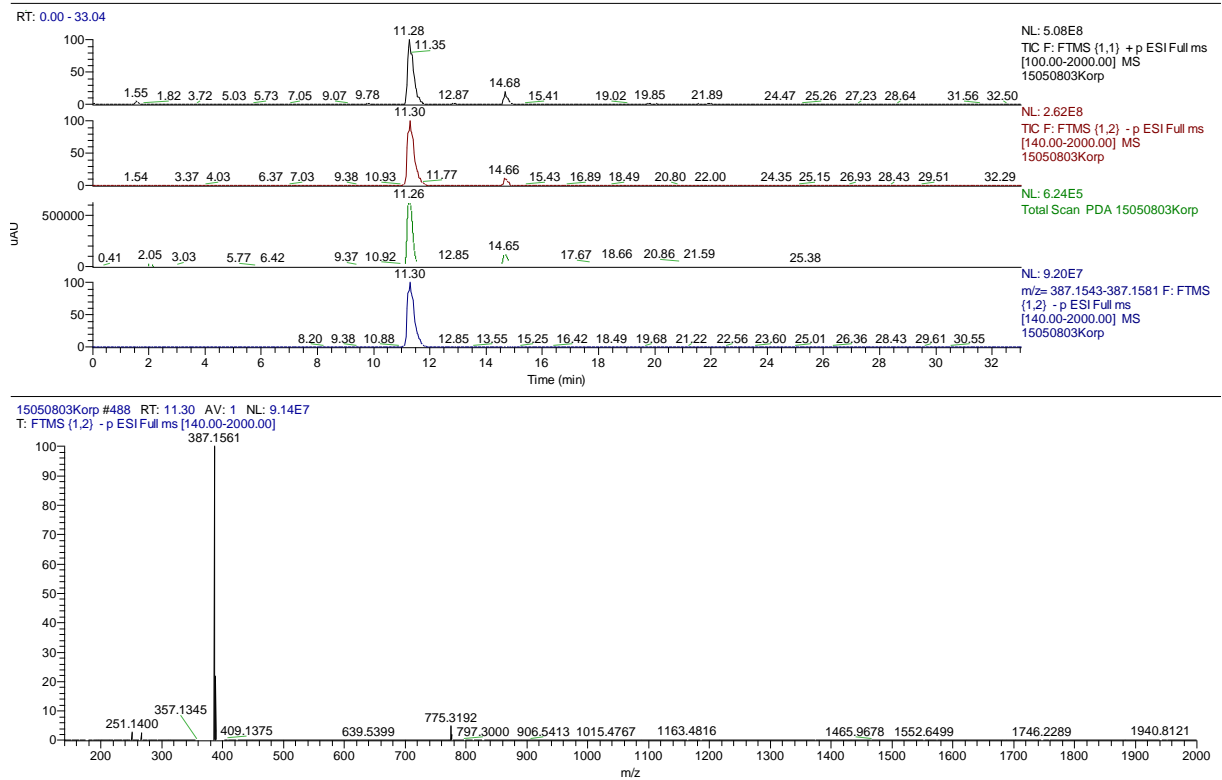


Abbildung A23: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J4. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

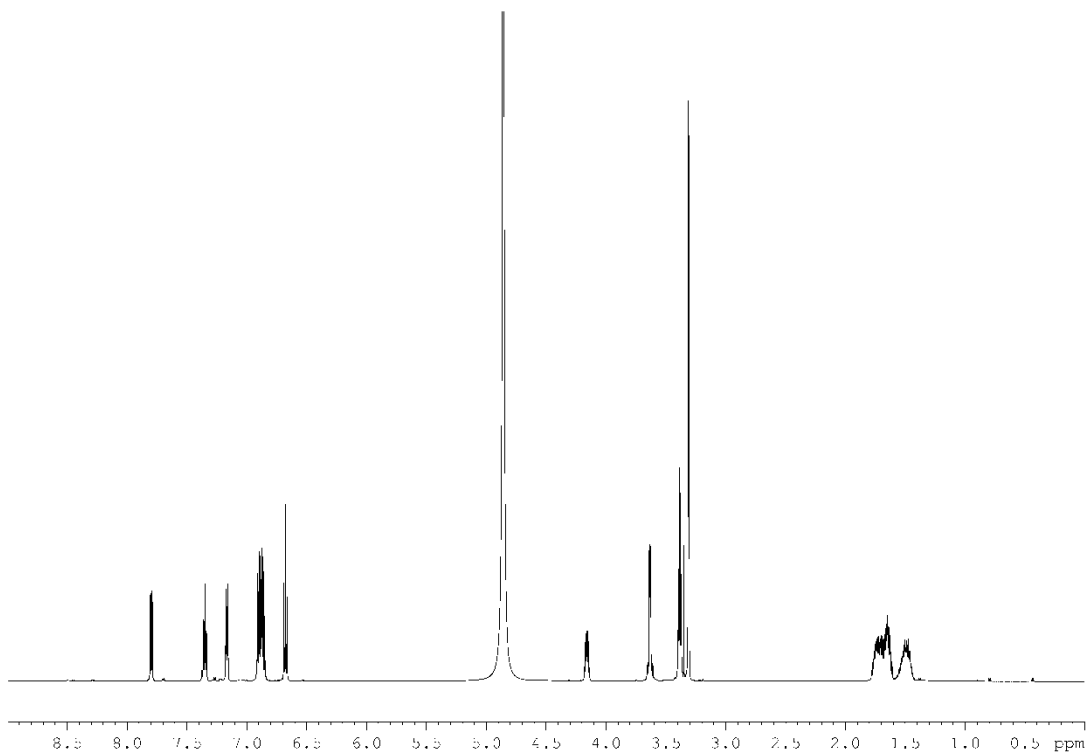


Abbildung A24: ¹H-NMR-Spektrum von Myxochelin J4 in Methanol-*d*₄. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

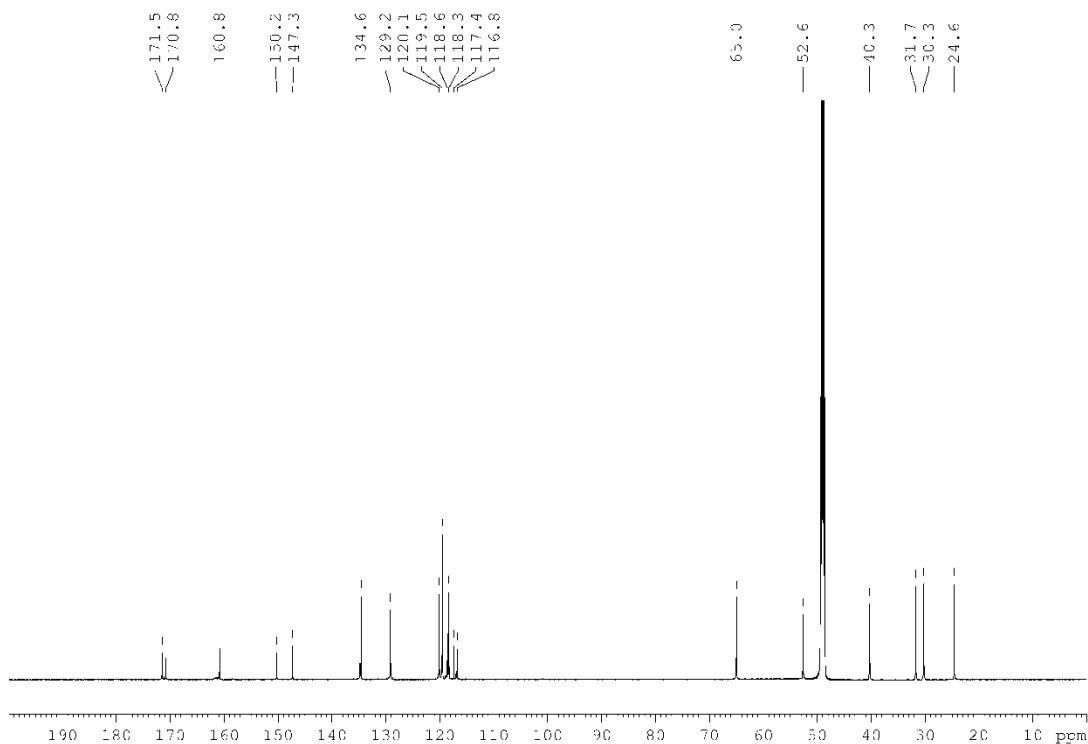
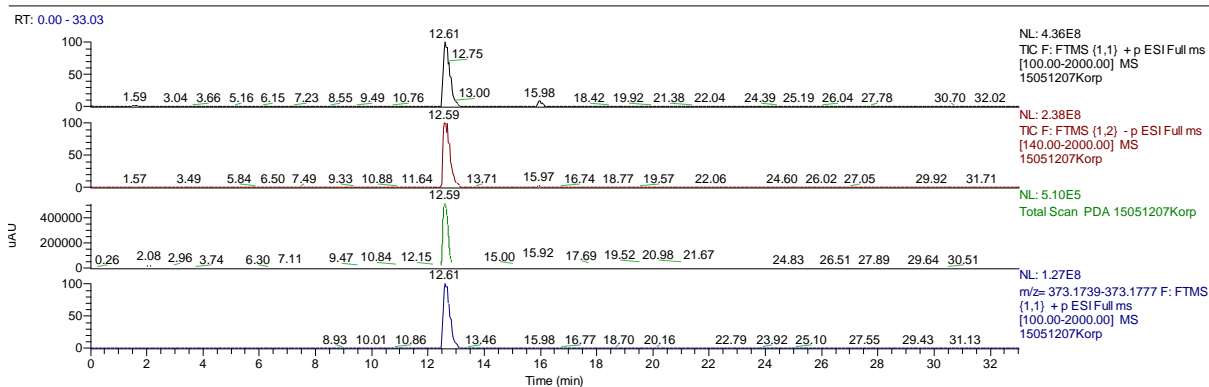


Abbildung A25: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J4 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶



15051207Korp #539 RT: 12.61 AV: 1 NL: 1.24E8
T: FTMS (1,1) + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

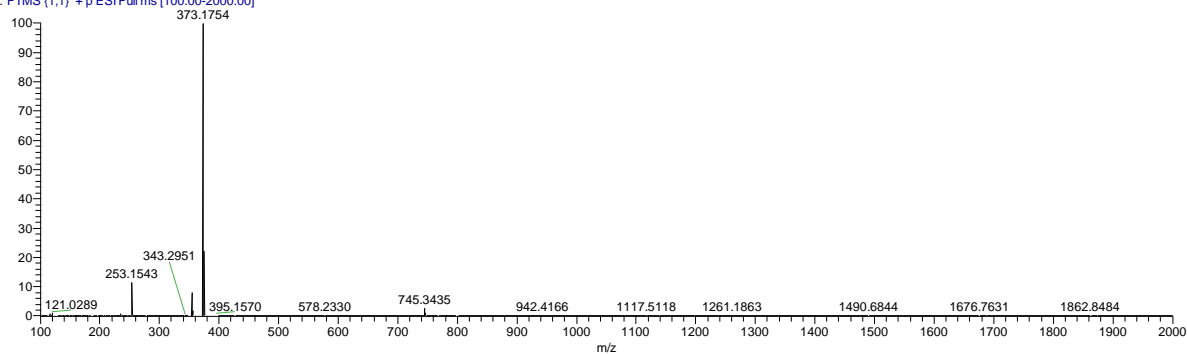


Abbildung A26: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J5. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang
5.1 Abbildungen

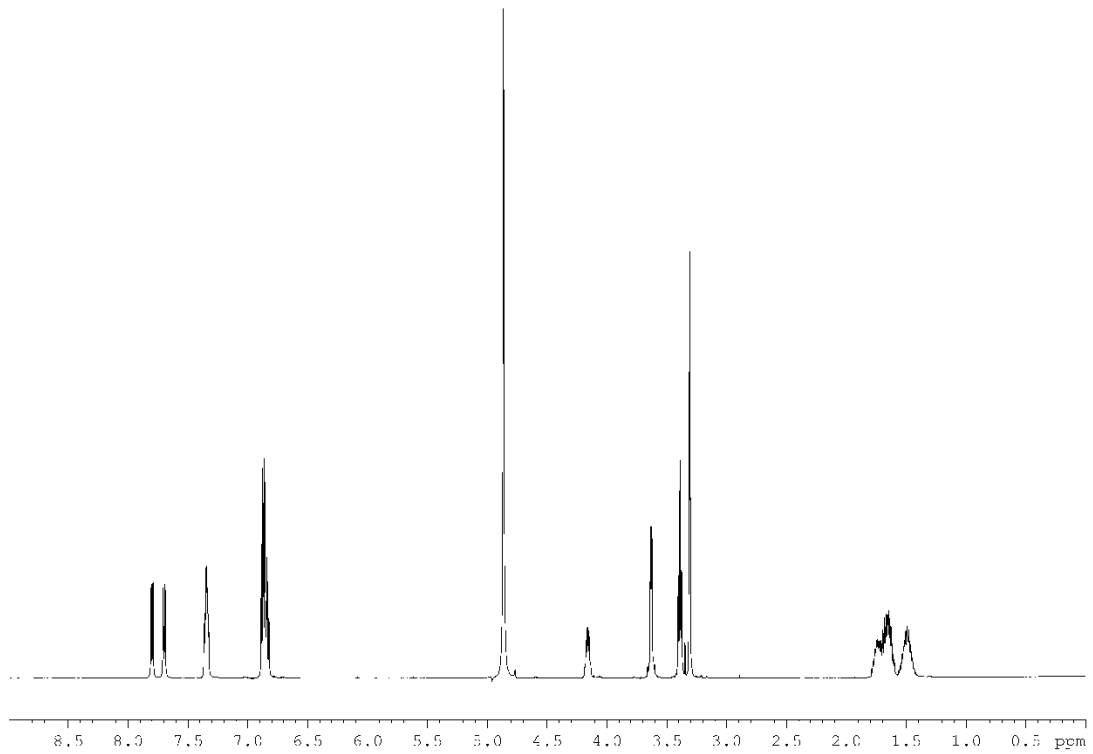


Abbildung A27: ^1H -NMR-Spektrum von Myxochelin J5 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

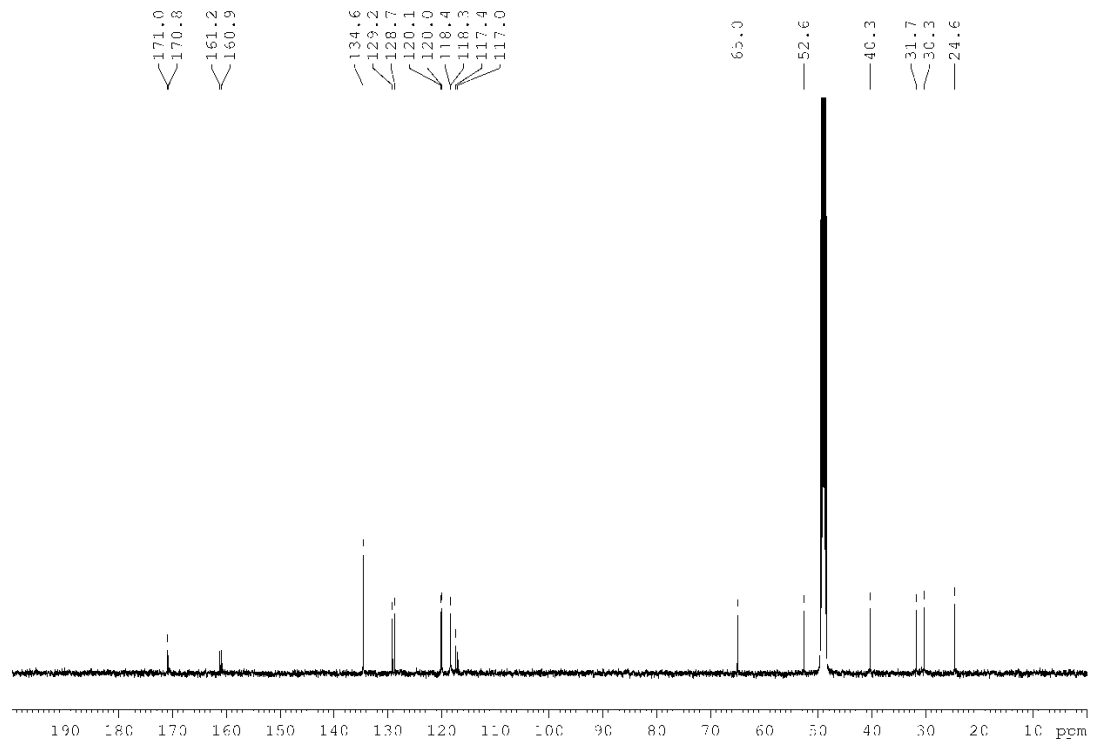


Abbildung A28: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J5 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

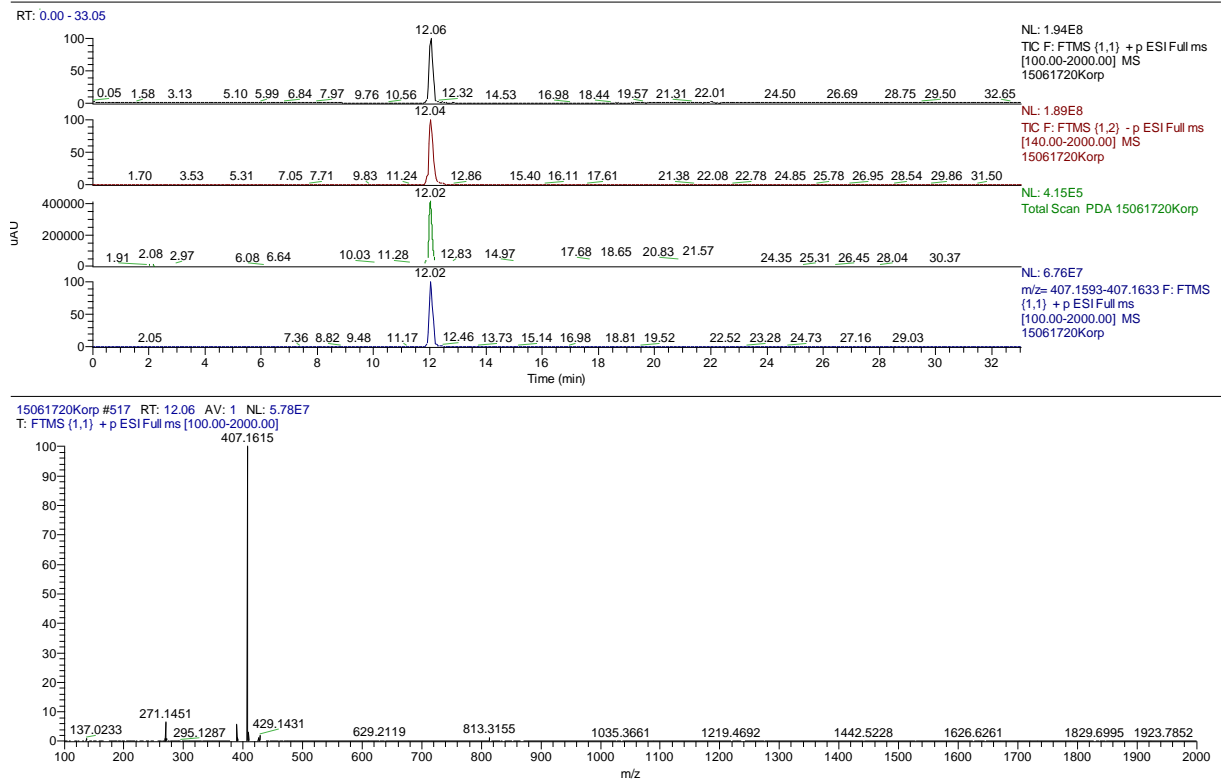


Abbildung A29: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J6. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

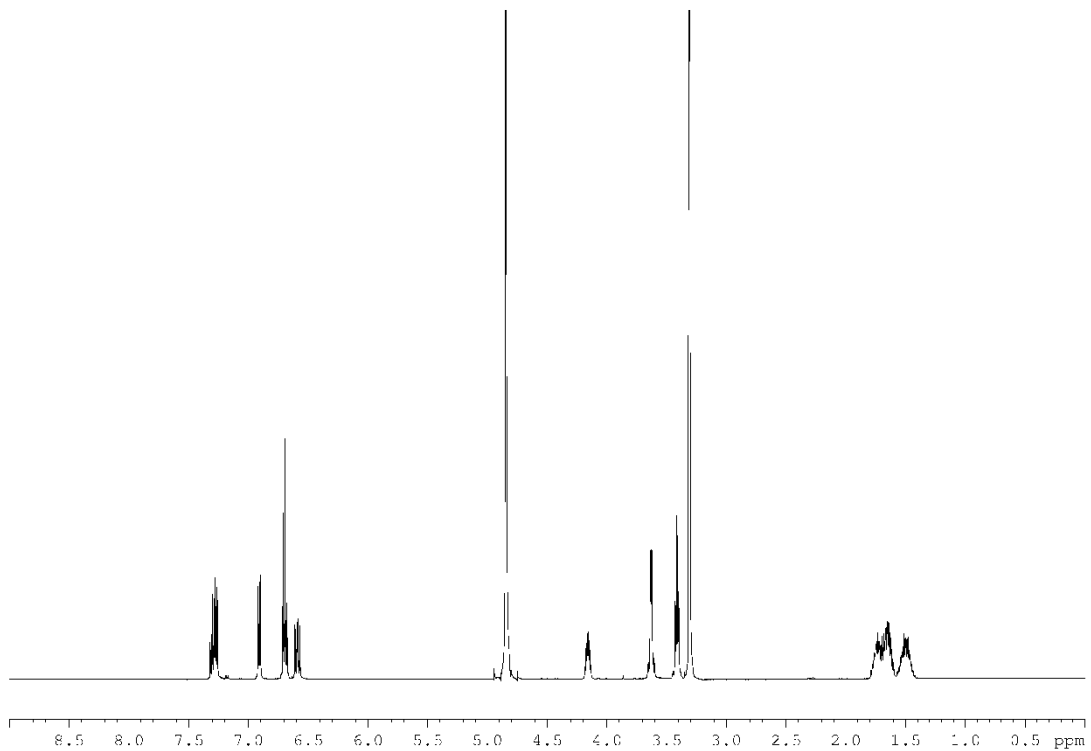


Abbildung A30: ¹H-NMR-Spektrum von Myxochelin J6 in Methanol-*d*₄. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

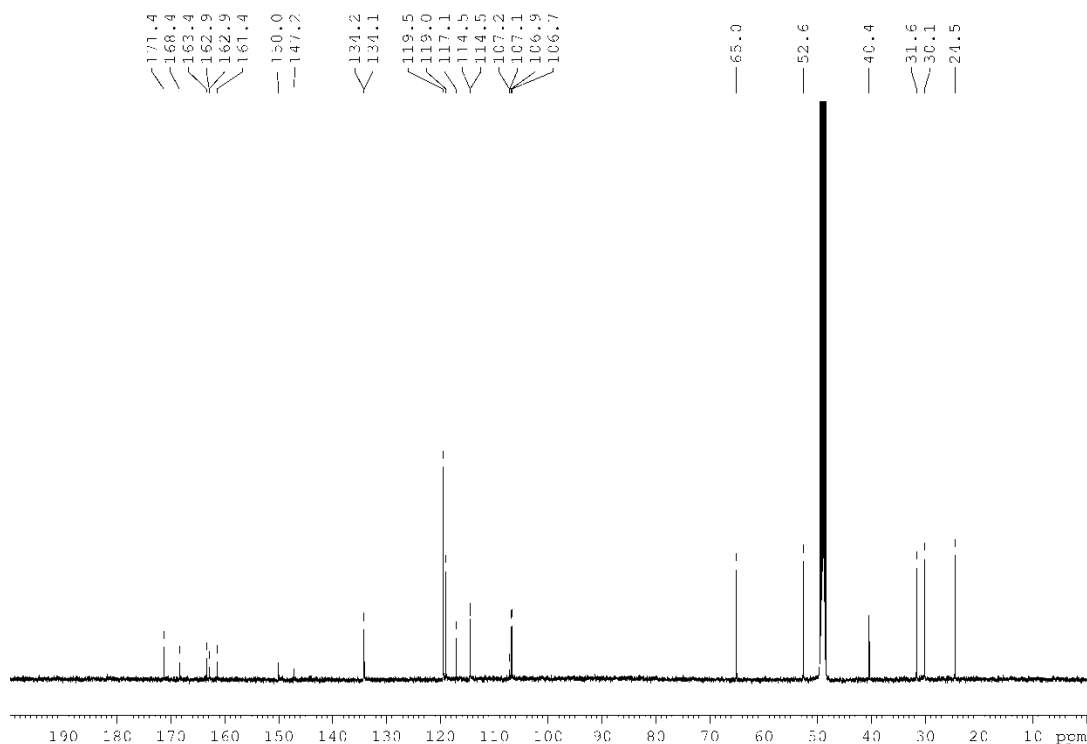
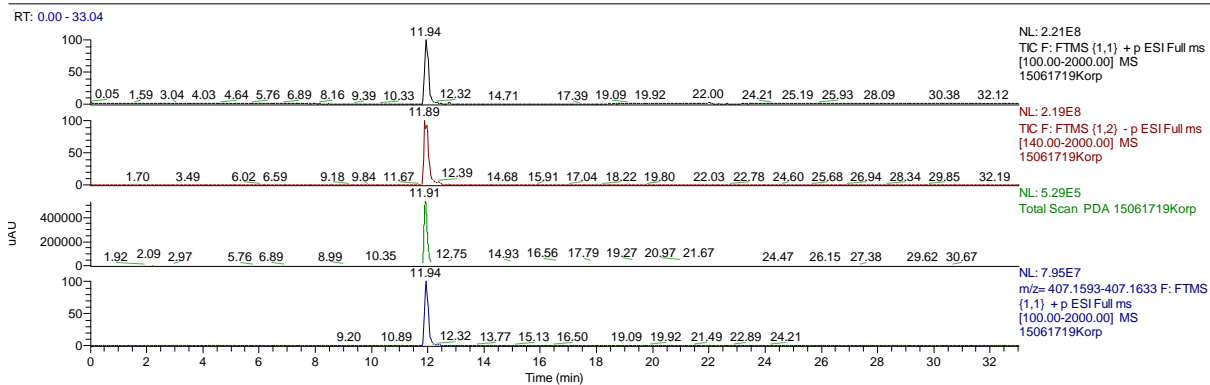


Abbildung A31: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J6 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶



15061719Korp #511 RT: 11.94 AV: 1 NL: 7.79E7
T: FTMS (1,1) + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

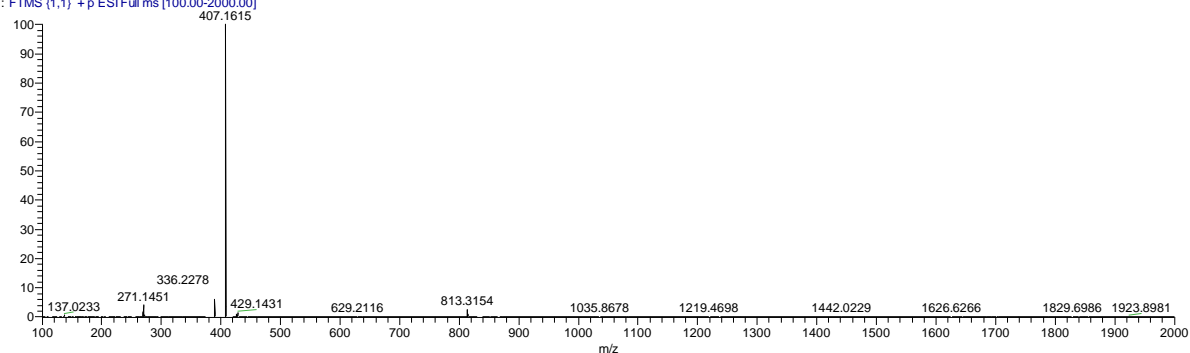


Abbildung A32: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J7. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang
5.1 Abbildungen

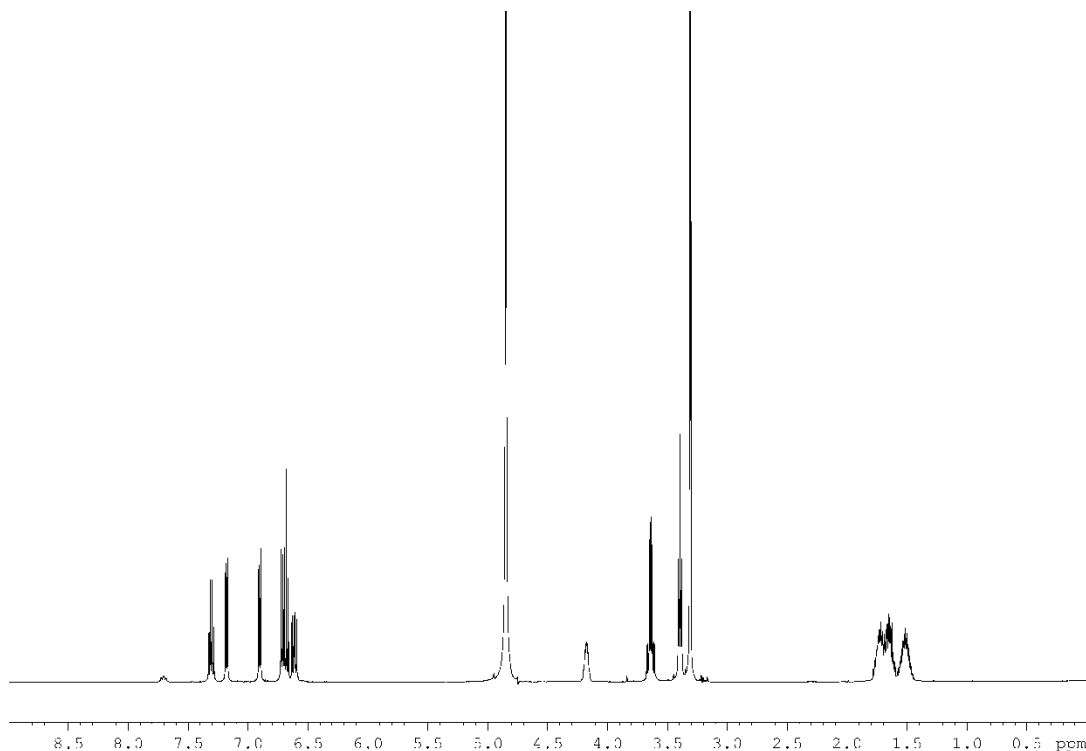


Abbildung A33: ^1H -NMR-Spektrum von Myxochelin J7 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

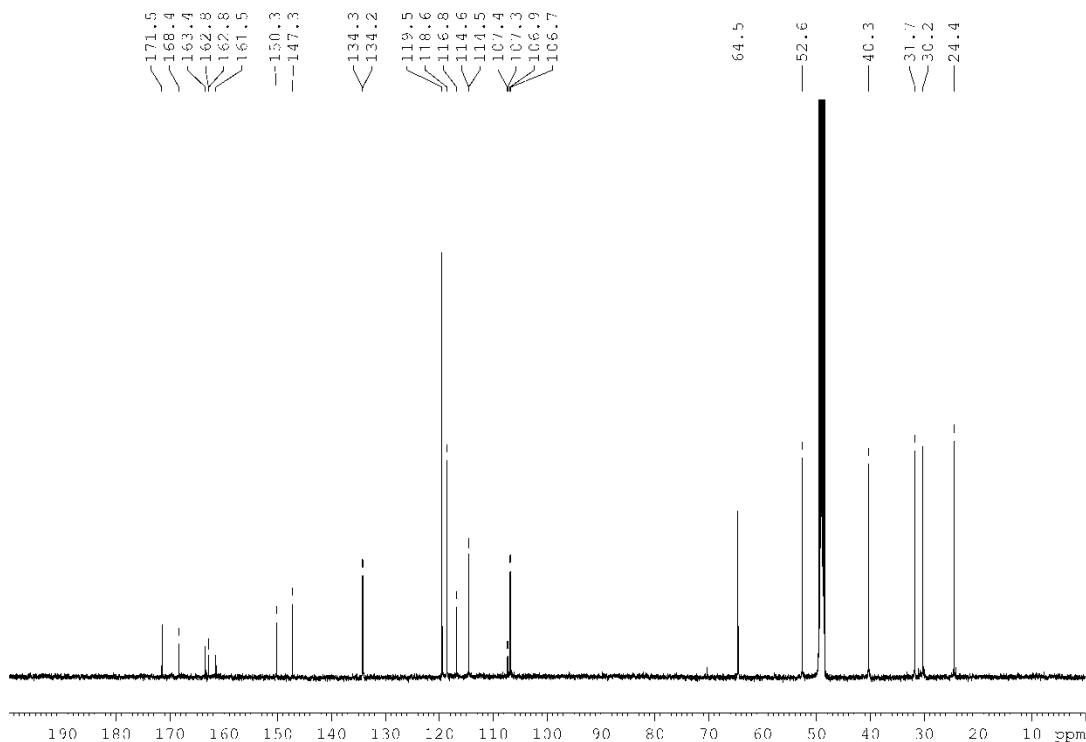


Abbildung A34: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J7 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

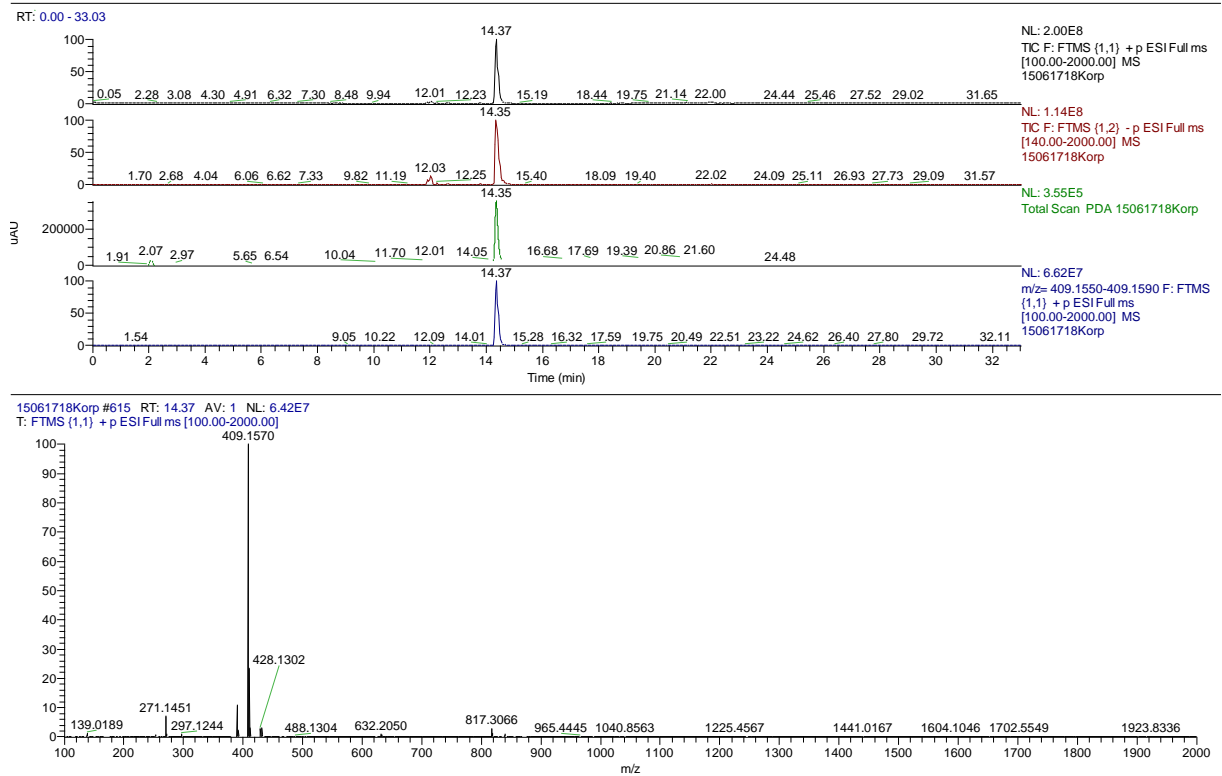


Abbildung A35: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J8. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

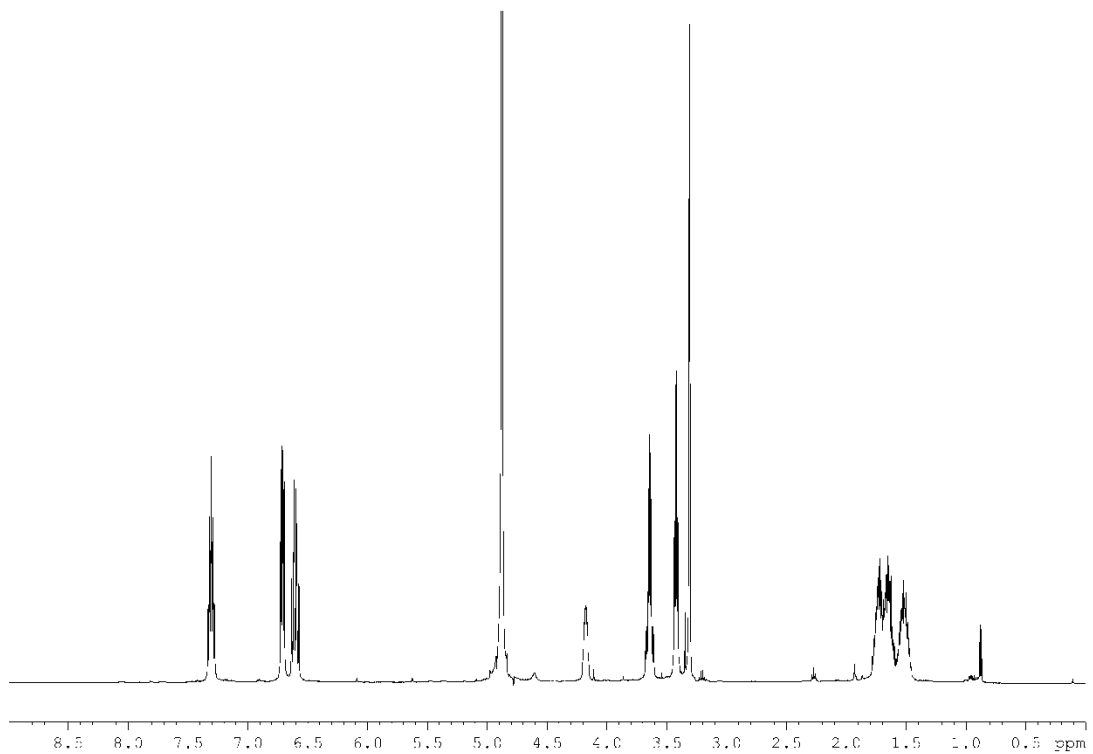


Abbildung A36: ¹H-NMR-Spektrum von Myxochelin J8 in Methanol-*d*₄. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

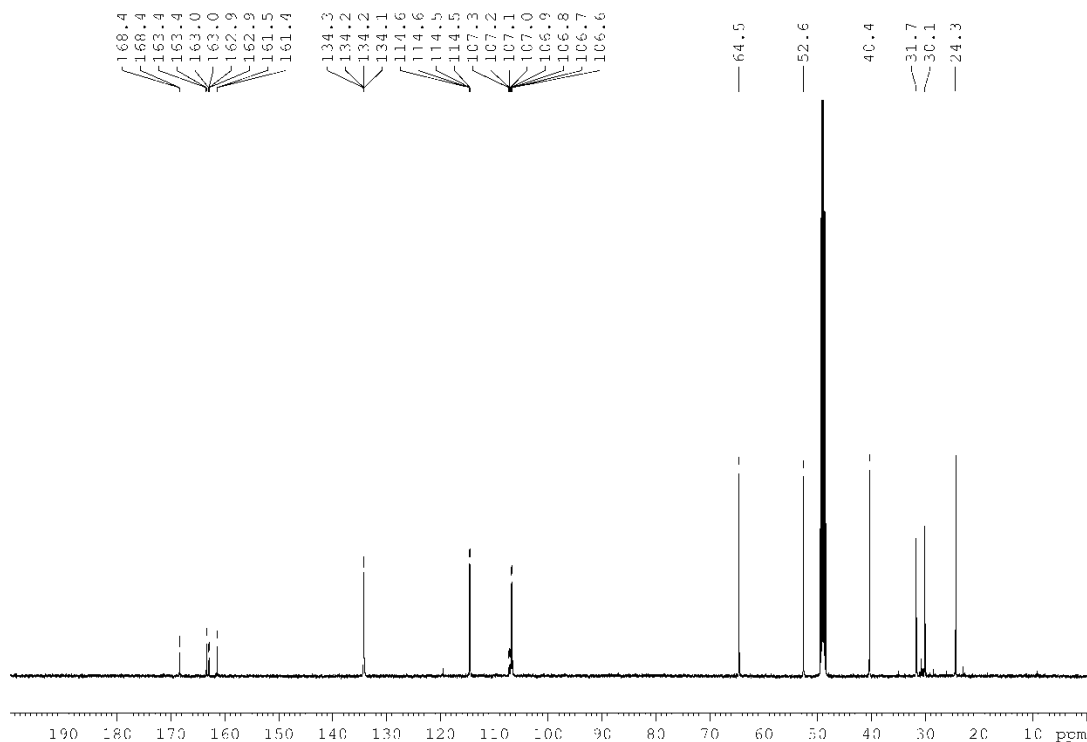
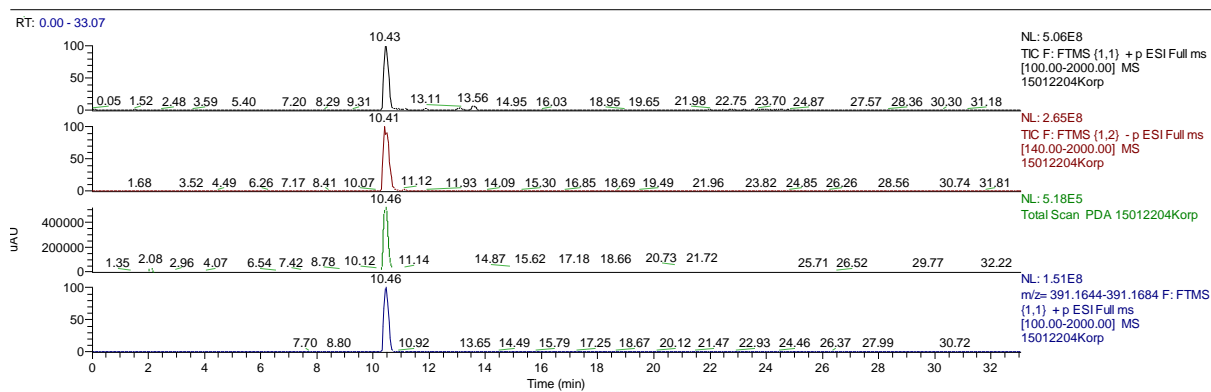


Abbildung A37: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J8 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶



15012204Korp #455 RT: 10.43 AV: 1 NL: 1.50E8
T: FTMS (1,1) + p ESI Full ms [100.00-2000.00] MS

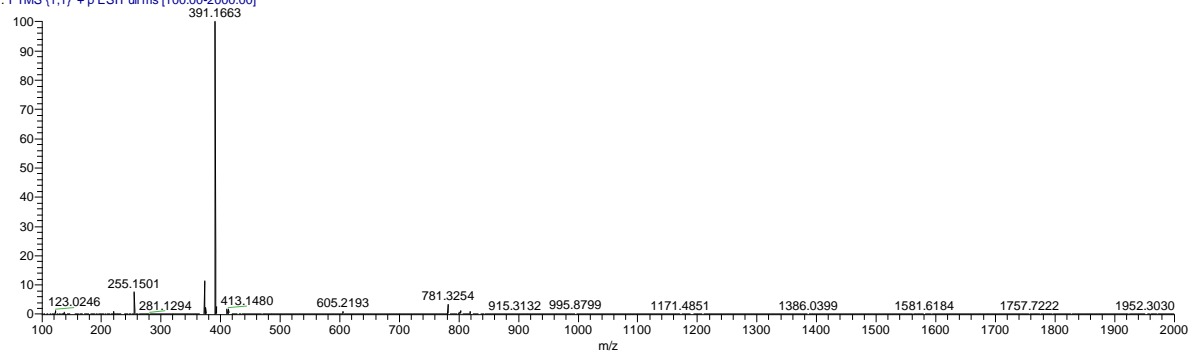


Abbildung A38: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J9. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang
5.1 Abbildungen

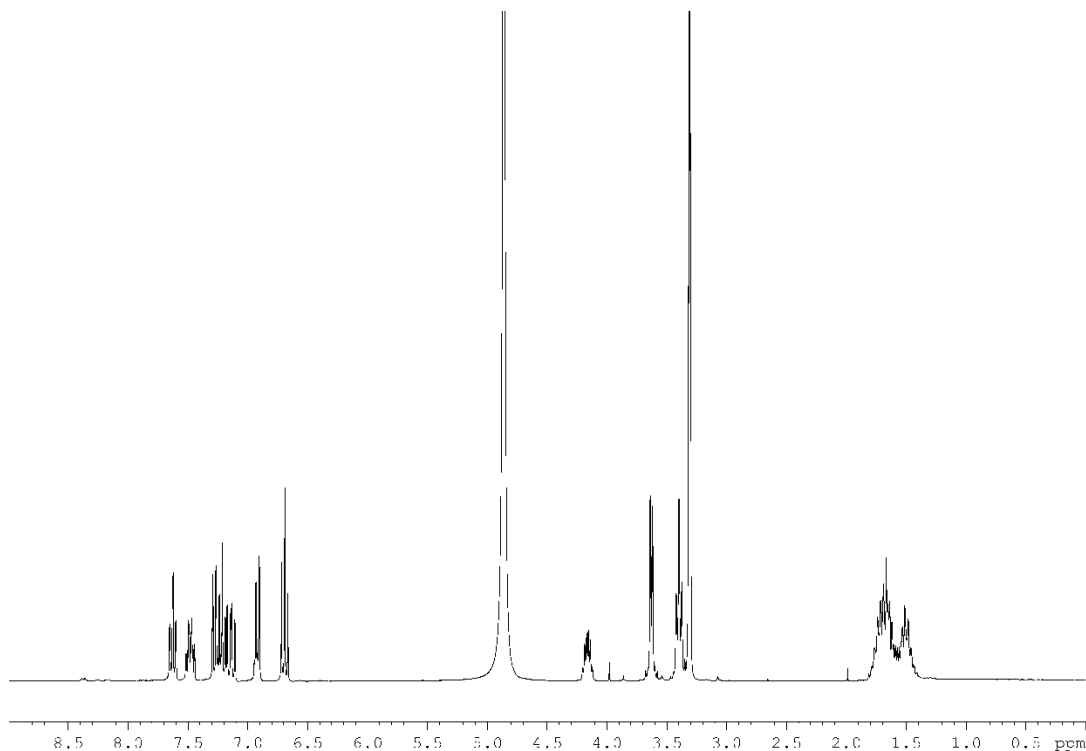


Abbildung A39: ^1H -NMR-Spektrum von Myxochelin J9 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

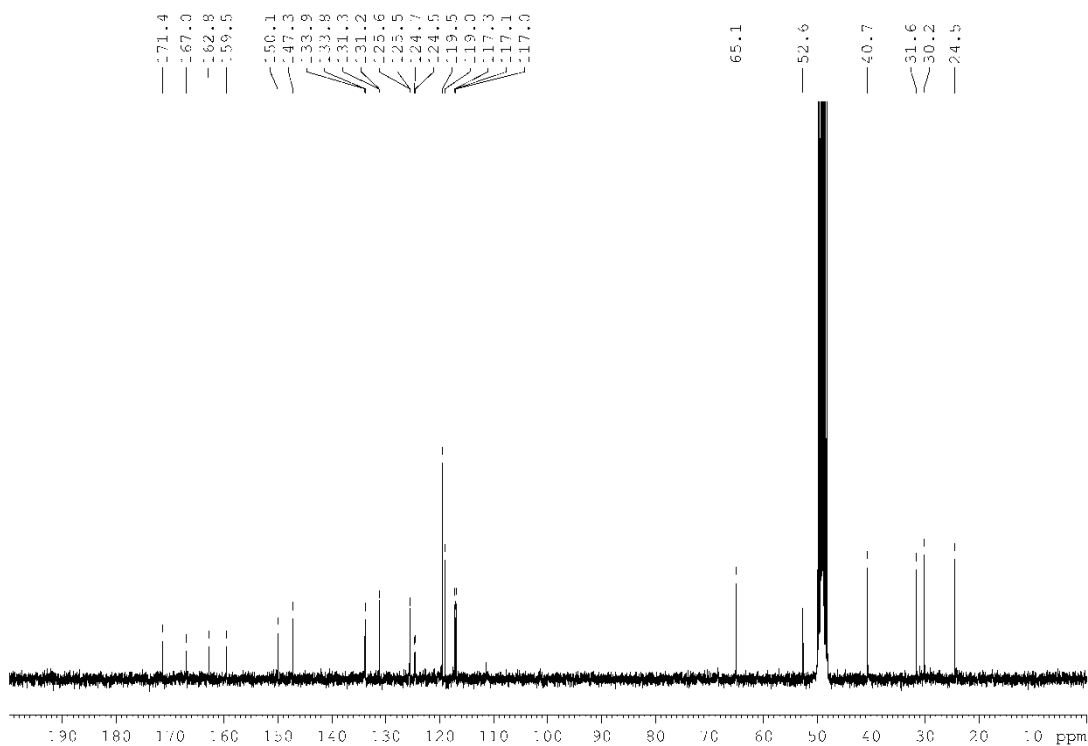


Abbildung A40: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J9 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

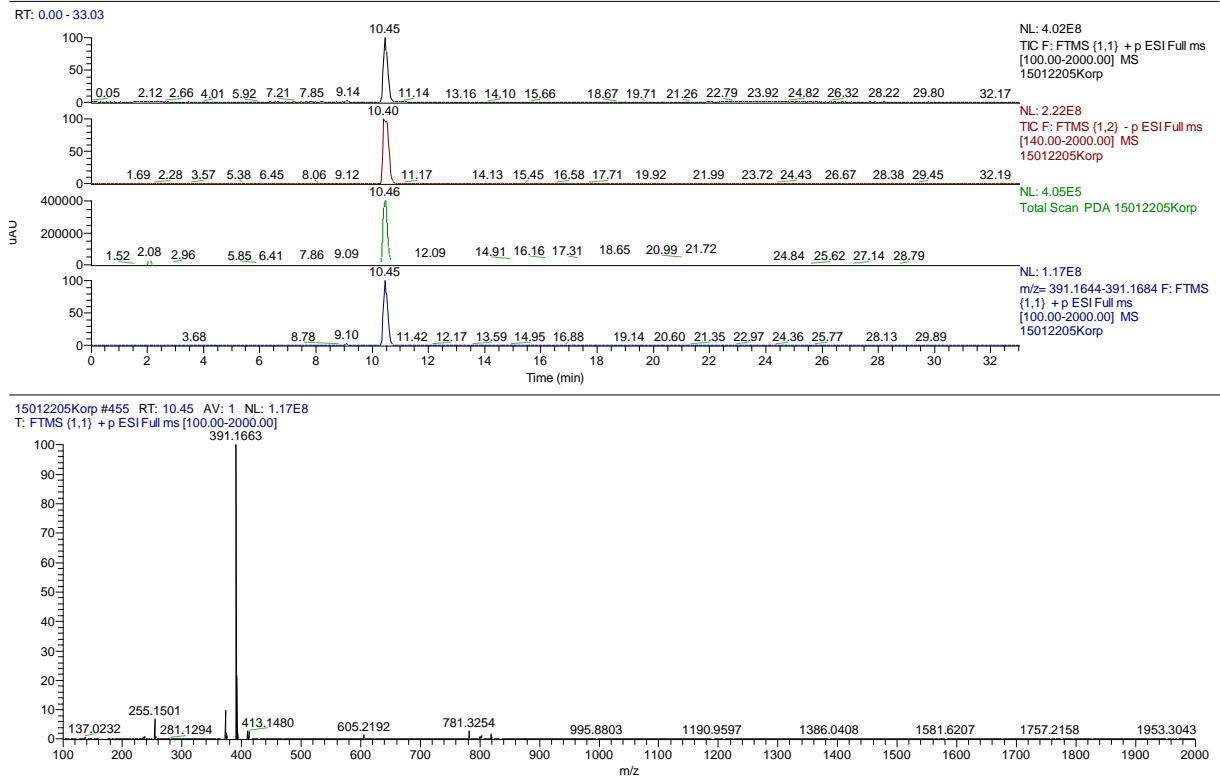


Abbildung A41: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J10. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

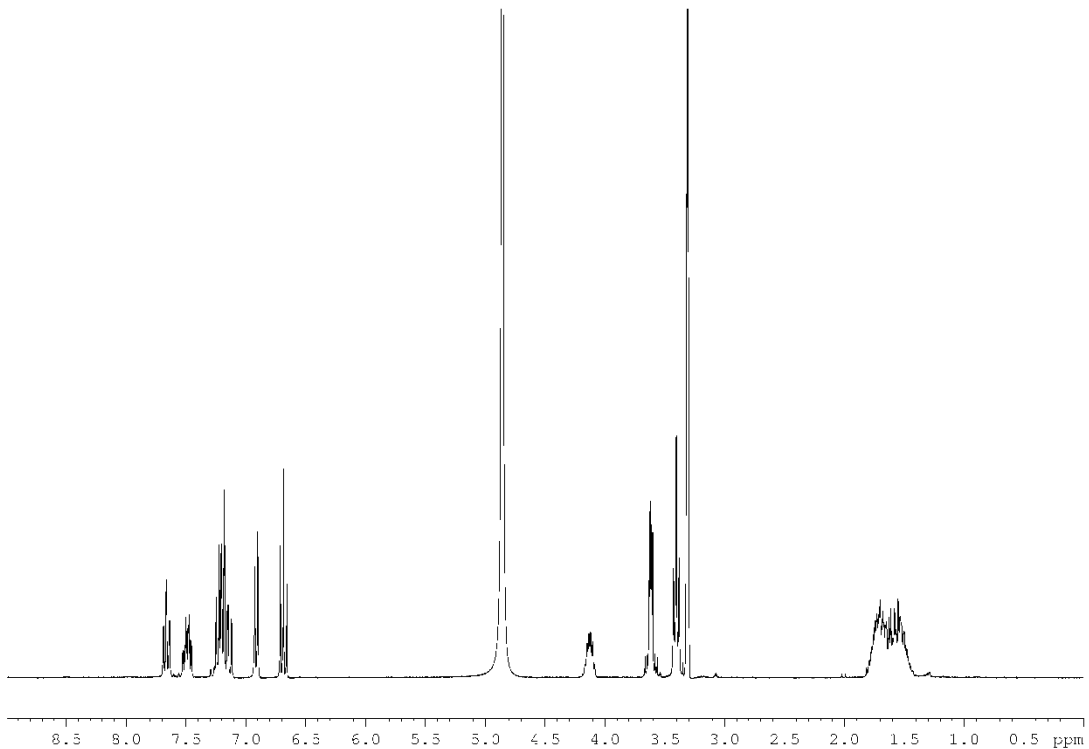


Abbildung A42: ¹H-NMR-Spektrum von Myxochelin J10 in Methanol-*d*₄. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

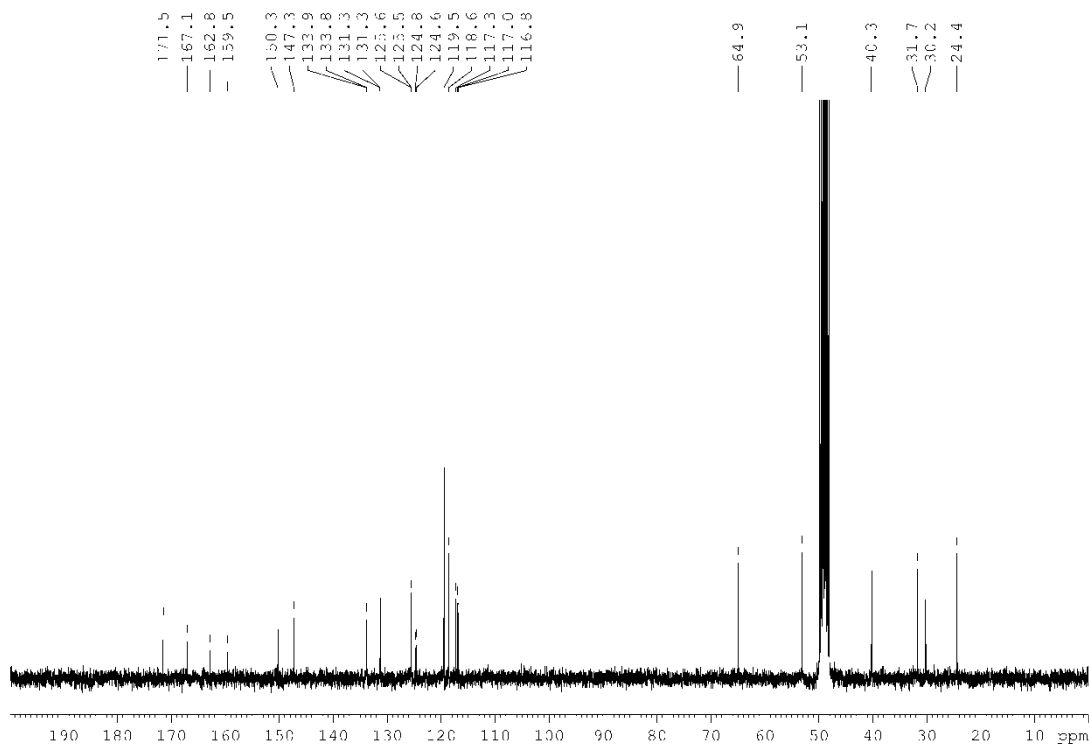
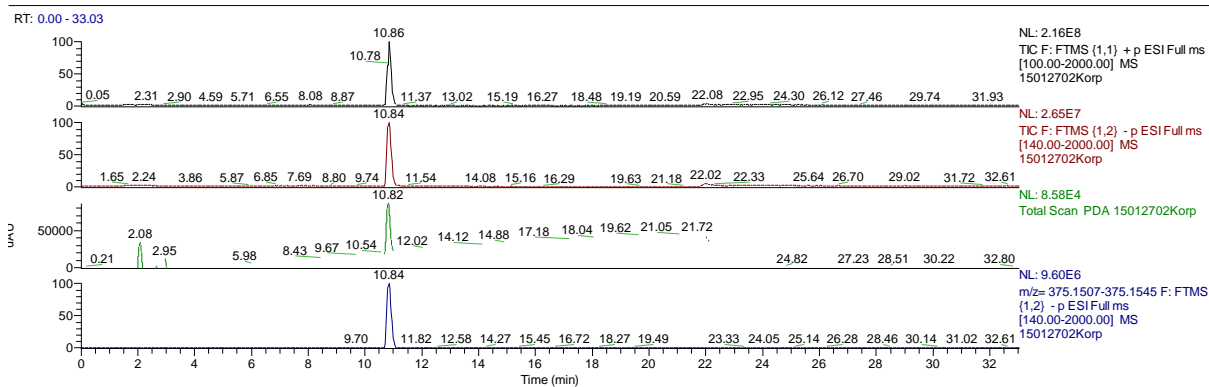


Abbildung A43: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J10 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶



15012702Korp #468 RT: 10.84 AV: 1 NL: 9.59E6
T: FTMS (1,2) -p ESI Full ms [140.00-2000.00]

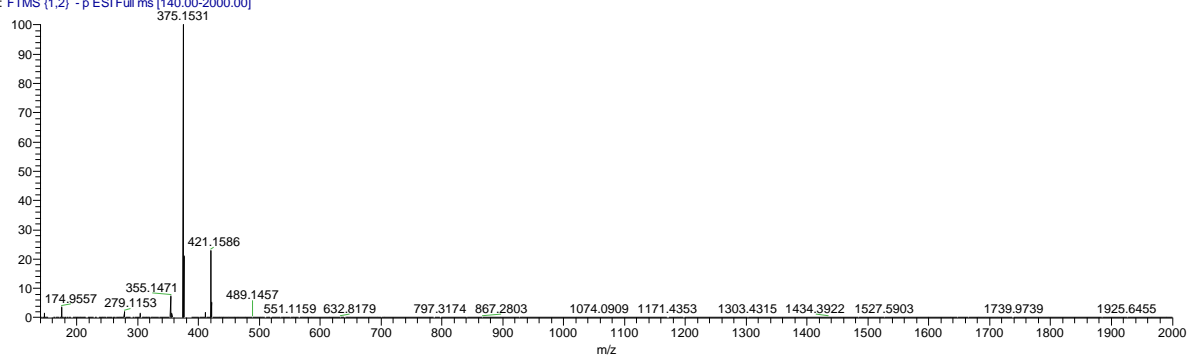


Abbildung A44: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J11. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang
5.1 Abbildungen

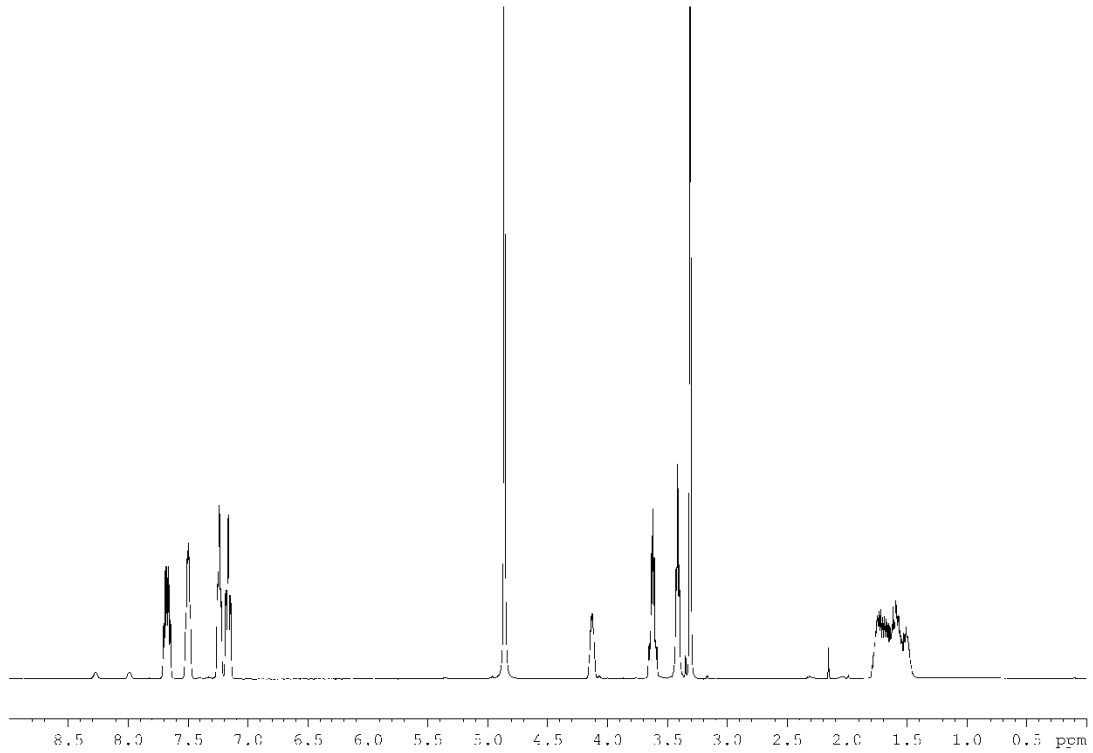


Abbildung A45: ^1H -NMR-Spektrum von Myxochelin J11 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

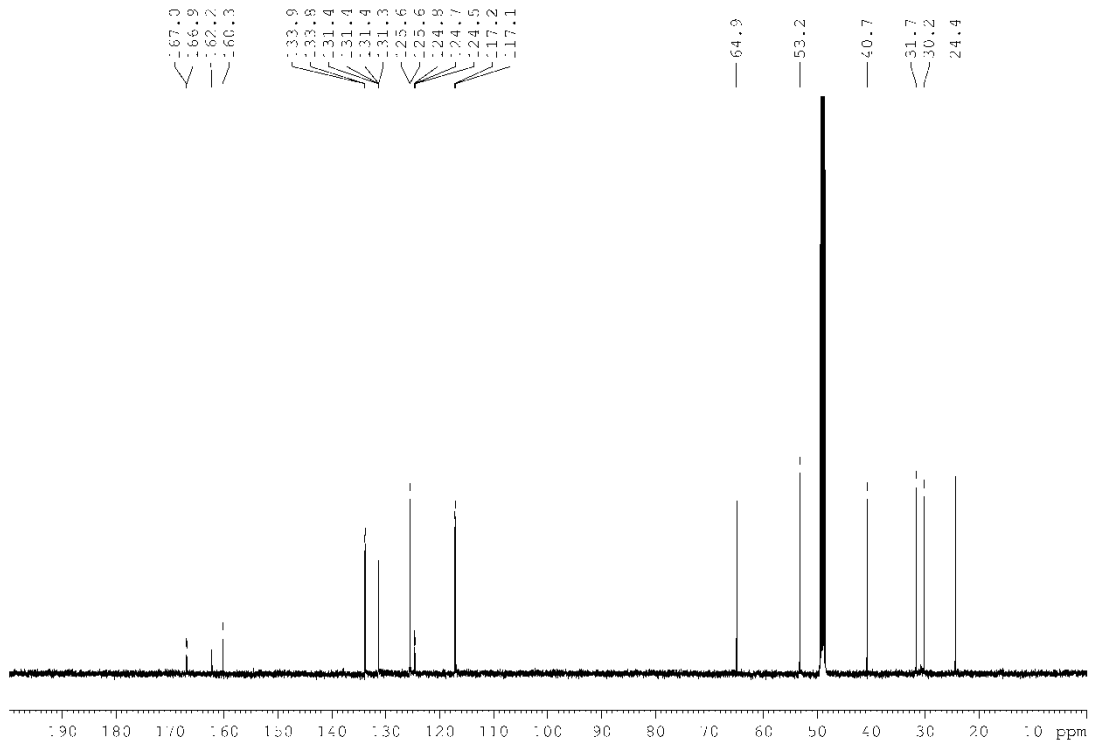


Abbildung A46: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J11 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

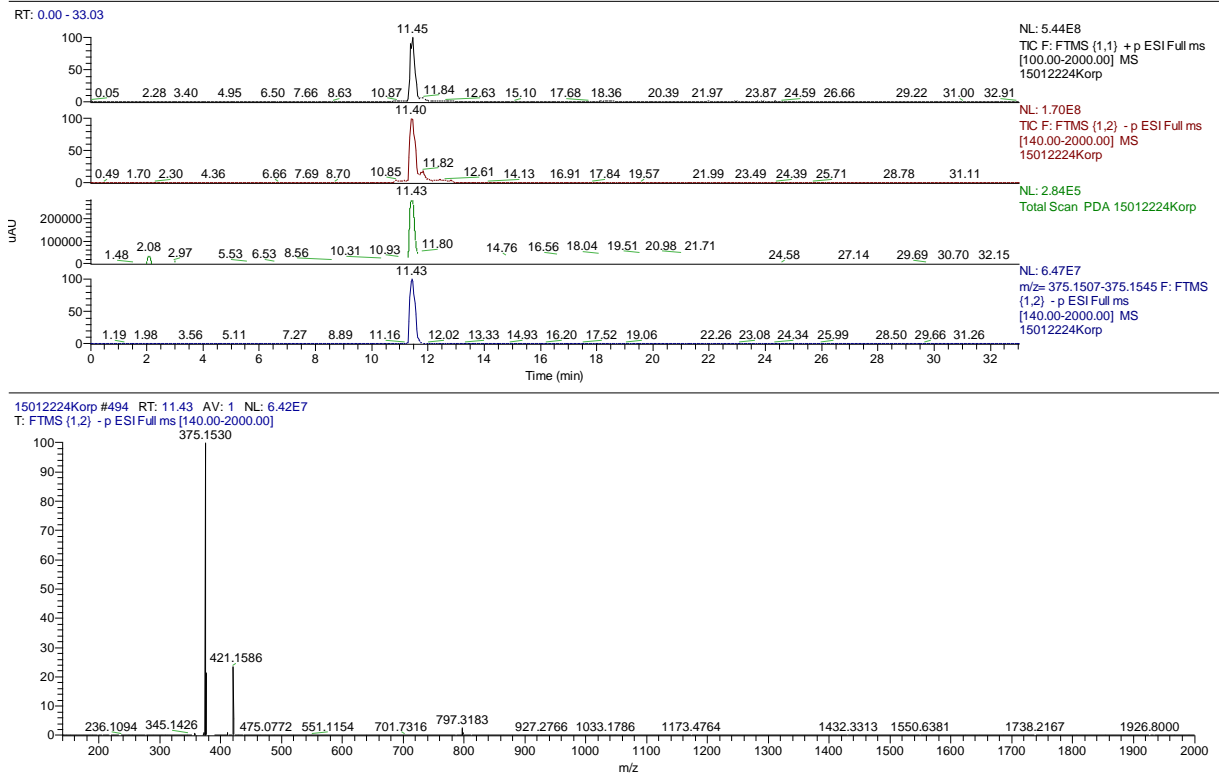


Abbildung A47: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J12. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

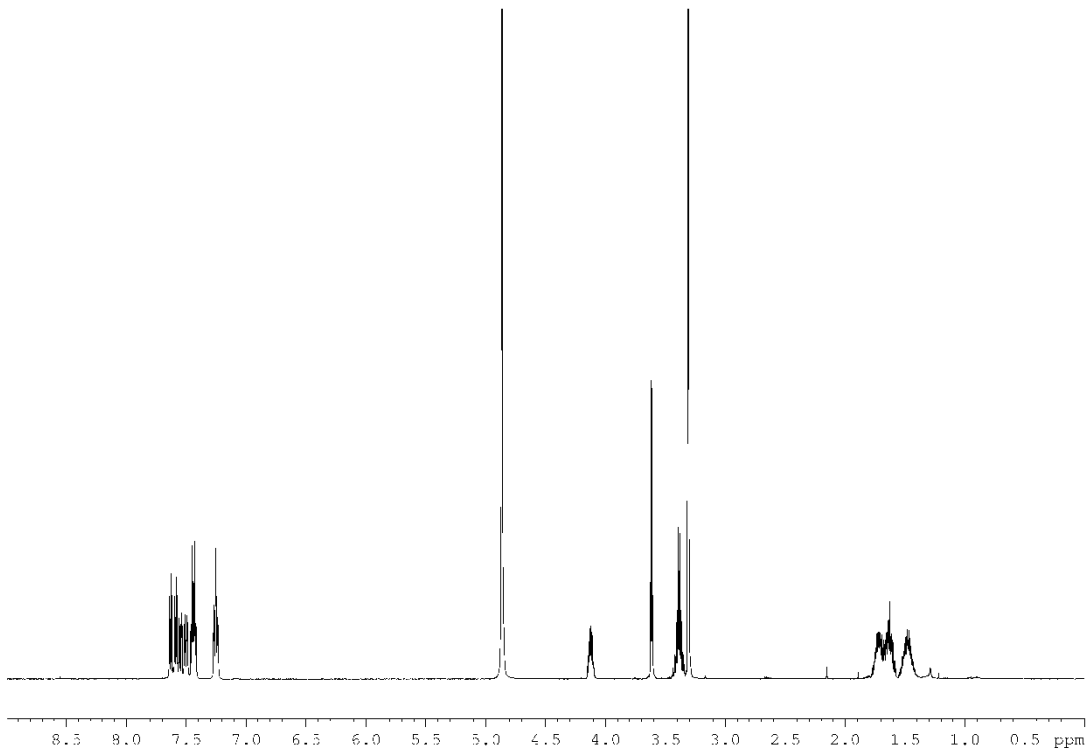


Abbildung A48: ¹H-NMR-Spektrum von Myxochelin J12 in Methanol-*d*₄. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

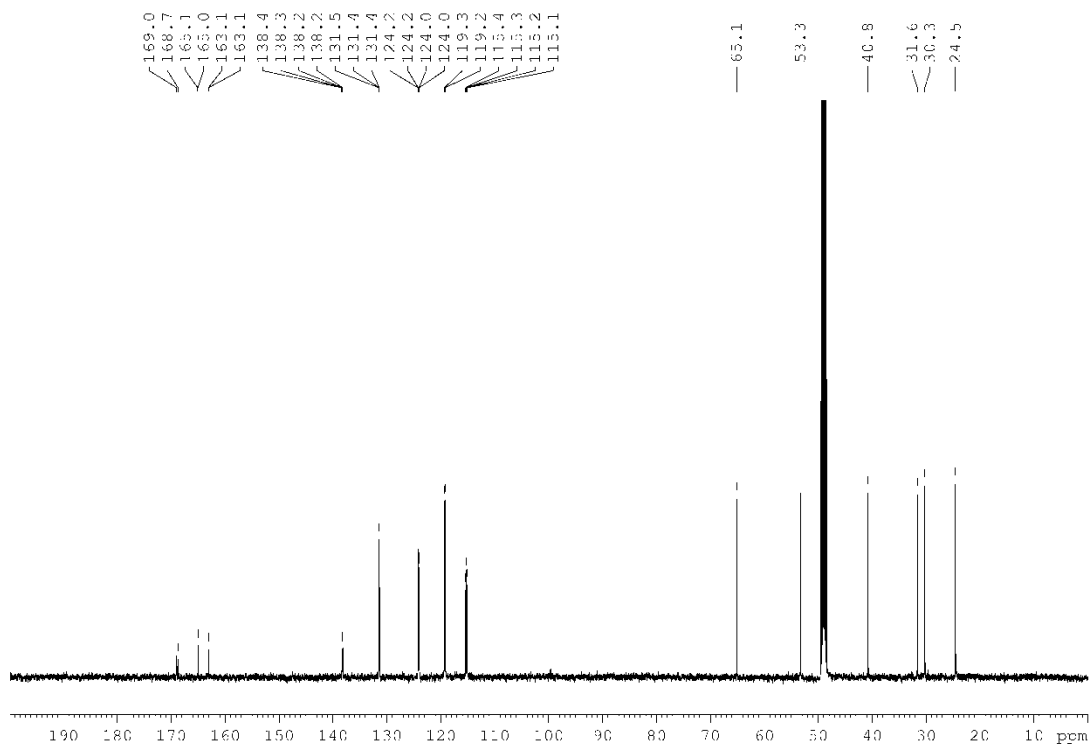


Abbildung A49: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J12 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

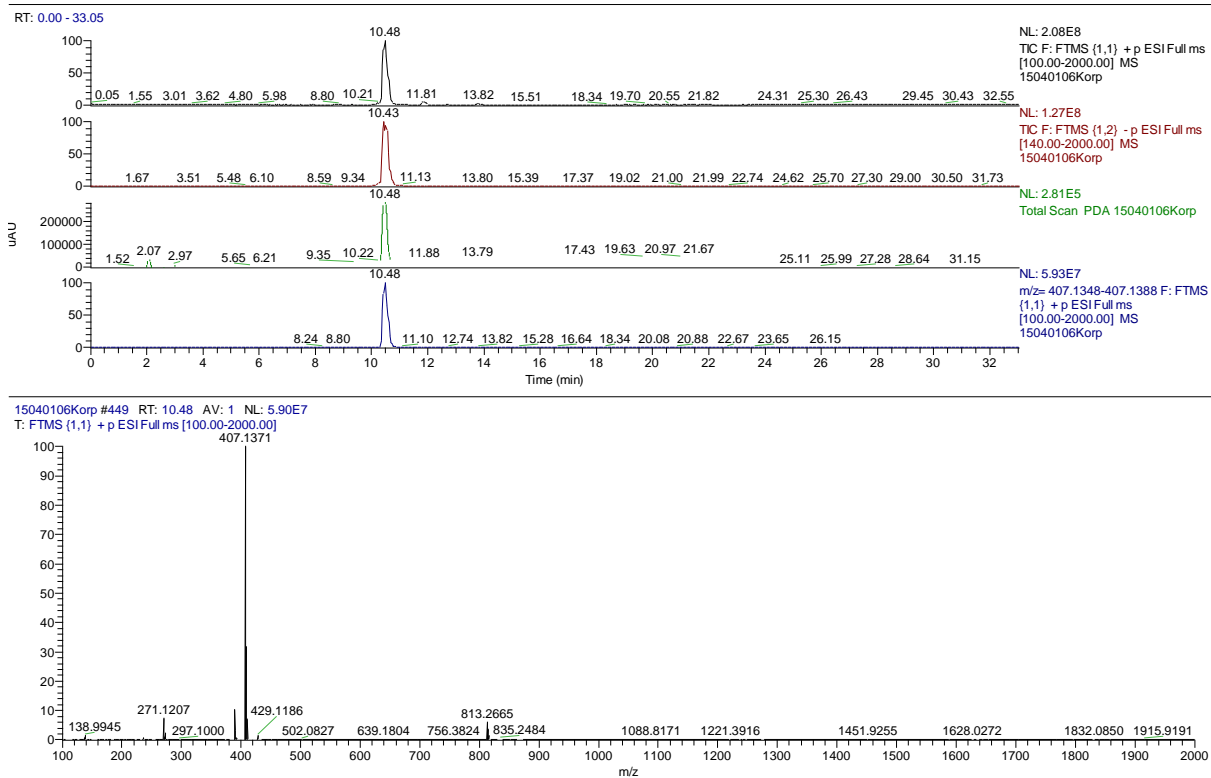


Abbildung A50: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J13. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang
5.1 Abbildungen

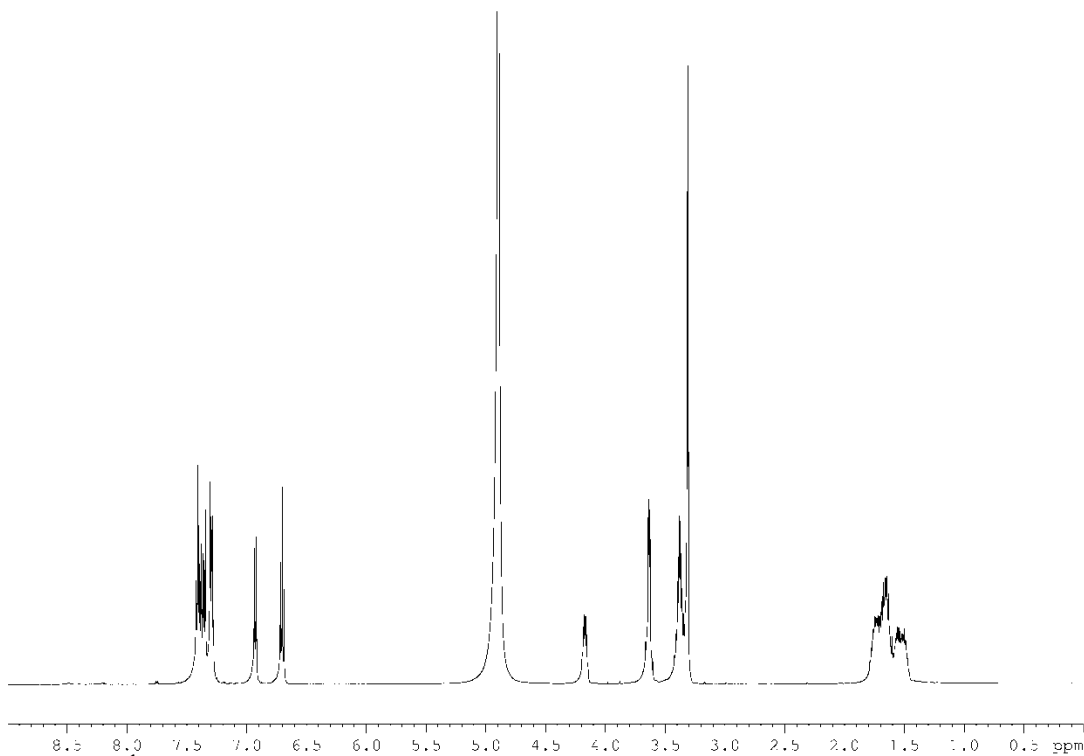


Abbildung A51: ^1H -NMR Spektrum von Myxochelin J13 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

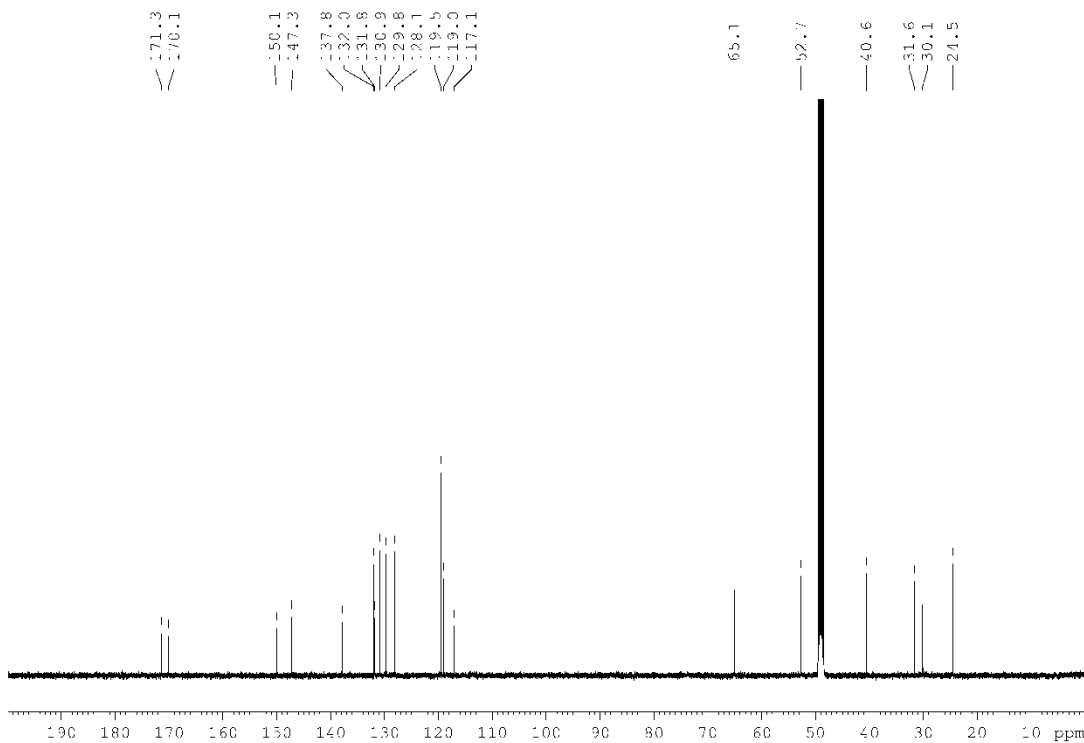


Abbildung A52: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J13 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

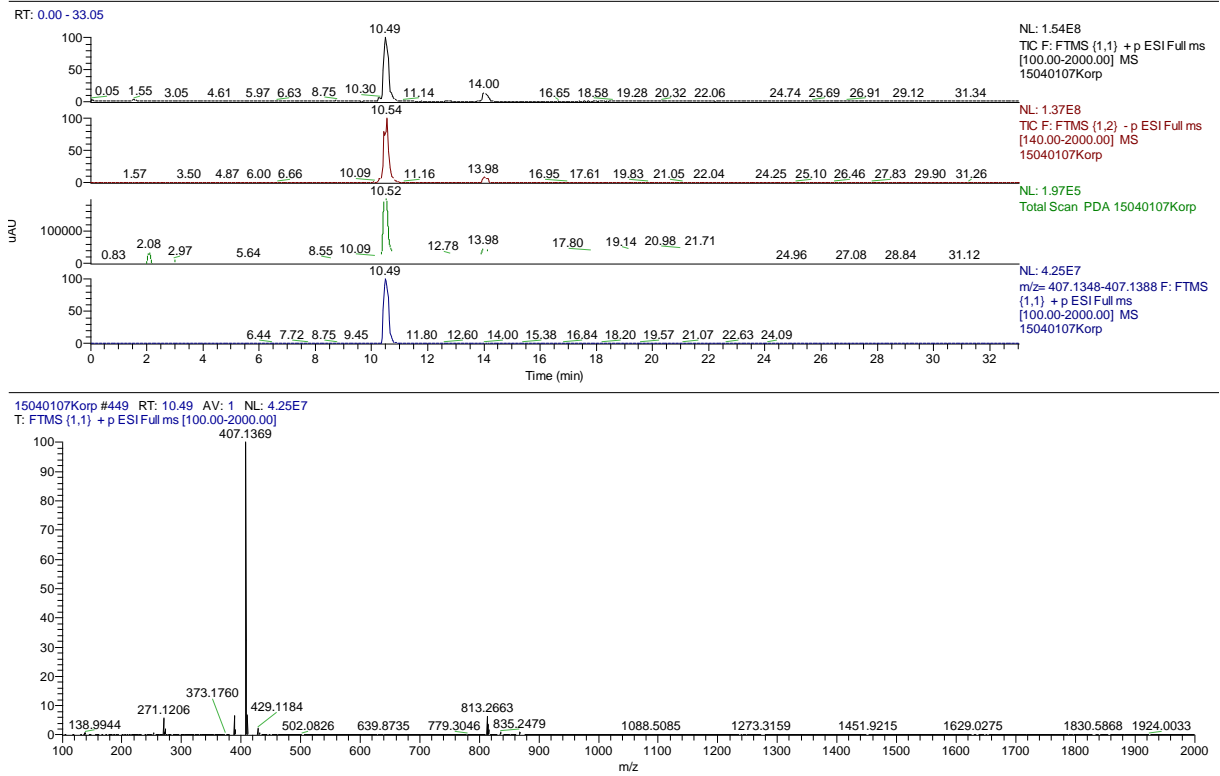


Abbildung A53: HR-ESI-MS-Spektrum von Myxochelin J14. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

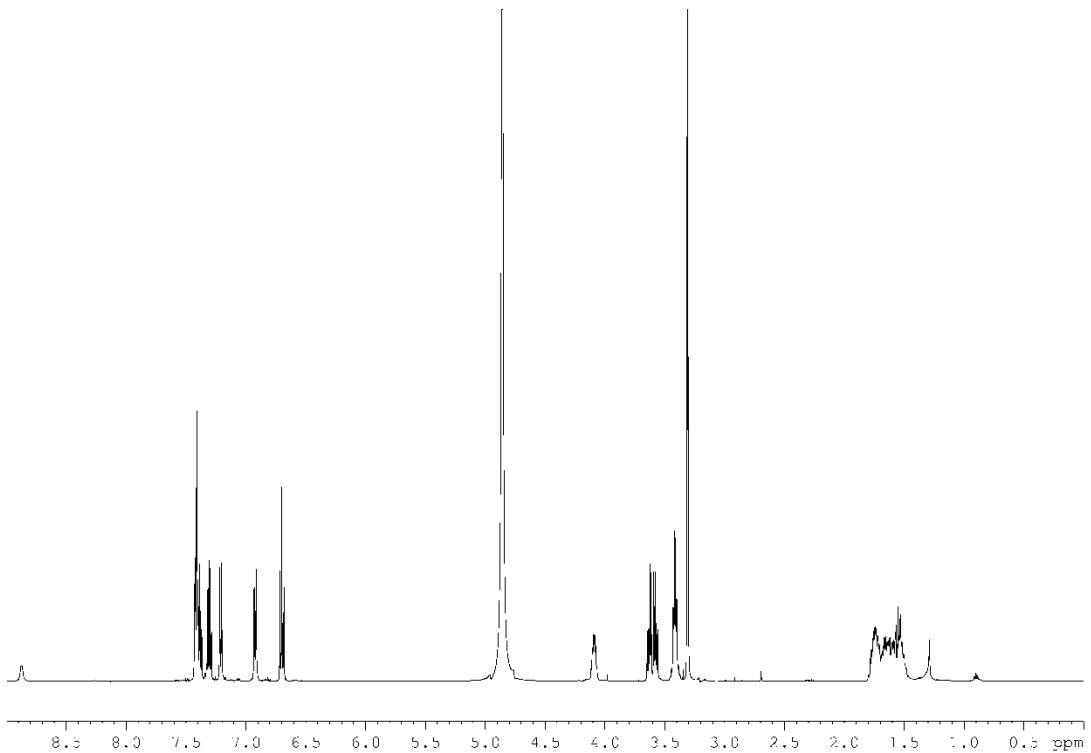


Abbildung A54: ¹H-NMR-Spektrum von Myxochelin J14 in Methanol-*d*₄. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang
5.1 Abbildungen

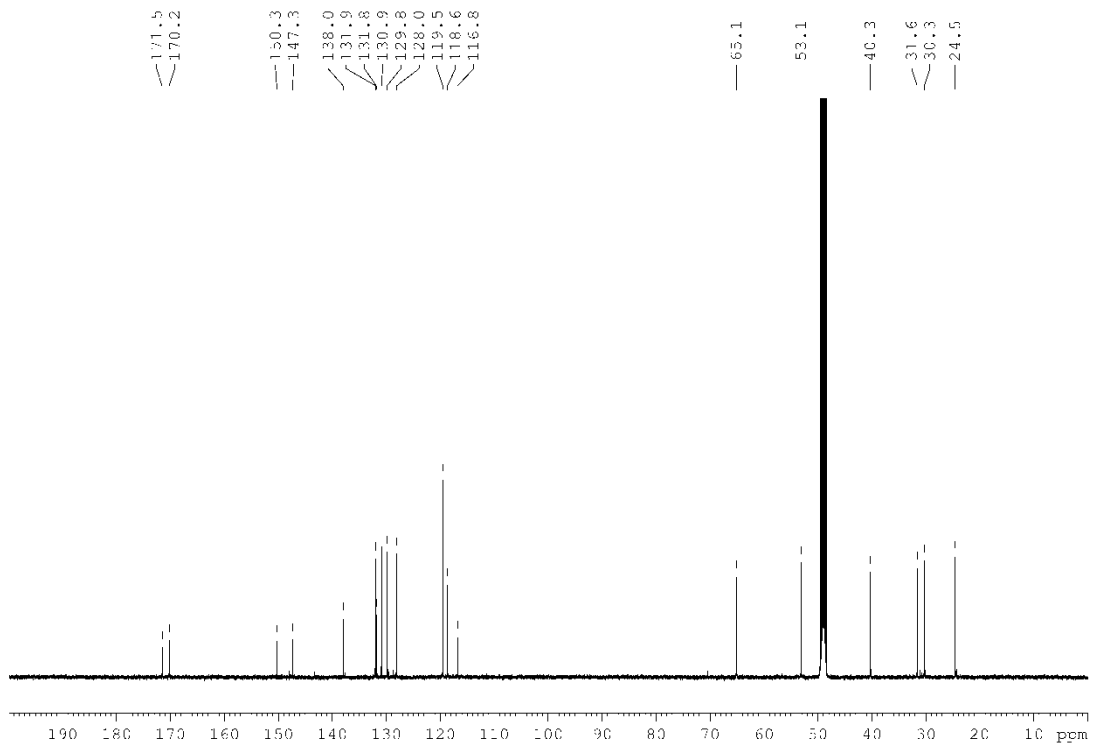


Abbildung A55: ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Myxochelin J14 in Methanol- d_4 . Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

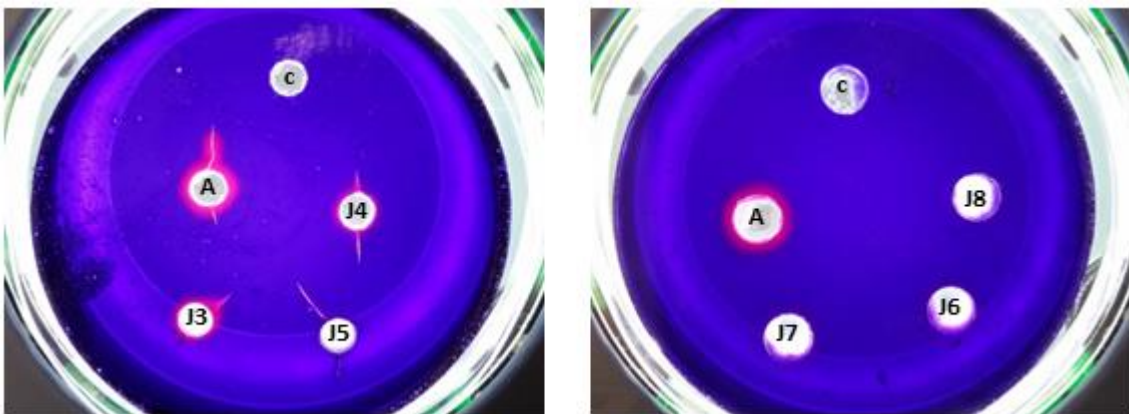


Abbildung A56: Chromazurol S (CAS)-Assay mit Myxochelin A (**A**) und den Myxochelin-Derivaten **J3 bis J8**. Als Negativkontrolle diente Methanol (**c**). Für die Testung wurden 200 μg von jeder Verbindung, gelöst in Methanol, aufgetragen. Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2015 entnommen.²²⁶

Anhang 5.1 Abbildungen

A		H H		H		D	
YP_206411.1	DIIDCAPALVTPGFIDCHTH		74	AALNHGLRIKGTAEQLSN--	248	IATDENPGTS-----EIASL	328
YP_002346959.1	RQVVYEGGLTPGLIDCHTH		74	AAQKAGLPVKLHAEQLSA--	248	IASEANPGTS-----EVLSL	328
YP_854906.1	HWQDMKGLVTPGLIDCHTH		100	AADQYGLAVKGMDDQLSN--	274	VSSDINPGTA-----EIVSL	354
YP_002406717.1	EEHDLQGKLLTPGLVDCHTH		84	KAQSYGLPVKLEAEQLSD--	257	ISTDENPGTS-----ENMSL	337
AAG08477.1	ERIDLGCWLTTPGLIDCHTH		68	ARETGLPVKLEAEQLSS--	242	IASEINPGTS-----EALS	322
2BB0	EIIDCSGRLVTPGLVDPHTH		82	KAAEAGFGPKHAEDEIDP--	255	IATDENPGSS-----ETENI	335
2GOK	ETTDCGGRWTFALIDCHTH		88	AAQQRGLPVKLEAEQLSN--	262	IATDENPGTS-----ELTSL	342
WP_045965770.1 (MxcM)	QRIDGQKLMPLGLINPHWH	* *	111	IAQQYQVPYATHIAPLKNER	290	SSTDCDISEIGGMCEAMRGA	390

B		H H		H		D	
WP_051422298.1 (CbxE)	VMPGEVNNHWHTEFAVRLPF		81	GVPFATHVGA LRHEALAVRA	261	TGLIPELRFSGLDVSI	341
WP_031508998.1	ILPGEVNPHWHTEFAMRFPF		83	DVPFATHVGA LRNBAEVMLA	263	TRLFPEERFAGLDVSI	343
WP_045965770.1 (MxcM)	MLPGLINPHWHSEFVAPN--	* *	118	QVPYATHIAELKNERAEVER	295	TGQIGRFKDGWVVS	375

Abbildung A57: Vergleich der Proteinsequenz von MxcM aus *P. piscicida* S2040 mit ausgewählten Sequenzen von Imidazolnpropionasen **(A)** oder der Amidohydrolase CbxE und einem verwandten Protein **(B)**. Die konservierten Histidin (H)- und Asparaginsäure (D)-Reste, die mutmaßlich an der Bindung des katalytisch relevanten Metall-Ions involviert sind, wurden hervorgehoben. Dabei dienten die HutI-Sequenzen aus *B. subtilis* (PDB: 2BB0) und *A. tumefaciens* (PDB: 2GOK) als Vorlagen.²³⁶⁻²³⁸ Katalytisch aktive Aminosäuren, die in allen untersuchten Sequenzen auftraten, wurden mit einem Stern markiert. Die Daten für diesen Sequenzvergleich stammen aus Tabelle A1 und A2 (Anhang). Die Abbildung wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2018 entnommen.²⁴⁴

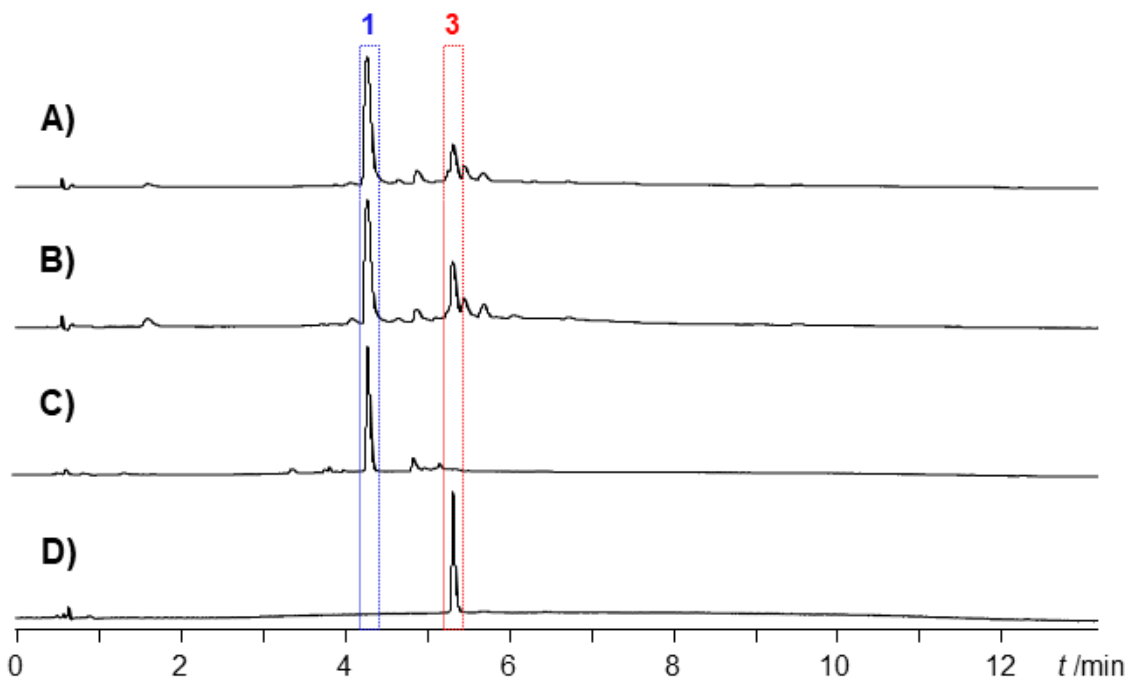


Abbildung A58: Metabolisches Profil vom *M. xanthus* DSM16526-Wildtyp in CTPM-Medium **(A)** unsupplementiert und **(B)** nach Zugabe von CuSO₄ (115 µM). Als Referenz dienen Myxochelin B **(1, C)** und eine Myxochelin A **(3, D)**. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm aufgenommen.

Anhang 5.1 Abbildungen

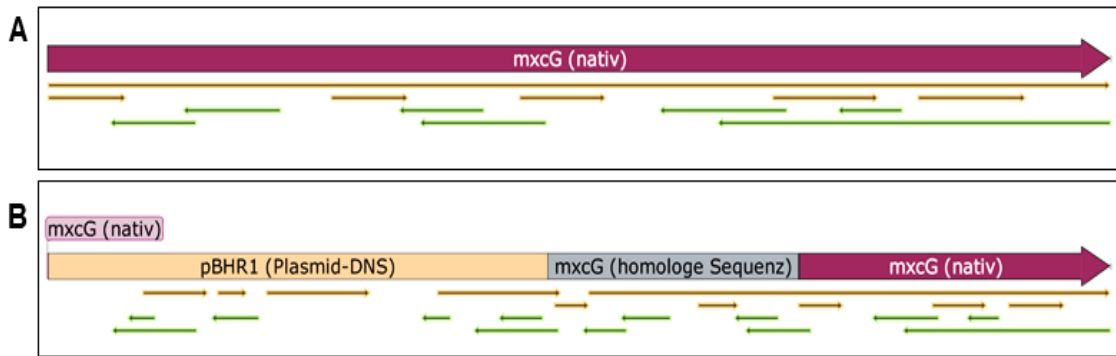


Abbildung A59: Vergleich der offenen Leserahmen des nativen *mxcG*-Gens im *M. xanthus* DSM16526-Wildtyp (A) und des disruptierten *mxcG*-Gens nach Integration des Vektors pJK7 (B). Der breite obere Pfeil repräsentiert die genomische DNA-Sequenz. Die Leserahmen sind durch orangefarbene und grüne Pfeile darunter dargestellt. Da sich die Integration des Plasmids pJK7 mutmaßlich gemäß Variante II ereignet hat (siehe Abb. 20B, S. 67), wird an dieser Stelle lediglich diese Möglichkeit abgebildet.

AAG31130.1	M	R	D	S	C	E	T	R	R	P	L	S	A	A	C	H	G	I	W	L	G	Q	F	D	L	K	S	E	V	N	A	G	E	C	I	E	T	C	G	E	V	D	P	A	L	F	E	A	V	R	C	A	V	R	E	A	E	A	L	E	V	R	F	V	A	S	E	B	G	E	C	L	L	G	L	Q	T	E	W	V	L	E	H	A	L	S	E	S	P	D	P	W	A	A	V	100	
SDX92451.1	M	G	E	T	H	E	A	G	W	P	L	S	A	A	C	H	G	I	W	L	G	Q	F	D	L	K	S	E	V	N	A	G	E	C	I	E	T	C	G	E	V	D	P	A	L	F	E	A	V	R	C	A	V	R	E	A	E	A	L	E	V	R	F	V	A	S	E	B	G	E	C	L	L	G	L	Q	T	E	W	V	L	E	H	A	L	S	E	S	P	D	P	W	A	A	V	100	
Mutante	-----																																													0																																																			
AAG31130.1	C	A	W	M	R	D	L	A	C	T	V	D	L	S	R	G	P	L	E	E	A	L	F	K	A	A	P	D	R	F	W	Y	Q	F	H	H	I	A	M	D	G	F	G	F	S	L	L	A	R	R	V	A	E	V	Y	T	L	A	A	G	R	E	L	T	G	G	F	G	S	F	Q	A	V	L	D	E	V	A	Y	R	N	G	E	C	H	E	L	D	R	T	E	W	D	E	200		
SDX92451.1	C	I	W	M	H	E	D	L	A	R	T	V	D	L	S	R	G	P	L	E	E	A	L	F	K	A	A	P	D	R	F	W	Y	Q	F	H	H	I	A	M	D	G	F	G	F	S	L	L	A	R	R	V	A	E	V	Y	T	L	A	A	G	R	E	L	T	G	G	F	G	S	I	R	A	V	I	D	E	V	A	Y	C	G	V	Q	H	A	N	D	E	A	F	W	V	E	200		
Mutante	--	M	H	E	D	L	A	R	T	V	D	L	S	R	G	P	L	E	E	A	L	F	K	A	A	P	D	R	F	W	Y	Q	F	H	H	I	A	M	D	G	F	G	F	S	L	L	A	R	R	V	A	E	V	Y	T	L	A	A	G	R	E	L	T	G	G	F	G	S	I	R	A	V	I	D	E	V	A	Y	C	G	V	Q	H	A	N	D	E	A	F	W	V	E	97				
AAG31130.1	R	F	E	G	P	T	F	V	T	L	A	E	P	A	P	M	T	R	F	V	R	O	T	R	H	I	S	P	A	L	E	R	M	O	A	A	R	C	A	G	L	T	W	P	D	L	V	L	A	A	T	P	A	W	L	H	C	H	G	E	F	E	I	V	L	G	L	P	V	M	A	R	L	G	S	A	A	I	R	V	P	C	M	A	M	N	I	V	P	L	R	V	E	V	S	300	
SDX92451.1	R	F	E	G	P	T	F	V	T	L	A	E	P	A	P	M	T	R	F	V	R	O	T	R	H	I	S	P	A	L	E	R	M	O	A	A	R	C	A	G	L	T	W	P	D	L	V	L	A	A	T	P	A	W	L	H	C	H	G	E	F	E	I	V	L	G	L	P	V	M	A	R	L	G	S	A	A	I	R	V	P	C	M	A	M	N	I	V	P	L	R	V	E	V	S	300	
Mutante	R	F	E	G	P	T	F	V	T	L	A	E	P	A	P	M	T	R	F	V	R	O	T	R	H	I	S	P	A	L	E	R	M	O	A	A	R	C	A	G	L	T	W	P	D	L	V	L	A	A	T	P	A	W	L	H	C	H	G	E	F	E	I	V	L	G	L	P	V	M	A	R	L	G	S	A	A	I	R	V	P	C	M	A	M	N	I	V	P	L	R	V	E	V	S	197	
AAG31130.1	P	P	A	S	L	I	L	A	R	G	I	A	A	E	V	R	A	M	R	H	L	R	Y	R	Y	E	C	L	R	R	D	L	R	V	G	G	O	R	R	L	F	G	P	V	V	N	I	M	P	F	D	Y	A	L	R	F	A	G	M	E	F	A	H	N	L	S	A	G	P	V	E	D	L	S	I	G	L	Y	A	R	D	G	K	G	L	R	V	D	F	D	A	N	P	A	C	400	
SDX92451.1	P	D	A	C	L	E	F	M	A	R	D	V	A	A	E	L	R	A	M	R	H	L	R	Y	R	Y	E	C	L	R	R	D	L	R	V	G	G	O	R	R	L	F	G	P	V	V	N	I	M	P	F	D	Y	A	L	R	F	A	G	M	E	F	A	H	N	L	S	A	G	P	V	E	D	L	S	I	G	L	Y	A	R	D	G	K	G	L	R	V	D	F	D	A	N	P	A	C	400
Mutante	P	D	A	C	L	E	F	M	A	R	D	V	A	A	E	L	R	A	M	R	H	L	R	Y	R	Y	E	C	L	R	R	D	L	R	V	G	G	O	R	R	L	F	G	P	V	V	N	I	M	P	F	D	Y	A	L	R	F	A	G	M	E	F	A	H	N	L	S	A	G	P	V	E	D	L	S	I	G	L	Y	A	R	D	G	K	G	L	R	V	D	F	D	A	N	P	A	C	297

Abbildung A60: Die Core-Sequenzen der C-Domäne aus der NRPS MxcG von *S. aurantiaca* Sg a15 (Protein-Zugangsnummer: AAG31130),¹⁶³ *M. xanthus* DSM16526 (Protein-Zugangsnummer: SDX92451), und der *mxcG*-Disruptionsmutante. Gelb: Core-Sequenz 1. Grün: Core-Sequenz 2. Blau: Core-Sequenz 3. Lila: Core-Sequenz 4. Rot: Core-Sequenz 5. Schwarz: Core-Sequenz 6.

Anhang 5.1 Abbildungen

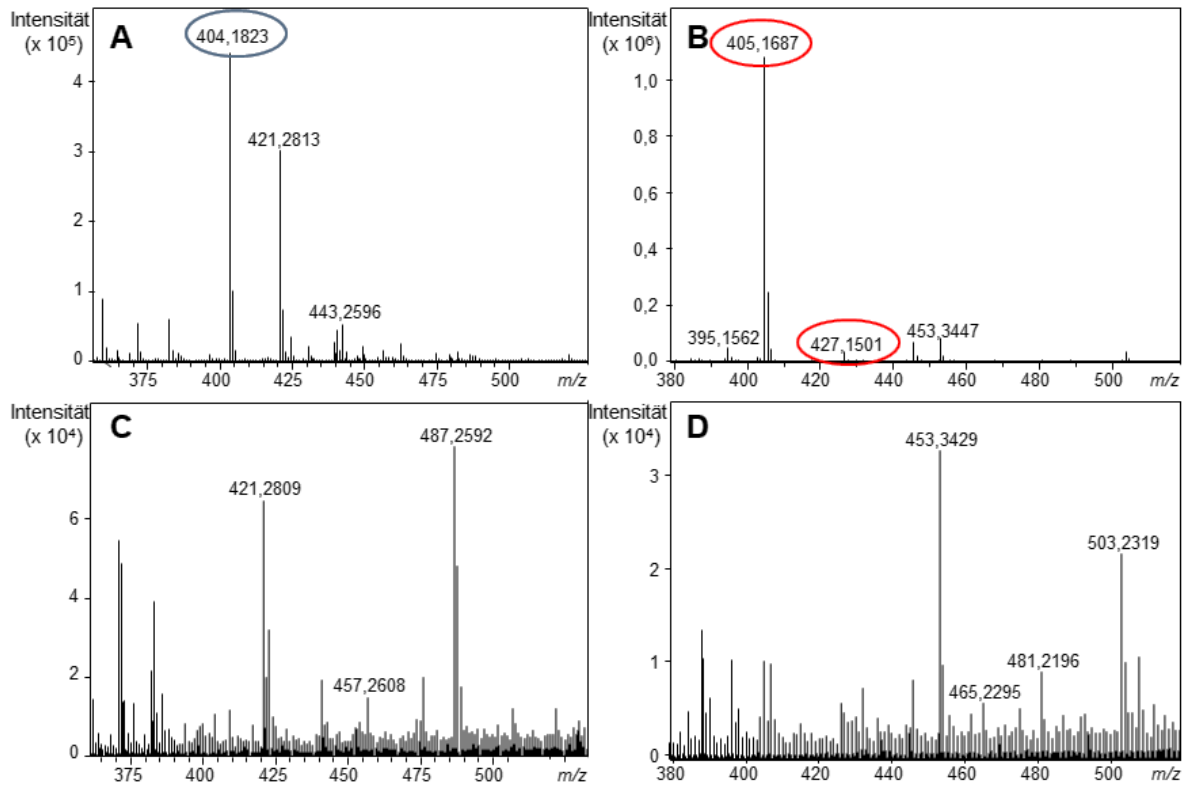


Abbildung A61: MS⁺-Spektrum vom *M. xanthus* DSM16526-Wildtyp (A), (B) und der *mxCG*-Disruptionsmutante (C), (D), aufgenommen bei einer Retentionszeit typisch für Myxochelin B (4,3-4,4 min) (A), (C), sowie für Myxochelin A (5,3-5,4 min) (B), (D). Die Masse für Myxochelin B (m/z 404,1816 [M+H]⁺_{berechnet}) ist blau und jene für Myxochelin A (m/z 405,1656 [M+H]⁺_{berechnet}; 427,1476 [M+Na]⁺_{berechnet}) rot markiert.

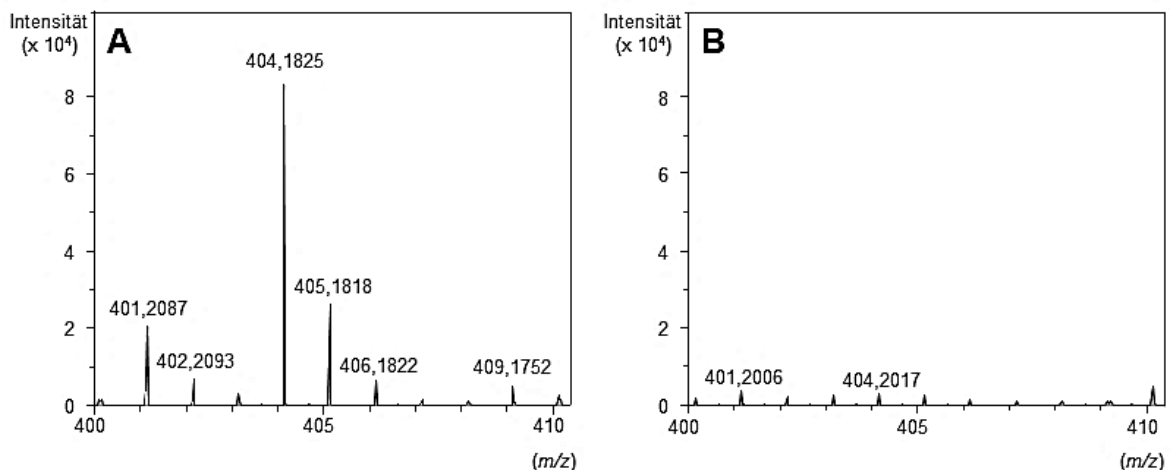


Abbildung A62: MS⁺-Spektrum vom *M. xanthus* DSM16526-Wildtyp (A) und der *mxCG*-Disruptionsmutante (B), aufgenommen zwischen 0 bis 8 Minuten Retentionszeit. Die x-Achsen wurden auf einen m/z -Bereich von 400 bis 410 beschränkt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der beiden Spektren wurden die y-Achsen einheitlich skaliert. Myxochelin B: m/z 404,1816 [M+H]⁺_{berechnet}. Myxochelin A: m/z 405,1656 [M+H]⁺_{berechnet}.

5.2 Tabellen

Tabelle A1: Vergleichende Analyse von HutI-Proteinsequenzen mit MxcM aus *P. piscicida* S2040.

Bakterium	Protein ID (Größe [AS])	Mögliche Metall- bindende Einheiten	MxcM	
			% Id	% Qc
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC7966	YP_854906 (434)	H98, H100, H268, D343 Q271	24	87
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain C58 (ATCC33970)	PDB: 2GOK (429)	H86, H88, H256, D331 Q259	23	82
<i>Bacillus subtilis</i> strain 168	PDB: 2BB0 (421)	H80, H82, H249, D324 E252	24	85
<i>Escherichia coli</i> IAI39	YP_002406717 (414)	H82, H84, H251, D326 Q254	26	47
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	AAG08477 (402)	H66, H68, H236, D311 Q239	28	89
<i>Vibrio fischeri</i> ES114	YP_206411 (408)	H72, H74, H242, D317 Q245	37	34
<i>Yersinia pestis</i> CO92	YP_002346959 (406)	H72, H74, H242, D317 Q245	24	85

H: Histidin; D: Asparaginsäure; E: Glutaminsäure; Q: Glutamin; % Id: identische Aminosäuren in %; % Qc: Sequenzabdeckung in %. Die Tabelle wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2018 entnommen.²⁴⁴

Tabelle A2: Vergleichende Analyse der Amidohydrolase CbxE aus *Streptomyces* sp. NTK937 (WP_051422298)²³⁹ und einem nah verwandten Protein (WP_031508998) mit MxcM aus *P. piscicida* S2040.

	Protein ID (Größe [AS])	Mögliche Metall-bindende Einheiten	MxcM	
			% Id	% Qc
<i>Streptomyces</i> sp. NTK937	WP_051422298 (499)	H70, H72, H248, D340	39	89
<i>Streptomyces</i> <i>megasporus</i>	WP_031508998 (514)	H72, H74, H250, D341	42	90

H: Histidin; D: Asparaginsäure; E: Glutaminsäure; Q: Glutamin; % Id: identische Aminosäuren in %; % Qc: Sequenzabdeckung in %. Die Tabelle wurde dem Artikel Korp *et al.*, 2018 entnommen.²⁴⁴

Anhang 5.2 Tabellen

Tabelle A3: Nachweis über das Vorhandensein von freiem Plasmid pJK3 in den Zellen des *M. xanthus*-Expressionsstamms.

PCR-Produkt	pJK3	
	Position der Übereinstimmung (nt)	% Id
Ziel: <i>aphII</i> , Teilsequenz	956 ... 1661	99
Ziel : <i>rep</i> (pMF1), Teilsequenz	2012 ... 2876	100
Ziel : <i>rep</i> (pBR332) und <i>bla</i> , Teilsequenz	6905 ... 8069	99

% Id: identische Nukleotide in %

Tabelle A4: Vergleich der MxcG-Sequenz aus dem *M. xanthus* DSM16526-Wildtyp (GenBank: SDX92451) und der Disruptionsmutante.

MxcG (nativ)				
Größe	C-Domäne	A-Domäne	PCP-Domäne	Red-Domäne
1446 AS	6 ... 431 ^{1a}	427 ... 960 ^{1a}	969 ... 1033 ^{1a}	1050 ... 1431 ^{1a}
	5 ... 434 ^{1b}	456 ... 942 ^{1b}	969 ... 1033 ^{1b}	1079 ... 1313 ^{1b}
MxcG (Disruptionsmutante)				
1343 AS ^c	n.d. ^{1a}	324 ... 857 ^{1a}	866 ... 930 ^{1a}	947 ... 1328 ^{1a}
	1 ... 331 ^{1b}	353 ... 839 ^{1b}	866 ... 930 ^{1b}	876 ... 1210 ^{1b}

Die Vorhersagen wurden unter Verwendung von ^{1a}dem PKS/NRPS Predictor und ^{1b}der Pfam-Datenbank erstellt.^{210,211} ^cDie Größe der Aminosäure-Sequenz bezieht sich auf den offenen Leserahmen, der nach der Integration von pJK7 in das *mxcG*-Gen noch intakt war. n.d., nicht detektiert.

5.3 Literaturverzeichnis

- [1] **Reichenbach H.** 2004. The Myxococcales. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, Garrity GM (ed). Springer-Verlag: New York, NY, pp. 1059-1143.
- [2] **Shimkets LJ, Dworkin M, Reichenbach H.** 2006. The myxobacteria. *The Prokaryotes 3rd edn* (release 3.19). Springer-Verlag: New York, NY.
- [3] **Reichenbach H.** 1999. The ecology of the myxobacteria. *Environ Microbiol* **1**:15-21.
- [4] **Dawid W.** 2000. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol Rev* **24**:403-427.
- [5] **Li YZ, Hu W, Zhang YQ, Qiu Zi, Zhang Y, Wu BH.** 2002. A simple method to isolate salt-tolerant myxobacteria from marine samples. *J Microbiol Methods* **50**:205-209.
- [6] **Schäberle TF, Goralski E, Neu E, Erol O, Hölzl G, Dörmann P, Bierbaum G, König GM.** 2010. Marine myxobacteria as a source of antibiotics – comparison of physiology, polyketide-type genes and antibiotic production of three new isolates of *Enhygromyxa salina*. *Mar Drugs* **8**:2466-2479.
- [7] **Dávila-Céspedes A, Hufendiek P, Crüsemann M, Schäberle TF, König GM.** 2016. Marine-derived myxobacteria of the suborder Nannocystineae: an underexplored source of structurally intriguing and biologically active metabolites. *Beilstein J Org Chem* **12**:969-984.
- [8] **Carlson RV, Pacha RE.** 1968. Procedure for the isolation and enumeration of myxobacteria from aquatic habitats. *Appl Microbiol* **16**:795-796.
- [9] **Li SG, Zhou XW, Li PF, Han K, Li W, Li ZF, Wu ZH, Li YZ.** 2012. The existence and diversity of myxobacteria in lake mud – a previously unexplored myxobacteria habitat. *Environ Microbiol Rep* **4**:587-595.
- [10] **Hou Pb, Li Yz, Wu Bh, Yan Zc, Yan Bx, Gao Pj.** 2006. Cellulolytic complex exists in cellulolytic myxobacterium *Sorangium*. *Enzyme Microb Tech* **38**:273-278.
- [11] **Schneiker S, Perlova O, Kaiser O, Gerth K, Alici A, Altmeyer MO, Bartels D, Bekel T, Beyer S, Bode E, Bode HB, Bolten CJ, Choudhuri JV, Doss S, Elnakady YA, Frank B, Gaigalat L, Goesmann S, Groeger C, Gross F, Jelsbak L, et al.** 2007. Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat Biotechnol* **25**:1281-1289.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [12] **Bolten CJ, Heinzle E, Müller R, Wittmann C.** 2009. Investigation of the central carbon metabolism of *Sorangium cellulosum*: metabolic network reconstitution and quantification of pathway fluxes. *J Microbiol Biotechnol* **19**:23-36.
- [13] **Morgan AD, MacLean RC, Hillesland KL, Velicer GJ.** 2010. Comparative analysis of myxococcus predation on soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **76**:6920-6927.
- [14] **Pérez J, Moraleda-Muñoz A, Marcos-Torres FJ, Muñoz-Dorado J.** 2016. Bacterial predation: 75 years and counting! *Environ Microbiol* **18**:766-779.
- [15] **Jurkevitch E.** 2007. Predatory behaviors in bacteria – diversity and transitions. *Microbe* **2**:67-73.
- [16] **Spormann AM.** 1999. Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus xanthus*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:621-641.
- [17] **Kaiser D, Crosby C.** 1983. Cell movement and its coordination in swarms of *Myxococcus xanthus*. *Cell Motil* **3**:227-245.
- [18] **Kaiser D, Robinson M, Kroos L.** 2010. Myxobacteria, polarity, and multicellular morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**:a000380.
- [19] **Nan B, Zusman DR.** 2011. Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria. *Annu Rev Genet* **45**:21-39.
- [20] **Lünsdorf H, Reichenbach H.** 1989. Ultrastructural details of the apparatus of gliding motility of *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *J Gen Microbiol* **135**, 1633-1641.
- [21] **Shi W, Zusman DR.** 1993. The two motility systems of *Myxococcus xanthus* show different selective advantages on various surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:3378-3382.
- [22] **Hillesland KL, Velicer GJ.** 2005. Resource level affects relative performance of the two motility systems of *Myxococcus xanthus*. *Microb Ecol* **49**:558-566.
- [23] **Muñoz-Dorado J, Marcos-Torres FJ, García-Bravo E, Moraleda-Muñoz A, Pérez J.** 2016. Myxobacteria: moving, killing, feeding, and surviving together. *Front Microbiol* **7**:781.
- [24] **Sun H, Zusman DR, Shi W.** 2000. Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Curr Biol* **10**:1143-1146.
- [25] **Mauriello EM, Mignot T, Yang Z, Zusman DR.** 2010. Gliding motility revisited: how do the myxobacteria move without flagella? *Microbiol Mol Biol Rev* **74**:229-249.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [26] **Kaiser D.** 1979. Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. Proc Natl Acad Sci U S A **76**:5952-5956.
- [27] **Wu SS, Kaiser D.** 1995. Genetic and functional evidence that type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. Mol Microbiol **18**:547-558.
- [28] **Wall D, Kaiser D.** 1999. Type IV pili and cell motility. Mol Microbiol **32**:1-10.
- [29] **Skerker JM, Berg HC.** 2001. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. Proc Natl Acad Sci U S A **98**:6901-6904.
- [30] **Mattick JS.** 2002. Type IV pili and twitching motility. Annu Rev Microbiol **56**:289-314.
- [31] **Friedrich C, Bulyah I, Sogaard-Andersen L.** 2014. Outside-in assembly pathway of the type IV pilus system in *Myxococcus xanthus*. J Bacteriol **196**:387-390.
- [32] **Chang YW, Rettberg LA, Treuner-Lange A, Iwasa J, Sogaard-Andersen L, Jensen GJ.** 2016. Architecture of the type IV pilus machine. Science **351**:aad2001.
- [33] **Wolgemuth C, Hoiczky E, Kaiser D, Oster G.** 2002. How myxobacteria glide. Curr Biol **12**:369-377.
- [34] **Yu R, Kaiser D.** 2007. Gliding motility and polarized slime secretion. Mol Microbiol **63**:454-467.
- [35] **Dworkin M, Kaiser D.** 1985. Cell interactions in myxobacterial growth and development. Science **230**:18-24.
- [36] **Shimkets LJ.** 1990. Social and developmental biology of the myxobacteria. Microbiol Rev **54**:473-501.
- [37] **Kaplan HB, Plamann L.** 1996. A *Myxococcus xanthus* cell density-sensing system required for multicellular development. FEMS Microbiol Lett **139**:89-95.
- [38] **Manoil C, Kaiser D.** 1980. Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and myxospore formation. J Bacteriol **141**:297-304.
- [39] **Wireman JW, Dworkin M.** 1977. Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. J Bacteriol **129**:798-802.
- [40] **Dworkin M.** 1996. Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. Microbiol Rev **60**:70-102.
- [41] **Kaiser D.** 2004. Signaling in myxobacteria. Annu Rev Microbiol **58**:75-98.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [42] **Kaiser D.** 2013. Are myxobacteria intelligent? *Front Microbiol* **4**:335.
- [43] **Plamann L, Li Y, Cantwell B, Mayor J.** 1995. The *Myxococcus xanthus asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J Bacteriol* **177**:2014-2020.
- [44] **Kuspa A, Plamann L, Kaiser D.** 1992. A-signalling and the cell density requirement for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **174**:7360-7369.
- [45] **Plamann L, Kuspa A, Kaiser D.** 1992. Proteins that rescue A-signal-defective mutants of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **174**:3311-3318.
- [46] **Kim SK, Kaiser D.** 1990^a. C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *M. xanthus*. *Cell* **61**:19-26.
- [47] **Kim SK, Kaiser D.** 1990^d. Purification and properties of *Myxococcus xanthus* C-factor, an intercellular signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:3635-3639.
- [48] **Kim SK, Kaiser D.** 1990^b. Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Science* **249**:926-928.
- [49] **Kim SK, Kaiser D.** 1990^c. Cell motility is required for the transmission of C-factor, an intracellular signal that coordinates fruiting body morphogenesis of *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* **4**:896-904.
- [50] **Martin MO.** 2002. Predatory prokaryotes: an emerging research opportunity. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**:467-477.
- [51] **Livingstone PG, Millard AD, Swain MT, Whitworth DE.** 2018. Transcriptional changes when *Myxococcus xanthus* preys on *Escherichia coli* suggest myxobacterial predators are constitutively toxic but regulate their feeding. *Microb Genom* **4**:e000152.
- [52] **Evans AG, Davey HM, Cookson A, Currinn H, Cooke-Fox G, Stanczyk PJ, Whitworth DE.** 2012. Predatory activity of *Myxococcus xanthus* outer-membrane vesicles and properties of their hydrolase cargo. *Microbiology* **158**:2742-2752.
- [53] **Berleman JE, Allen S, Danielewicz MA, Remis JP, Gorur A, Cunha J, Hadi MZ, Zusman DR, Northen TR, Witkowska HE, Auer M.** 2014. The lethal cargo of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicles. *Front Microbiol* **5**:474.
- [54] **Palsdottir H, Remis JP, Schaudinn C, O'toole E, Lux R, Shi W, McDonald KL, Costerton JW, Auer M.** 2009. Three-dimensional macromolecular organization of cryofixed *Myxococcus xanthus* biofilms as revealed by electron microscopic tomography. *J Bacteriol* **191**:2077-2082.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [55] **Garcia R, Gerth K, Stadler M, Dogma IJ Jr, Müller R.** 2010. Expanded phylogeny of myxobacteria and evidence for cultivation of the ‘unculturables’. *Mol Phylogenet Evol* **57**:878-887.
- [56] **Hodgkin J, Kaiser D.** 1979. Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacteriales): two gene systems control movement. *Mol Gen Genet* **171**:177-191.
- [57] **Blackhart BD, Zusman DR.** 1985. “Frizzy” genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:8767-8770.
- [58] **Youderian P, Burke N, White DJ, Hartzell PL.** 2003. Identification of genes required for adventurous gliding motility in *Myxococcus xanthus* with the transposable element mariner. *Mol Microbiol* **49**:555-570.
- [59] **Mignot T.** 2007. The elusive engine in *Myxococcus xanthus* gliding motility. *Cell Mol Life Sci* **64**:2733-2745.
- [60] **Pogue CB, Zhou T, Nan B.** 2018. PlpA, a PilZ-like protein, regulates directed motility of the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **107**:214-228.
- [61] **O’Connor KA, Zusman DR.** 1989. Patterns of cellular interactions during fruiting-body formation in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **171**:6013-6024.
- [62] **Shimkets LJ.** 1986. Role of cell cohesion in *Myxococcus xanthus* fruiting body formation. *J Bacteriol* **166**:842-848.
- [63] **O’Connor KA, Zusman DR.** 1991. Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **173**:3342-3355.
- [64] **Zusman DR, Scott AE, Yanf Z, Kirby JR.** 2007. Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nat Rev Microbiol* **5**:862-872.
- [65] **Søgaard-Andersen L, Overgaard M, Lobedanz S, Ellehaug E, Jelsbak L, Rasmussen AA.** 2003. Coupling gene expression and multicellular morphogenesis during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **48**:1-8.
- [66] **Kimsey HH, Kaiser D.** 1991. Targeted disruption of the *Myxococcus xanthus* orotidine 5’-monophosphate decarboxylase gene: effects on growth and fruiting-body development. *J Bacteriol* **173**:6790-6797.
- [67] **Plamann L, Davis JM, Cantwell B, Mayor J.** 1994. Evidence that *asgB* encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **176**:2013-2020.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [68] **Kashefi K, Hartzell PL.** 1995. Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* *frzF* defect. *Mol Microbiol* **15**:483-494.
- [69] **Breton AM, Jaoua S, Guespin-Michel J.** 1985. Transfer of plasmid RP4 to *Myxococcus xanthus* and evidence for its integration into the chromosome. *J Bacteriol* **161**:523-528.
- [70] **Pospiech A, Cluzel B, Bietenhader J, Schupp T.** 1995. A new *Myxococcus xanthus* gene cluster for the biosynthesis of the antibiotic saframycin Mx1 encoding a peptide synthetase. *Microbiology* **141**:1793-1803.
- [71] **O'Connor KA, Zusman DR.** 1983. Coliphage P1-mediated transduction of cloned DNA from *Escherichia coli* to *Myxococcus xanthus*: use for complementation and recombinational analyses. *J Bacteriol* **155**:317-329.
- [72] **Julien B, Shah S.** 2002. Heterologous expression of epothilone biosynthetic genes in *Myxococcus xanthus*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2772-2778.
- [73] **Perlova O, Fu J, Kuhlmann S, Krug D, Stewart AF, Zhang Y, Müller R.** 2006. Reconstitution of the myxothiazol biosynthetic gene cluster by Red/ET recombination and heterologous expression in *Myxococcus xanthus*. *Appl Environ Microbiol* **72**:7485-7494.
- [74] **Fu J, Wenzel SC, Perlova O, Wang J, Gross F, Tang Z, Yin Y, Stewart AF, Müller R, Zhang Y.** 2008. Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition. *Nucl Acids Res* **36**:e113.
- [75] **Sucipto H, Pogorevc D, Luxenberger E, Wenzel SC, Müller R.** 2017. Heterologous production of myxobacterial α -pyrone antibiotics in *Myxococcus xanthus*. *Metab Eng* **44**: 160-170.
- [76] **Yan F, Auerbach D, Chai Y, Keller L, Tu Q, Hüttel S, Glemser A, Grab HA, Bach T, Zhang Y, Müller R.** 2018. Biosynthesis and heterologous production of vioprolides: rational biosynthetic engineering and unprecedented 4-methylazetidide-carboxylic acid formation. *Angew Chem Int Ed* **57**:8754-8759.
- [77] **Stevens DC, Henry MR, Murphy KA, Boddy CN.** 2010. Heterologous expression of the oxytetracycline biosynthetic pathway in *Myxococcus xanthus*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2681-2683.
- [78] **Hannig G, Makrides SC.** 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **16**:54-60.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [79] **Kaur J, Kumar A, Kaur J.** 2018. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: roadblocks and reinforcements. *Int J Macromol* **106**:803-822.
- [80] **Goldman BS, Nierman WC, Kaiser D, Slater SC, Durkin AS, Eisen JA, Ronning CM, Barbazuk WB, Blanchard M, Field C, Halling C, Hinkle G, Iartchuk O, Kim HS, Mackenzie C, Madupu R, Miller N, Shvartsbeyn A, Sullivan SA, Vaudin M, Wiegand R, Kaplan HB.** 2006. Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:15200-15205.
- [81] **Schieferdecker S, König S, Weigel C, Dahse HM, Werz O, Nett M.** 2014. Structure and biosynthetic assembly of gulumirecins, macrolide antibiotics from the predatory bacterium *Pyxidicoccus fallax*. *Chemistry* **20**:15933-15940.
- [82] **Schieferdecker S, König S, Koeberle A, Dahse HM, Werz O, Nett M.** 2015. Myxochelins target human 5-lipoxygenase. *J Nat Prod* **78**:335-338.
- [83] **Surup F, Viehrig K, Mohr KI, Herrmann J, Jansen R, Müller R.** 2014. Disciformycins A and B: 12-membered macrolide glycoside antibiotics from the myxobacterium *Pyxidicoccus fallax* active against multiresistant staphylococci. *Angew Chem Int Ed Engl* **53**:13588-13591.
- [84] **Kjaerulff L, Raju R, Panter F, Scheid U, Garcia R, Herrmann J, Müller R.** 2017. Pyxipyrrolones: structure elucidation and biosynthesis of cytotoxic myxobacterial metabolites. *Angew Chem Int Ed Engl* **56**:9614-9618.
- [85] **Panter F, Krug D, Baumann S, Müller R.** 2018. Self-resistance guided genome mining uncovers new topoisomerase inhibitors from myxobacteria. *Chem Sci* **9**:4898-4908.
- [86] **Butler MS.** 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod* **67**:2141-2153.
- [87] **Harvey AA.** 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today* **13**:894-901.
- [88] **Mishra BB, Tiwari VK.** 2011. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem* **46**:4769-4807.
- [89] **Newman DJ, Cragg GM.** 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* **75**:311-335.
- [90] **Wenzel SC, Müller R.** 2009. Myxobacteria – ‘microbial factories’ for the production of bioactive secondary metabolites. *Mol Biosyst* **5**:567-574.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [91] **Diez J, Martinez JP, Mestres J, Sasse F, Frank R, Meyerhans A.** 2012. Myxobacteria: natural pharmaceutical factories. *Microb Cell Fact* **11**:52.
- [92] **Wenzel SC, Müller R.** 2007. Myxobacterial natural product assembly lines: fascinating examples of curious biochemistry. *Nat Prod Rep* **24**:1211-1224.
- [93] **Cane DE.** 1997. Introduction: polyketide and nonribosomal polypeptide biosynthesis. From Collie to Coli. *Chem Rev* **97**:2463-2464.
- [94] **Staunton J, Weissman KJ.** 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* **18**:380-416.
- [95] **Fischbach MA, Walsh CT.** 2006. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem Rev* **106**:3468-3496.
- [96] **Finking R, Marahiel MA.** 2004: Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu Rev Microbiol* **58**:453-488.
- [97] **Meier JL, Burkart MD.** 2009. The chemical biology of modular biosynthetic enzymes. *Chem Soc Rev* **38**:2012-2045.
- [98] **Schwarzer D, Marahiel MA.** 2001. Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* **88**:93-101.
- [99] **Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA.** 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep* **20**:275-287.
- [100] **Condurso HL, Bruner SD.** 2012, Structure and noncanonical chemistry of nonribosomal peptide biosynthetic machinery. *Nat Prod Rep* **29**:1099-1110.
- [101] **Weber T, Marahiel MA.** 2001. Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure* **9**:R3-9.
- [102] **Marahiel MA.** 2016. A structural model for multimodular NRPS assembly lines. *Nat Prod Rep* **33**:136-140.
- [103] **Lambalot RH, Gehring AM, Flugel RS, Zuber P, LaCelle M, Marahiel MA, Reid R, Khosla C, Walsh CT.** 1996. A new enzyme superfamily – the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **3**:923-936.
- [104] **Walsh CT, Gehring AM, Weinreb PH, Quadri LE, Flugel RS.** 1997. Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr Opin Chem Biol* **1**:309-315.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [105] **Beld J, Sonnenschein EC, Vickery CR, Noel JP, Burkart MD.** 2014. The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a posttranslational modification crucial for life. *Nat Prod Rep* **31**:61-108.
- [106] **Walsh CT.** 2016. Insights into the chemical logic and enzymatic machinery of NRPS assembly lines. *Nat Prod Rep* **33**:127-135.
- [107] **Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA.** 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**:493-505.
- [108] **Hur GH, Vickery CR, Burkart MD.** 2012. Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat Prod Rep* **29**:1074-1098.
- [109] **Keating TA, Ehmann DE, Kohli RM, Marshall CG, Trauger JW, Walsh CT.** 2001. Chain termination steps in nonribosomal peptide synthetase assembly lines: directed acyl-S-enzyme breakdown in antibiotic and siderophore biosynthesis. *Chembiochem* **2**:99-107.
- [110] **Du L, Lou L.** 2010. PKS and NRPS release mechanisms. *Nat Prod Rep* **27**:255-278.
- [111] **Konz D, Marahiel MA.** 1999. How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol* **6**:39-48.
- [112] **Walsh CT, Chen H, Keating TA, Hubbard BK, Losey HC, Luo L, Marshall CG, Miller DA, Patel HM.** 2001. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol* **5**:525-534.
- [113] **Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quñones F.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**:215-237.
- [114] **Faraldo-Gómez JD, Sansom MS.** 2003. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:105-116.
- [115] **Kraemer SM.** 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat Sci* **66**:3-18.
- [116] **Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma BK, Bhattacharjee S, Tribedi P.** 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* **23**:3984-3999.
- [117] **Frey PA, Reed GH.** 2012. The ubiquity of iron. *ACS Chem Biol* **7**:1477-1481.
- [118] **Chu BC, Harcia-Herrero A, Johanson TH, Krewulak KD, Lau CK, Peacock RS, Slavinskaya Z, Vogel HJ.** 2010. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* **23**:601-611.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [119] **Guerinot ML.** 1994. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* **48**:743-772.
- [120] **Sandy M, Butler A.** 2009. Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. *109*:4580-4595.
- [121] **Raymond KN, Allred BE, Sia AK.** 2015. Coordination chemistry of microbial iron transport. *Acc Chem Res* **48**:2496-2505.
- [122] **Imlay JA, Chin SM, Linn S.** 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science* **240**:640-642.
- [123] **Winterbourn D.** 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* **82/83**:969-974.
- [124] **Touati D.** 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **373**:1-6.
- [125] **Larsen RA, Thomas MG, Wood GE, Postle K.** 1994. Partial suppression of an *Escherichia coli* TonB transmembrane domain mutation (Δ V17) by a missense mutation in ExbB. *Mol Microbiol* **13**:627-640.
- [126] **Braun V.** 1995. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol Rev* **16**:295-307.
- [127] **Moeck GS, Coulton JW.** 1998. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* **28**:675-681.
- [128] **Higgs PI, Myers PS, Postle K.** 1998. Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and EcbD form homomultimers. *J Bacteriol* **180**:6063-6038.
- [129] **Postle K.** 1993. TonB protein and energy transduction between membranes. *J Bioenerg Biomembr* **25**:591-601.
- [130] **Pawelek PD, Croteau N, Ng-Thow-Hing C, Khursiagara CM, Moiseeva N, Allaire M, Coulton JW.** 2006. Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science* **312**:1399-1402.
- [131] **Wooldridge KG, Morrissey JA, Williams PH.** 1992. Transport of ferric-aerobactin into the periplasm and cytoplasm of *Escherichia coli* K12: role of envelope-associated proteins and effect of endogenous siderophores. *J Gen Microbiol* **138**:597-603.
- [132] **Postle K, Larsen RA.** 2007. TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals* **20**:453-465.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [133] **Köster W.** 2001. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B₁₂. *Res Microbiol* **152**:291-301.
- [134] **Krewulak KD, Vogel HJ.** 2008. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta* **1778**:1781-1804.
- [135] **Theil EC.** 1987. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem* **56**:289-315.
- [136] **Harrison PM, Arosio P.** 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* **1275**:161-203.
- [137] **Smith JL.** 2004. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit Rev Microbiol* **30**:173-185.
- [138] **Chiancone E, Ceci P, Ilari A, Ribacchi F, Stefanini S.** 2004. Iron and proteins for iron storage and detoxification. *Biometals* **17**:197-202.
- [139] **Fukushima T, Allred BE, Raymond KN.** 2014. Direct evidence of iron uptake by the gram-positive siderophore-shuttle mechanism without iron reduction. *ACS Chem Biol* **9**:2092-2100.
- [140] **Escolar L, Pérez-Martín J, de Lorenzo V.** 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**:6223-6229.
- [141] **Bagg A, Neilands JB.** 1987. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev* **51**:509-518.
- [142] **Fillat MF.** 2014. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys* **546**:41-52.
- [143] **Bagg A, Neilands JB.** 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**:5471-5477.
- [144] **Crosa JH, Walsh CT.** 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:223-249.
- [145] **Challis GL.** 2005. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* **6**:601-611.
- [146] **Oves-Costales D, Kadi N, Challis GL.** 2009. The long-overlooked enzymology of a nonribosomal peptide synthetase-independent pathway for virulence-conferring siderophore biosynthesis. *Chem Commun (Camb)* **43**:6530-6541.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [147] **Butler A, Theisen RM.** 2010. Iron(III)-siderophore coordination chemistry: reactivity of marine siderophores. *Coord Chem Rev* **254**:288-296.
- [148] **Khan A, Singh P, Srivastava A.** 2017. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - siderophore: a review. *Microbiol Res*, doi: 10.1016/j.micres.2017.10.012.
- [149] **Herrmann KM.** 1995. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* **7**:907-919.
- [150] **Herrmann KM, Weaver LM.** 1999. The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**:473-503.
- [151] **Young IG, Batterham TJ, Gibson F.** 1969. The isolation, identification and properties of isochorismic acid. An intermediate in the biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid. *Biochim Biophys Acta* **177**:389-400.
- [152] **Walsh CT, Liu J, Rusnak F, Sakaitani M.** 1990. Molecular studies on enzymes in chorismate metabolism and the enterobactin biosynthetic pathway. *Chem Rev* **90**:1105-1129.
- [153] **Kurth C, Kage H, Nett M.** 2016. Siderophores as molecular tools in medical and environmental applications. *Org Biomol Chem* **14**:8212-8227.
- [154] **Hider RC, Kong X.** 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* **27**:637-657.
- [155] **Raymond KN, Dertz EA, Kim SS.** 2003. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *P Natl Acad Sci USA* **100**:3584-3588.
- [156] **Kunze B, Bedorf N, Kohl W, Höfle G, Reichenbach H.** 1989. Myxochelin A, a new iron-chelating compound from *Angiococcus disciformis* (Myxobacterales). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot* **42**:14-17.
- [157] **Keberle H.** 1964. The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann NY Acad Sci* **119**:758-768.
- [158] **Takayuki N, Nobuo T, Jun H, Yukiteru K, Yuzaburo I, Junichi O.** 1988. Isolation and structure of the novel dihydroxamate siderophore alcaligin. *J Am Chem Soc* **110**:8733-8734.
- [159] **Konetschny-Rapp S, Jung G, Meiwes J, Zähler H.** 1990. Staphyloferrin A: a structurally new siderophore from Staphylococci. *Eur J Biochem* **191**:65-74.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [160] **Gibson F, Magrath DI.** 1969. The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62-I. *Biochim Biophys Acta* **192**:175-184.
- [161] **Young IG, Gibson F.** 1969. The stereochemistry of intermediates involved in the biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid. *Biochim Biophys Acta* **177**:348-350.
- [162] **Trowitzsch-Kienast W, Kunze B, Irschik H, Wray V, Reichenbach H, Höfle G.** 1991. Synthesis of myxochelin derivatives with biological activity (poster). The 9th DEHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen. Berlin, Germany.
- [163] **Silakowski B, Kunze B, Nordsiek G, Blöcker H, Höfle G, Müller R.** 2000. The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Eur J Biochem* **267**:6476-6485.
- [164] **Nadmid S, Plaza A, Lauro G, Garcia R, Bifulco G, Müller R.** 2014. Hyalachelins A-C, unusual siderophores isolated from the terrestrial myxobacterium *Hyalangium minutum*. *Org Lett* **16**:4130-4133.
- [165] **Sonnenschein EC, Stierhof M, Goralczyk S, Vabre FM, Pellissier L, Hanssen KØ, de la Cruz M, Díaz C, de Witte P, Copmans D, Andersen JH, Hansen E, Kristoffersen V, Tormo JR, Ebel R, Milne BF, Deng H, Gram L, Jaspars M, Tabudravu JN.** 2017. Pseudochelin A, a siderophore of *Pseudoalteromonas piscicida* S2040. *Tetrahedron* **73**:2633-2637.
- [166] **Miyana S, Obata T, Onaka H, Fujita T, Saito N, Sakurai H, Saiki I, Furumai T, Igarashi Y.** 2006. Absolute configuration and antitumor activity of myxochelin A produced by *Nonomuraea pusilla* TP-A0861. *J Antibiot* **59**:698-703.
- [167] **Kiss H, Nett M, Domin N, Martin K, Maresca JA, Copeland A, Lapidus A, Lucas S, Berry KW, Glavina Del Rio T, Dalin E, Tice H, Pitluck S, Richardson P, Bruce D, Goodwin L, Han C, Detter JC, Schmutz J, Brettin T, Land M, Hauser L, Kyrpides NC, Ivanova N, Göker M, Woyke T, Klenk HP, Bryant DA.** 2011. Complete genome sequence of the filamentous gliding predatory bacterium *Herpetosiphon aurantiacus* type strain (114-95(T)). *Stand Genomic Sci* **5**:356-370.
- [168] **Gaitatzis N, Kunze B, Müller R.** 2001. *In vitro* reconstitution of the myxochelin biosynthesis machinery of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15: biochemical characterization of a reductive release mechanism from nonribosomal peptide synthetases. *P Natl Acad Sci USA* **98**:11136-11141.
- [169] **Gaitatzis N, Kunze B, Müller R.** 2005. Novel insights into siderophore formation in myxobacteria. *ChemBioChem* **6**:365-374.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [170] **Li Y, Weissman KJ, Müller R.** 2008. Myxochelin biosynthesis: direct evidence for two- and four-electron reduction of a carrier protein-bound thioester. *J Am Chem Soc* **130**:7554-7555.
- [171] **Miyanaga S, Sakurai H, Saiki I, Onaka H, Igarashi Y.** 2009. Synthesis and evaluation of myxochelin analogues as antimetastatic agents. *Bioorg Med Chem* **17**:2724-2732.
- [172] **Hong J, Bose M, Ju J, Ryu JH, Chen X, Sang S, Lee MJ, Yang CS.** 2004. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A(2), cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis* **25**:1671-1679.
- [173] **Rao CV.** 2007. Regulation of COX and LOX by curcumin. *Adv Exp Med Biol* **595**:213-226.
- [174] **Koeberle A, Muñoz E, Appendino GB, Minassi A, Pace S, Rossi A, Weinigel C, Barz D, Sautebin L, Caprioglio D, Collado JA, Werz O.** 2014. SAR studies on curcumin's pro-inflammatory targets: discovery of prenylated pyrazolocurcuminoids as potent and selective novel inhibitors of 5-lipoxygenase. *J Med Chem* **57**:5638-5648.
- [175] **Wisastra R, Dekker FJ.** 2014. Inflammation, cancer and oxidative lipoxygenase activity are intimately linked. *Cancers* **6**:1500-1521.
- [176] **Brash AR.** 1999. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* **174**:23679-23682.
- [177] **Liavonchanka A, Feussner I.** 2006. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol* **163**:348-357.
- [178] **Prigge ST, Boyington JC, Faig M, Doctor KS, Gaffney BJ, Amzel LM.** 1997. Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie* **79**:629-636.
- [179] **Hansen J, Garreta A, Benincasa M, Fusté MC, Busquets M, Manresa A.** 2013. Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:4737-4747.
- [180] **Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN.** 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **237**:1171-1176.
- [181] **Jampilek J, Dolezal M, Opletalova V, Hartl J.** 2006. 5-Lipoxygenase, leukotrienes biosynthesis and potential antileukotrienic agents. *Curr Med Chem* **13**:117-129.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [182] **Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B.** 2015. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1851**:331-339.
- [183] **Bray MA, Cunnungham FM, Ford-Hutchinson AW, Smith MJ.** 1981. Leukotriene B₄: a mediator of vascular permeability. *Br J Pharmacol* **72**:483-486.
- [184] **Björk J, Hedqvist P, Arfors KE.** 1982. Increase in vascular permeability induced by leukotriene B₄ and the role of polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* **6**:189-200.
- [185] **Serhan CN, Prescott SM.** 2000. The scent of a phagocyte: advances on leukotriene B₄ receptors. *J Exp Med* **192**:F5-F8.
- [186] **Sharma JN, Mohammed LA.** 2006. The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic agents? *Inflammopharmacology* **14**:10-16.
- [187] **Solomon EI, Zhpu J, Neese F, Pavel EG.** 1997. New insights from spectroscopy into the structure/function relationships of lipoxygenases. *Chem Biol* **4**:795-808.
- [188] **Gilbert NC, Bartlett SG, Waight MT, Neau DB, Boeglin WE, Brash AR, Newcomer ME.** 2011. The structure of human 5-lipoxygenase. *Science* **331**:217-219.
- [189] **Kreutzer MF, Kage H, Herrmann J, Pauly J, Hermenau R, Müller R, Hoffmeister D, Nett M.** 2014. Precursor-directed biosynthesis of micacocidin derivatives with activity against *Mycoplasma pneumoniae*. *Org Biomol Chem* **12**: 113-118.
- [190] **Grüschow S, Rackham EJ, Elkins B, Newill PL, Hill LM, Goss RJ.** 2009. New pacidamycin antibiotics through precursor-directed biosynthesis. *Chembiochem* **10**:355-360.
- [191] **Thiericke R, Rohr J.** 1993. Biological variation of microbial metabolites by precursor-directed biosynthesis. *Nat Prod Rep* **10**:265-289.
- [192] **Kim J, Choi JN, Kim P, Sok DE, Nam SW, Lee CH.** 2009. LC-MS/MS profiling-base secondary metabolite screening of *Myxococcus xanthus*. *J Microbiol Biotechnol* **19**:51-54.
- [193] **Krug D, Zurek G, Revermann O, Vos M, Velicer GJ, Müller R.** 2008. Discovering the hidden secondary metabolome of *Myxococcus xanthus*: a study of intraspecific diversity. *Appl Environ Microbiol* **74**:3058-3068.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [194] **Zhao JY, Zhong L, Shen MJ, Xia ZJ, Cheng QX, Sun X, Zhao GP, Li YZ, Qin ZJ.** 2008. Discovery of the autonomously replicating plasmid pMF1 from *Myxococcus fulvus* and development of a gene cloning system in *Myxococcus xanthus*. *Appl Environ Microbiol* **74**:1980-1987.
- [195] **Bhat S, Zhu X, Patel RP, Orlando R, Shimkets LJ.** 2011. Identification and localization of *Myxococcus xanthus* porins and lipoproteins. *PLoS One* **6**:e27475.
- [196] **Kunze B, Trowitzsch-Kienast W, Höfle G, Reichenbach H.** 1992. Nannochelins A, B and C, new iron-chelating compounds from *Nannocystis exedens* (myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot* **45**:147-150.
- [197] **Porta H, Rocha-Sosa M.** 2001. Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event? *Microbiology* **147**:3199-200.
- [198] **Vance RE, Hong S, Gronert K, Serhan CN, Mekalanos JJ.** 2004. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:2135-2139.
- [199] **An JU, Kim BJ, Hong SH, Oh DK.** 2015. Characterization of an ω -6 linoleate lipoxygenase from *Burkholderia thailandensis* and its application in the production of 13-hydroxyoctadecadienoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**:5487-5497.
- [200] **Zheng Y, Boeglin WE, Schneider C, Brash AR.** 2008. A 49-kDa mini-lipoxygenase from *Anabaena* sp. PCC 7120 retains catalytically complete functionality. *J Biol Chem* **283**:5138-5147.
- [201] **Koeuka T, Kajiwara T, Matsui K.** 2007. Cloning of lipoxygenase genes from a cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*, and its expression in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **54**:315-319.
- [202] **Qian H, Xia B, He Y, Lu Z, Bie X, Zhao H, Zhang H, Lu F.** 2017. Expression, purification, and characterization of a novel acidic lipoxygenase from *Myxococcus xanthus*. *Protein Expr Purif* **138**:13-17.3
- [203] **An JU, Hong SH, OH DK.** 2018. Regiospecificity of a novel bacterial lipoxygenase from *Myxococcus xanthus* for polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **1863**:823-833.
- [204] **Jensen EC, Ogg C, Nickerson KW.** 1992. Lipoxygenase inhibitors shift the yeast/mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Appl Environ Microbiol* **58**:2505-2508.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [205] **Schwyn B, Neilands JB.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**:47-56.
- [206] **Louden BC, Haarmann D, Lynne AM.** 2011. Use of blue agar cas assay for siderophore detection. *J Microbiol Biol Educ* **12**:51-53.
- [207] **Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW.** 2016. GenBank. *Nucleic Acids Res* **44**:D67-D72.
- [208] **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.
- [209] **Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T.** 1997. Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases. *Nucl Acids Res* **25**:244-245.
- [210] **Bachmann OB, Ravel J.** 2009. Methods for *in silico* prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data. *Methods Enzymol* **458**: 181-217.
- [211] **Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar GA, Tate J, Bateman A.** 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acid Res* **44**:D279-D285.
- [212] **Hartzell PL.** 1997. Complementation of sporulation and motility defects in a prokaryote by a eukaryotic GTPase. *P Natl Acad Sci USA* **94**:9881-9886.
- [213] **Szpirer CY, Faelen M, Couturier M.** 2001. Mobilization function of the pBHR1 plasmid, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1. *J Bacteriol* **183**:2101-2110.
- [214] **Feng J, Chen XJ, Sun X, Wang N, Li YZ.** 2012. Characterization of the replication origin of the myxobacterial self-replicative plasmid pMF1. *Plasmid* **68**:105-112.
- [215] **Rubin EJ, Akerley BJ, Novik VN, Lampe DJ, Husson DJ, Mekalanos JJ.** 1999. In vivo transposition or mariner-based elements in enteric bacteria and mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:1645-1650.
- [216] **Sambrook J, Russel DV.** 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
- [217] **Neumann B, Pospiech A, Schairer HU.** 1992. Rapid isolation of genomic DNA from gram-negative bacteria. *Trends Genet* **8**:332-333.
- [218] **Río Bártulos C.** 2012. Isolierung von DNA. In: *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 5. Auflage.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- Jansohn M, Rothhämel S (Hrsg.), Springer Spektrum, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [219] **Mandel M, Higa A.** 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**:159-162.
- [220] **Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.
- [221] **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- [222] **Sánchez-Sutil MC, Gómez-Santos N, Moraleda-Muñoz A, Martins LO, Pérez J, Muñoz-Dorado J.** 2007. Differential expression of the three multicopper oxidases from *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **189**:4887-4898.
- [223] **Gómez-Santos N, Treuner-Lange A, Moraleda-Muñoz A, García-Bravo E, García-Hernández R, Martínez-Cayuela M, Pérez J, Søgaard-Andersen L, Muñoz-Dorado J.** 2012. Comprehensive set of integrative plasmid vectors for copper-inducible gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Appl Environ Microbiol* **78**:2515-2521.
- [224] **Wu SS, Kaiser D.** 1997. Regulation of expression of the *pilA* gene in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **179**:7748-7758.
- [225] **Reichenbach H, Höfle G.** 1993. Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. *Biotechnol Adv* **11**:219-277.
- [226] **Korp J, König S, Schieferdecker S, Dahse HM, König GM, Werz O, Nett M.** 2015. Harnessing enzymatic promiscuity in myxochelin biosynthesis for the production of 5-lipoxygenase inhibitors. *Chembiochem* **16**:2445-2450.
- [227] **Hill AM, Thompson BL.** 2003. Novel soraphens from precursor directed biosynthesis. *Chem Commun*: 1360-1361.
- [228] **Adams ES, Rinehart KL.** 1994. Directed biosynthesis of 5''-fluoropactamycin in *Streptomyces pactum*. *J Antibiot* **47**:1456-1465.
- [229] **Chen TS, Petuch B, MacConnel J, White R, Dezeny G, Arison B, Bergstrom JD, Colwell L, Huang L, Monaghan RL.** 1994. The preparation of zaragozic acid A analogues by directed biosynthesis. *J Antibiot* **47**:1129-1194.
- [230] **Cannell RJ, Dawson MJ, Hale RS, Hall RM, Noble D, Lynn S, Taylor NL.** 1993. The squalostatins, novel inhibitors of squalene synthase produced by a species of

- Phoma. IV. Preparation of fluorinated squalestatins by directed biosynthesis. *J Antibiot* **46**:1381-1389.
- [231] **Schieferdecker S, König S, Pace S, Werz O, Nett M.** 2017. Myxochelin-inspired 5-lipoxygenase inhibitors: synthesis and biological evaluation. *ChemMedChem* **12**:23-27.
- [232] **Machado H, Sonnenschein EC, Melchiorson J, Gram L.** 2015. Genome mining reveals unlocked bioactive potential of marine Gram-negative bacteria. *BMC Genomics* **16**:158.
- [233] **Holm H, Sander C.** 1997. An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Proteins* **28**:72-82.
- [234] **Seibert CM, Raushel FM.** 2005. Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* **44**:6383-6391.
- [235] **Michal G.** 1999. Biochemical pathways. An atlas of biochemistry and molecular biology. John Wiley & Sons. New York.
- [236] **Yu Y, Liang YH, Brostromer E, Quan JM, Panjekar S, Dong YH, Su XD.** 2006. A catalytic mechanism revealed by the crystal structures of the imidazolonepropionase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **281**:36929-36936.
- [237] **Tyagi R, Eswaramoorthy S, Burley SK, Raushel FM, Swaminathan S.** 2008. A common catalytic mechanism for proteins of HutI family. *Biochemistry* **47**:5608-5615.
- [238] **Su H, Sheng X, Liu Y.** 2016. Exploring the substrate specificity and catalytic mechanism of imidazolonepropionase (HutI) from *Bacillus subtilis*. *Phys Chem Chem Phys* **18**:27928-27938.
- [239] **Losada AA, Cano-Prieto C, García-Salcedo R, Braña AF, Méndez C, Salas JA, Olano C.** 2017. Caboxamycin biosynthesis pathway and identification of novel benzoxazoles produced by cross-talk in *Streptomyces* sp. NTK 937. *Microb Biotechnol* **10**:873-885.
- [240] **Michel KH, Boeck LD, Hoehn MM, Jones ND, Chaney MO.** 1984. The discovery, fermentation, and structure of antibiotic A33853 and its tetraacetyl derivative. *J Antibiot* **37**:441-445.
- [241] **Lv M, Zhao J, Deng Z, Yu Y.** 2015. Characterization of the biosynthetic gene cluster of benzoxazole antibiotic A33853 reveals unusual assembly logic. *Chem Biol* **22**:1313-1324.

- [242] **Sommer PS, Almeida RC, Schneider K, Beil W, Süßmuth RD, Fiedler HP.** 2008. Nataxazole, a new benzoxazole derivative with antitumor activity produced by *Streptomyces* sp. Tü 6176. *J Antibiot* **61**:683-686.
- [243] **Cano-Prieto C, García-Salcedo R, Sánchez-Hidalgo M, Braña AF, Fiedler HP, Méndez C, Salas JA, Olano C.** 2015. Genome mining of *Streptomyces* sp. Tü 6176: Characterization of the nataxazole biosynthetic pathway. *ChemBioChem* **16**:1461-1473.
- [244] **Korp J, Winand L, Sester A, Nett M.** 2018. Engineering pseudochelin production in *Myxococcus xanthus*. *Appl Environ Microbiol* **84**:e01789-18.
- [245] **Davies J, Wright GD.** 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol* **5**:234-240.
- [246] **Sykes RB, Matthew M.** 1976. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **2**:115-157.
- [247] **Johnstone TC, Nolan EM.** 2015. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Trans* **44**:6320-6339.
- [248] **Koh EI, Henderson JP.** 2015. Microbial copper-binding siderophores at the host-pathogen interface. *J Biol Chem* **290**:18967-18974.
- [249] **Wang P, Yu Z, Santangel TJ, Olesik J, Wang Y, Heldwein E, Li X.** 2017. BosR is a novel Fur family member responsive to copper and regulating copper homeostasis in *Borellia burgdorferi*. *J Bacteriol* **199**:e00276-17.
- [250] **Konz D, Marahiel MA.** 1999. How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol* **6**:R39-R48.
- [251] **Arnold JW, Shimkets LJ.** 1988. Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **170**:5771-5777.
- [252] **Palsdottir H, Remis JP, Schaudinn C, O'Toole E, Lux R, Shi W, McDonald KL, Costerton JW, Auer M.** 2009. Three-dimensional macromolecular organization of cryofixed *Myxococcus xanthus* biofilms as revealed by electron microscopic tomography. *J Bacteriol* **191**:2077-2082.
- [253] **Nudleman E, Wall D, Kaiser D.** 2005. Cell-to-cell transfer of bacterial outer membrane lipoproteins. *Science* **309**:125-127.

- [254] **Li Y, Sun H, Ma X, Lu A, Lux R, Zusman D, Shi W.** 2003. Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. Proc Natl Acad Sci USA **100**:5443-5448.
- [255] **Hu W, Li L, Sharma S, Wang J, McHardy I, Lux R, Yang Z, He X, Gimzewski JK, Li Y, Shi W.** 2012. DNA builds and strengthens the extracellular matrix in *Myxococcus xanthus* biofilms by interacting with exopolysaccharides. PLoS One **7**:e51905.
- [256] **Curtis PD, Atwood J, Orlando R, Shinkets LJ.** 2007. Proteins associated with the *Myxococcus xanthus* extracellular matrix. J Bacteriol **189**:7634-7642.
- [257] **Kaiser D, Warrick H.** 2011. *Myxococcus xanthus* swarms are driven by growth and regulated by a pacemaker. J Bacteriol **193**:5898-5904.
- [258] **Holmström C, Kjelleberg S.** 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microbiol Ecol **30**:285-293.
- [259] **Lee HK, Chun J, Moon EY, Ko SH, Lee DS, Lee HS, Bae KS.** 2001. *Hahella chejuensis* gen. nov., sp. nov., an extracellular-polysaccharide-producing marine bacterium. Int J Syst Evol Microbiol **51**:661-666.
- [260] **Liu Y, Zhang Z, Wang Y, Zheng Y, Zhang XH.** 2016. *Enterovibrio pacificus* sp. nov., isolated from seawater, and emended descriptions of *Enterovibrio coralii* and the genus *Enterovibrio*. Int J Syst Evol Microbiol **66**:319-325.
- [261] **Amin AKMR, Tanaka M, Al-Saari N, Feng G, Mino S, Ogura Y, Hayashi T, Meirelles PM, Thompson FL, Gomez-Gil B, Sawabe T, Sawabe T.** 2017. *Thaumasiovibrio occultus* gen. nov. sp. nov. and *Thaumasiovibrio subtropicus* sp. nov. within the family Vibrionaceae, isolated from coral reef seawater off Ishigaki Island, Japan. Syst Appl Microbiol **40**:290-296.
- [262] **Zhang L, Wang H, Fang X, Stackebrandt E, Ding Y.** 2003. Improved methods of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strains. J Microbiol Methods **54**:21-27.
- [263] **Schieferdecker S, Exner TE, Gross H, Roth M, Nett M.** 2014. New myxothiazols from the predatory bacterium *Myxococcus fulvus*. J Antibiot **67**:519-525.
- [264] **Li ZF, Li X, Liu H, Liu X, Han K, Wu ZH, Wu W, Li FF, Li YZ.** 2011. Genome sequence of the halotolerant marine bacterium *Myxococcus fulvus* HW-1. J Bacteriol **193**:5015-5016.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [265] **Huntley S, Zhang Y, Treuner-Lange A, Kneip S, Sensen CW, Søgaaard-Andersen L.** 2012. Complete genome sequence of the fruiting myxobacterium *Coralloccoccus coralloides* DSM2259. *J Bacteriol* **194**:3012-3013.
- [266] **Huntley S, Kneip S, Treuner-Lange A, Søgaaard-Andersen L.** 2013. Complete genome sequence of *Myxococcus stipitatus* strain DSM 14675, a fruiting myxobacterium. *Genome Announc* **1**:e00100-13.
- [267] **Schneiker S, Perlova O, Kaiser O, Gerth K, Alici A, Altmeyer MO, Bartels D, Bekel T, Beyer S, Bode E, Bode HB, Bolten CJ, Choudhuri JV, Doss S, Elnakady YA, Frank B, Gaigalat L, Hoesmann A, Groeger C, Gross F, Jelsbak L, Jelsbak L, Kalinowski J, Kegler C, Knauber T, Konietzny S, Kopp M, Krause L, Krug D, Linke B, Mahmud T, Martinez-Arias R, McHardy AC, Merai M, Meyer F, Mormann S, Muñoz-Dorado J, Perez J, Pradella S, Rachid S, Raddatz G, Rosenau F, Rückert C, Sasse F, Scharfe M, Schuster SC, Suen G, Treuner-Lange A, Velicer GJ, Vorhölter FJ, Weissman KJ, Welch RD, Wenzel SC, Whitworth DE, Wilhelm S, Wittmann C, Blöcker H, Pühler A, Müller R.** 2007. Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat Biotechnol* **25**:1281-1289.
- [268] **Han K, Li ZF, Peng R, Zhu LP, Zhou T, Wang LG, Li SG, Zhang XB, Hu W, Wu ZH, Qin N, Li YZ.** 2013. Extraordinary expansion of a *Sorangium cellulosum* genome from an alkaline milieu. *Sci Rep* **3**:2101.
- [269] **Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1462.
- [270] **Korp J, Vela Gurovic MS, Nett M.** 2016. Antibiotics from predatory bacteria. *Beilstein J Org Chem* **12**:594-607.
- [271] **Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HK, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH.** 2015. antiSMASH 3.0 – a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res* **43**:W237-W243.
- [272] **Rudic V, Popova N, Crivova A, Boortseva S, Rastimeshina I.** 2002. Biosynthesis of lipoxygenase, lipids and its fatty acid composition of actinomycetes and yeast. *Roum Biotechnol Lett* **7**:711-716.

Anhang
5.3 Literaturverzeichnis

- [273] **Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K.** 2015. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim Biophys Acta* **1851**:305-330.
- [274] **Kuhn H, Thiele B.** 1999. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequences data but little information on biological significance. *FEBS Lett* **449**:7-11.
- [275] **Andreou A, Vank M, Bezakova L, Feussner I.** 2008. Properties of a mini 9R lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutation forms. *Phytochemistry* **69**:1832-1837.
- [276] **Porta H, Rocha-Sosa M.** 2002. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol* **130**:15-21.
- [277] **Oliw EH.** 2002. Plant and fungal lipoxygenases. *Prostag Oth Lipid M* **68-69**:313-323.
- [278] **Lang I, Gobel C, Porzel A, Heilmann I, Feussner I.** 2008. A lipoxygenase with linoleate diol synthase activity from *Nostoc* sp. PCC 7120. *Biochem J* **410**:247-357.
- [279] **Gao B, Boeglin WE, Brash AR.** 2010. Ω -3 fatty acids are oxygenated at the n-7 carbon by the lipoxygenase domain of a fusion protein in the cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Biochim Biophys Acta* **1801**:58-63.
- [280] **Andreou A, Gobel C, Hamberg M, Feussner I.** 2010. A bisallylic mini-lipoxygenase from cyanobacterium *Cyanothece* sp. that has an iron as cofactor. *J Biol Chem* **285**:14178-14186.
- [281] **Lamont IL, Baere PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML.** 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:7072-7077.
- [282] **Whitworth DE.** 2011. Myxobacterial vesicles: death at a distance? *Adv Appl Microbiol* **75**:1-31.

5.4 Abkürzungsverzeichnis

[D ₄]MeOH	deutერიertes Methanol
2,3-DHBS	2,3-Dihydroxybenzoesäure
5-HPETE	5-Hydroxyperoxyarachidonsäure
5-LOX	Arachidonat-5-Lipoxygenase
ABC-Transporter	Engl.: ATP binding cassette Transporter
A-Domäne	Adenylierungsdomäne (engl.: adenylation domain)
ADP	Adenosindiphosphat
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
antiSMASH	Engl.: antibiotic and secondary metabolite analysis shell
ArCP	Engl.: aryl carrier protein
A-System	Engl.: adventurous system
ATP	Adenosintri-phosphat
BLASTn	Engl.: basic local alignment search tool for nucleotides
BLASTp	Engl.: basic local alignment search tool for proteins
BosR	<i>Borellia</i> oxidative stress regulator
Bp	Basenpaare
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAS	Chromazurol S
C-Domäne	Kondensationsdomäne (engl.: condensation domain)
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CoCl ₂	Kobalt(II)-chlorid
CTABr	Cetyltrimethylammoniumbromid
CuCl ₂	Kupfer(II)-chlorid
Da	Dalton
DAHP	3-Desoxyarabinoheptulosanat-7-phosphat
DCM	Dichlormethan
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DH	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Anhang
5.4 Abkürzungsverzeichnis

EtOAc	Ethylacetat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDA	Engl.: U. S. food and drug administration
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisen (engl.: ferrous iron)
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisen (engl.: ferric iron)
FeSO ₄	Eisen(II)sulfat
FUR	Engl.: ferric uptake regulator
H ₂ O	Wasser
H ₃ BO ₃	Borsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high pressure liquid chromatography)
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie (engl.: high resolution-mass spectrometry)
IC ₅₀	Konzentration , bei welcher das Wachstum von 50% aller Zellen gehemmt wird
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	lysogeny broth
Mbp	Megabasenpaare
MeOH	Methanol
MFS	Engl.: major facilitator superfamily
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
Na ₂ MoO ₄	Natriummolybdat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NiCl ₂	Nickel(II)-chlorid
nm	Nanometer

Anhang

5.4 Abkürzungsverzeichnis

NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: nuclear magnetic resonance)
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase (engl.: nonribosomal peptide synthetase)
O ₂	molekularer Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OMV	Engl.: outer membrane vesicle
PAGE	<u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
PBS	Engl.: phosphate buffered saline
PCP	Engl.: peptidyl carrier protein
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
P _i	Anorganisches Phosphat (engl.: inorganic phosphate)
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
PKS	Polyketid-Synthase (engl.: polyketide synthase)
PPTase	Phosphopantetheinyl-Transferase
Red	Reduktase
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
SET-Puffer	NaCl/ EDTA/ Tris-Puffer (engl.: sodium chloride/ EDTA/ Tris buffer)
S-System	Engl.: social system
TB	Engl.: Terrific Broth
TE	Thioesterase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VE	vollentsalztes Wasser
vs.	versus
ZnSO ₄	Zinksulfat

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die geltende Promotionsordnung der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen der Technischen Universität Dortmund ist mir bekannt. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Es haben Dritte weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen. Diese schriftliche Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht und auch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung verwendet.

Juliane Korp

Tagungsbeiträge

Korp J, Schieferdecker S, König S, Dahse HM, König GM, Werz O, Nett M. 2016. Harnessing enzymatic promiscuity in myxochelin biosynthesis for the production of 5-lipoxygenase inhibitors. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Jena. (Poster)

Korp J, Schieferdecker S, Dahse HM, Werz O, Nett M. 2015. Precursor-directed biosynthesis of myxochelin analogs. MiCom 2015, 5th International Student Conference on Microbial Communication, Jena. (Vortrag)

Korp J, Schieferdecker S, König S, Dahse HM, König GM, Werz O, Nett M. 2015. Harnessing enzymatic promiscuity in myxochelin biosynthesis for the production of 5-lipoxygenase inhibitors. Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) Workshop "Biologie von Naturstoff-produzierender Mikroorganismen", Frankfurt am Main. (Vortrag)

Korp J, Schieferdecker S, Dahse HM, Werz O, Nett M. 2015. Precursor-directed biosynthesis of myxochelin analogs. 8th Symposium of the International Leibniz Research School for Microbial and Biomolecular Interactions, Jena. (Poster)

Publikationen

Korp J, Winand L, Sester A, Nett M. 2018. Engineering pseudochelin production in *Myxococcus xanthus*. Appl Environ Microbiol **84**:e01789-18.

Korp J, Vela-Gurovic MS, Nett M. 2016. Antibiotics from predatory bacteria. Beilstein J Org Chem **12**:594-607.

Korp J, König S, Schieferdecker S, Dahse HM, König GM, Werz O, Nett M. 2015. Harnessing enzymatic promiscuity in myxochelin biosynthesis for the production of 5-lipoxygenase inhibitors. ChemBioChem **16**:2445-2450.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum /-ort 08.05.1989, Gera
Staatsangehörigkeit deutsch

Bildungsweg

2016 – 2018 **Promotion im Fach Biologie**
Technische Universität Dortmund, Arbeitsgruppe Technische Biologie
Abschluss: Dr. rer. nat. (*magna cum laude*)
Thema: Untersuchungen zur Biosynthese und Funktion von Myxochelinen in Myxobakterien.
Doktorvater: Prof. Markus Nett

2014 – 2016
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V.
Hans-Knöll-Institut, Jena
Nachwuchsgruppe Sekundärmetabolismus räuberischer Bakterien

2012 – 2014 **Master-Studium im Fach Microbiology**
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Abschluss: Master of Science (Note: 1,3)

2008 – 2012 **Bachelor-Studium im Fach Biologie**
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Abschluss: Bachelor of Science (Note: 1,9)

1999 – 2007 **Gymnasium (Gera)**
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,7)

1995 – 1999 **Grundschule (Gera)**

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank den nachfolgenden Personen entgegenbringen, ohne deren Unterstützung und Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank geht insbesondere an meinen Doktorvater Prof. Dr. Markus Nett, für die Bereitstellung des interessanten Forschungsthemas und der Möglichkeit zur Anfertigung dieser Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe. Zudem danke ich für sein Vertrauen in meine Arbeit, die fachliche Betreuung und Unterstützung während meiner Promotion.

Zudem danke ich Prof. Dr. Till Schäberle von der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie Prof. Dr. Dr. h. c. Oliver Kayser und Prof. Dr. Stephan Lütz von der Technischen Universität Dortmund als Mitgliedern der Prüfungskommission.

Ich danke Dr. Sebastian Schieferdecker vom Hans-Knöll-Institut, Jena, sowie Prof. Dr. Oliver Werz und Stefanie König vom Lehrstuhl für pharmazeutische und medizinische Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena für ihre Kooperation und Zusammenarbeit bei der Generierung neuer Myxochelin-Derivate und der Ausführung der Struktur-Wirkungsbeziehungs-Studien. Für technische und experimentelle Unterstützungen während meiner Promotion möchte ich mich zudem bei Dr. Hans-Martin Dahse, Karin Martin, Andrea Perner und Heike Heinecke vom Hans-Knöll-Institut, Jena, bedanken. Mein weiterer Dank geht an alle ehemaligen Kollegen der Nachwuchsgruppe „Sekundärmetabolismus räuberischer Bakterien“ vom Hans-Knöll-Institut, sowie den aktuellen Kollegen der Arbeitsgruppe Technische Biologie und den Mitarbeitern des Biozentrums an der Technischen Universität Dortmund. In diesem Zusammenhang möchte ich mich insbesondere bei Dipl.-Pharm. Angela Sester und B. Sc. Lea Winand für ihre experimentelle Zusammenarbeit und bei Dr. Armin Quentmeier für seine Mithilfe bei der Anfertigung von Fotografien meiner Bakterien bedanken. Für ihre fachliche und persönliche Unterstützung in allen Lebenslagen danke ich des weiteren Dr. Xinli Pan.

Für immerwährende Unterstützung, Zuspruch und Geduld möchte ich mich bei meiner Familie, allem voran bei meinen Eltern und Dennis bedanken.

